



UNIVERSIDAD MIGUEL HERNÁNDEZ

Instituto de Bioingeniería

TESIS DOCTORAL

La importancia del ejercicio en el control metabólico y de parámetros inflamatorios y oxidativos en sujetos diabéticos tipo 1 y tipo 2.

Memoria de tesis para optar al grado de Doctor:

Natalia Alonso Arco

Director de la tesis:

Dr. Enrique Roche Collado
Elche, 2017



EUGENIO VILANOVA GISBERT, Catedrático de Toxicología y Director del Instituto de Bioingeniería,

HAGO CONSTAR:

Que doy conformidad a la lectura de la tesis doctoral presentada por

Dña. Natalia Alonso Arco,

titulada “La importancia del ejercicio en el control metabólico y de parámetros inflamatorios y oxidativos en sujetos diabéticos tipo 1 y tipo 2”.

que se desarrolló dentro del Programa de Doctorado de Bioingeniería de este instituto de investigación.

Elche, 2017

Eugenio Vilanova Gisbert

Catedrático de Toxicología

Director del Instituto de Bioingeniería



D. **Enrique Roche Collado**, Catedrático de Nutrición y Bromatología de la Universidad Miguel Hernández de Elche, Alicante.

CERTIFICA:

Que la presente memoria de Tesis Doctoral: “La importancia del ejercicio en el control metabólico y de parámetros inflamatorios y oxidativos en sujetos diabéticos tipo 1 y tipo 2”, presentada por **Natalia Alonso Arco** para optar al **Grado de Doctora** por la Universidad Miguel Hernández, ha sido realizada bajo su dirección en el Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández.

Para que conste y surta los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Elche a, Julio de 2017.

Fdo. **D. Enrique Roche Collado**

VºBº Director del Instituto de Bioingeniería



*A mi madre,
por darme una vida llena de posibilidades y amor.*

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, dar las gracias a mi director de tesis, el Dr. y Catedrático Enrique Roche, por permitirme realizar la tesis doctoral bajo su supervisión, enseñarme, guiarme en el camino y motivarme hasta que he llegado a la meta. Tus palabras siempre de ánimo y tu confianza han sido esenciales para que pudiera concluir esta tesis doctoral. Gracias de todo corazón. Siempre te estaré enormemente agradecida.

En segundo lugar, dar las gracias al Dr. Eduardo Cervelló, quien además de ayudarme con mi primera publicación, me presentó a Enrique Roche, dándome así la oportunidad de comenzar esta etapa de doctorado y haciendo realidad el deseo de poder dedicarme a la investigación.

Agradecer también a mis compañeros de laboratorio y a todas las personas que de un modo u otro, en algún momento de estos años, han ayudado a sacar adelante mi trabajo. En especial a Fernando, con quien compartí muchos momentos divertidos y me ayudó laboralmente.

A mis amigos, quienes me han escuchado hablar de esta tesis, mi tesis, tantas veces, incluso aunque a veces no supiesen de qué hablaba, gracias por interesarse y animarme, sois excepcionales.

Por último, dar las gracias intensamente a toda mi familia. A mi madre, gracias por confiar y creer en mí cuando decidí volver a estudiar, por tus esfuerzos y por tu apoyo siempre. Fueron tus palabras en mi mente, diciendo “Natalia, estudia...” las que determinaron el rumbo de la historia de mi vida y me han llevado a ser quien soy hoy. A mi hermana, mi mejor amiga y la mejor compañera de equipo que se podría desear, gracias por todo. No sabéis lo afortunada que me siento de teneros a las dos. Sois mi inspiración. A mi padre, que aun sin estar con nosotros siempre está presente en mi corazón, tu ausencia y tu recuerdo también me han hecho como soy. A mis abuelos, por colaborar en mi educación y muchísimo más, y a mis tías; en especial a Maite, que me ayudó tantas veces con mis estudios. Para terminar, dar las gracias a mi marido, Carlos. Me siento feliz de tenerte a mi lado, gracias por quererme tal y como soy, por apoyarme, valorarme tanto y respetarme. Eres increíble y haces que a tu lado la vida sea fácil y emocionante.

A todos, mil gracias.

“No se puede cruzar el mar simplemente mirando el agua”

Miguel **Rabindranath Tagore**
Hernández



ÍNDICE

Índice de Figuras	XXI
Índice de Tablas.....	XXIII
Abreviaturas	XXVII
Resumen/Abstract	XXXIII

INTRODUCCIÓN..... 1

I. DIABETES MELLITUS 3

I.1. Concepto y definición de Diabetes Mellitus 3

I.2. Clasificación..... 7

II. DIABETES MELLITUS TIPO 1 9

II.1. Etiopatogenia de la Diabetes Mellitus tipo 1 9

II.1.1. Factores ambientales..... 10

II.1.2. Susceptibilidad genética. 11

II.1.3. Autoinmunidad..... 14

II.2. Periodo de luna de miel 19

II.3. Beneficios de la preservación de la masa de célula β residual. 22

III. DIABETES MELLITUS TIPO 2 25

III.1. Etiopatogenia de la Diabetes Mellitus tipo 2..... 25

III.1.1. Susceptibilidad genética. 27

III.1.2. Factores ambientales..... 29

IV. DIABETES MELLITUS Y ACTIVIDAD FÍSICA.....	33
V. NUTRICIÓN EN EL ESPACIO	39
V.1. Momento del despegue	40
V.2. Exposición a los rayos cósmicos	41
V.3. Efecto de la ingravidez en la composición corporal	42
V.4. Provisión de oxígeno, agua y nutrientes en el espacio exterior	46
OBJETIVOS	49
I. OBJETIVO PRINCIPAL.....	51
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	52
MATERIALES Y MÉTODOS	53
I. INTERVENCIÓN I	57
I.1. Sujetos de estudio. Procedimiento y diseño del estudio.....	57
<i>I.1.1 Grupo Activo.</i>	<i>57</i>
<i>I.1.2 Grupo sedentario.....</i>	<i>57</i>
I.2. Determinaciones de hemoglobina glucosilada circulante (HbA1c).....	62
I.3. Determinación de péptido C.....	63
I.4. Purificación de células sanguíneas. Obtención de plasma.	64

I.5. Determinación de carbonilos proteicos en plasma	65
I.6. Análisis de citoquinas en plasma	66
I.7. Análisis estadístico	70
II. INTERVENCIÓN 2	71
II.1. Sujeto de estudio. Procedimiento y diseño del estudio.....	71
II.2. Determinaciones de los distintos parámetros metabólicos e inflamatorios.	74
II.3. Análisis estadístico	75
III. INTERVENCIÓN 3.....	77
III.1. Sujeto de estudio. Procedimiento y diseño del estudio	77
III.2. Actividades realizadas por AD	84
<i>III.2.1. “Trekking” al campo base del monte Everest.....</i>	<i>84</i>
<i>III.2.2. Prueba de aceleración.....</i>	<i>84</i>
III.3. Análisis sanguíneos	85
III.4. Determinaciones de los distintos parámetros metabólicos e inflamatorios	88
III.5. Análisis estadístico	89
IV. INTERVENCIÓN 4.....	91
IV.1. Sujetos de estudio. Procedimiento y diseño del estudio.....	91
IV.2. Mediciones vasculares.....	95

IV.2.1. Evaluación macrovascular.....	95
IV.2.2. Evaluación microvascular.....	96
IV.3. Determinaciones sanguíneas	97
IV.4. Determinación de la glucosa e insulina plasmática.....	98
IV.5. Obtención y purificación de células sanguíneas.....	99
IV.6. Determinación de carbonilos proteicos en plasma, neutrófilos y linfocitos.....	100
IV.7. Determinación de MDA en linfocitos, neutrófilos y plasma.....	101
IV.8. Análisis de citoquinas y marcadores relacionados con la función vascular en obesidad y resistencia a la insulina	102
IV.9. Análisis estadístico	103
V. INTERVENCIÓN 5.....	105
V.1. Sujetos de estudio. Procedimiento y diseño del estudio.....	105
V.1.1. Rutina deportiva	106
V.1.2. Composición dietética.....	106
V.2. Determinaciones de sanguíneas.....	108
V.2.1. Análisis hematológico y determinación de parámetros séricos.....	108
V.3. Actividades enzimáticas antioxidantes	109
V.4. Determinaciones de distintos parámetros metabólicos e inflamatorios.....	110

V.5. Análisis estadístico	111
RESULTADOS.....	113
I. INTERVENCIÓN I	117
I.1.1. Parámetros relacionados con el control del estado metabólico de los sujetos diabéticos tipo 1 del grupo A y S.....	118
I.2. Parámetros relacionados con el estado inmunológico e inflamatorio de los sujetos del grupo A y S.....	124
II. INTERVENCIÓN 2	131
II.1. Parámetros relacionados con el control metabólico de la diabetes tipo 1 en SCA	132
II.2. Parámetros relacionados con el estado inmunológico e inflamatorio del sujeto SCA	136
III. INTERVENCIÓN 3	141
III.1. Parámetros hematológicos y bioquímicos del sujeto AD.....	143
III.2. Parámetros relacionados con el estado oxidativo del sujeto AD.....	152
III.3. Parámetros relacionados con el estado inflamatorio del sujeto AD	153
IV. INTERVENCIÓN 4	155
IV.1. Parámetros antropométricos, circulantes y vasculares de los grupos NW y SOA	156

IV.2. Actividades de enzimas antioxidantes en los grupos NW y SOA.....	160
IV.3. Parámetros relacionados con el estado inflamatorio de NW y SOA.....	163
V. INTERVENCIÓN 5.....	165
V.1. Parámetros antropométricos y test 2000 metros del grupo de sujetos de estudio	167
V.2. Parámetros hematológicos y bioquímicos del grupo de sujetos de estudio..	168
V.3. Parámetros relacionados con el estado oxidativo del grupo de sujetos de estudio	171
V.4. Actividades de enzimas antioxidantes en el grupo de sujetos de estudio...173	
V.5. Parámetros relacionados con el estado inflamatorio del grupo de sujetos de estudio	175
DISCUSIÓN.....	177
I. INTERVENCIÓN 1	179
II. INTERVENCIÓN 2	187
III. INTERVENCIÓN 3.....	189
IV. INTERVENCIÓN 4.....	191
V. INTERVENCIÓN 5.....	195
CONCLUSIÓN	199
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	203

FIGURA 1.
Esquema/imagen de un islote pancreático y sus tipos celulares.....4

FIGURA 2.
Esquema del sistema sensor de glucosa de la célula β pancreática y liberación de la insulina6

FIGURA 3.
Esquema de los distintos estadios por los que progresa la diabetes mellitus tipo 226

FIGURA 4.
Incidencia de la patología diabética tipo 2 por grupos étnicos.....27

FIGURA 5.
Diagrama de flujo para el diseño del estudio, Intervención 160

FIGURA 6.
Diagrama de la obtención de plasma64

FIGURA 7.
Diagrama de la determinación de citoquinas.....68

FIGURA 8.
Imagen en software de las poblaciones de citoquinas tras la determinación.....69

FIGURA 9.
Diagrama de flujo para el diseño del estudio, Intervención 383

FIGURA 10.
Diagrama de flujo para el diseño del estudio, Intervención 494

FIGURA 11.
Diagrama de flujo para el diseño del estudio, Intervención 5107

TABLA 1.

Clasificación etiológica de la diabetes mellitus.....7

TABLA 2.

Criterios diagnósticos de la diabetes mellitus.....8

TABLA 3.

Principales genes involucrados en la DM2.....28

TABLA 4.

Ejemplo, dieta de 2500kcal para sujetos diabéticos61

TABLA 5.

Ejemplo, dieta de 1700kcal (día de descanso).....80

TABLA 6.

Ejemplo, dieta de 2400kcal (día de entrenamiento)81

TABLA 7.

Valores de la prueba de esfuerzo del sujeto AD.....82

TABLA 8.

Parámetros eritrocitarios.....85

TABLA 9.

Parámetros leucocitarios.....86

TABLA 10.

Serie plaquetaria86

TABLA 11.

Parámetros bioquímicos87

TABLA 12.

Ejemplo, dieta de 1600kcal93

TABLA 13.

Parámetros relacionados con el control del estado metabólico de los individuos del grupo A y el grupo S a lo largo del tiempo. 118

TABLA 14.

Correlaciones entre los principales parámetros relacionados con el control metabólico de los individuos del grupo A y el grupo S, incluyendo la frecuencia con la que se realizaba actividad física 122

TABLA 15.

Rangos de antiGAD en los grupos A y S a lo largo del tiempo 125

TABLA 16.

A) Rangos, expresados en ng/ml, de citoquinas proinflamatorias de los grupos A y S a lo largo del tiempo. 126

B) Rangos, expresados en ng/ml, de citoquinas antiinflamatorias de los grupos A y S a lo largo del tiempo. 126

TABLA 17.

A) Medias \pm esm, expresados en ng/ml, de citoquinas proinflamatorias de los grupos A y S a lo largo del tiempo. 127

B) Medias \pm esm, expresados en ng/ml, de citoquinas antiinflamatorias de los grupos A y S a lo largo del tiempo. 127

TABLA 18.

A) Parámetros relacionados con el control del estado metabólico de los individuos de los grupos A y S (expresados en forma de rangos), y del sujeto SCA a lo largo del tiempo. 132

A) Parámetros relacionados con el control del estado metabólico de los individuos de los grupos A y S (expresados en forma de medias \pm esm), y del sujeto SCA a lo largo del tiempo 133

TABLA 19.

Rangos de antiGAD de los grupos A y S, comparados con SCA a lo largo del tiempo. 136

TABLA 20.

A) Rangos de citoquinas proinflamatorias (expresadas en ng/ml) de los grupos A y S, comparadas con SCA a lo largo del tiempo137

B) Rangos de citoquinas antiinflamatorias (expresadas en ng/ml) de los grupos A y S, comparadas con SCA a lo largo del tiempo138

TABLA 21.

A) Valores eritrocitarios pre y post actividad de “trekking” al campo base del monte Everest del sujeto AD.....143

B) Valores eritrocitarios pre y post prueba de aceleración del sujeto AD144

TABLA 22.

A) Valores leucocitarios pre y post actividad de “trekking” al campo base del Everest del sujeto AD145

B) Valores leucocitarios pre y post prueba de aceleración del sujeto AD146

TABLA 23.

A) Valores plaquetarios pre y post actividad de “trekking” al campo base del monte Everest del sujeto AD.....147

B) Valores plaquetarios pre y post prueba de aceleración del sujeto AD147

TABLA 24.

A) Valores bioquímicos pre y post actividad de “trekking” al campo base del monte Everest del sujeto AD.....148

B) Valores bioquímicos pre y post prueba de aceleración del sujeto AD.....149

TABLA 25.

Niveles circulantes de carbonilos proteicos en AD en los cuatro momentos del estudio.....152

TABLA 26.

A) Niveles (ng/ml) de citoquinas proinflamatorias en AD153

B) Niveles (ng/ml) de citoquinas antiinflamatorias en AD153

TABLA 27.

A) Datos y parámetros antropométricos y circulantes en el grupo NW expresados en media \pm esm 156

B) Datos y parámetros antropométricos y circulantes en el grupo SOA expresados en media \pm esm 157

TABLA 28.

A) Actividades de las enzimas antioxidantes del grupo NW expresadas como media \pm esm. 160

B) Actividades de las enzimas antioxidantes del grupo SOA expresados como media \pm esm. 161

TABLA 29.

Rangos de citoquinas en los diferentes tiempos de estudio en el grupo SOA y NW 163

TABLA 30.

Parámetros antropométricos y resultados del test de 2000m en el grupo de estudio expresados como la media \pm esm 167

TABLA 31.

Parámetros hematológicos y bioquímicos en el grupo de estudio expresados como la media \pm esm 168-169

TABLA 32.

Marcadores oxidativos determinados en neutrófilos, linfocitos y plasma en el grupo de estudio expresados como la media \pm esm 171

TABLA 33.

Actividades enzimáticas antioxidantes determinada en neutrófilos, linfocitos y eritrocitos en el grupo de estudio expresados como la media \pm esm 173

TABLA 34.

Niveles de citoquinas plasmáticas en el grupo de estudio expresados como la media \pm esm 175

A ➔ **ACh:** Acetilcolina.

AD: Astronauta diabético.

ADA: Del inglés, American Diabetes Association (Asociación Americana de Diabetes).

ACSM: Del inglés, American College of Sports Medicine (colegio Americano de medicina deportiva).

AF: Actividad física.

AFR: Actividad física regular.

ALS: Del inglés, antilymphocyte serum (suero antilinfocito T).

ANOVA: Del inglés, analysis of variance (análisis de varianza).

ATG: Del inglés, antithymocyte globulin (antitimocito globulina).

ATP: Del inglés, adenosine triphosphate (adenosín trifosfato).

AP: Del inglés, alkaline phosphatase (fosfatasa alcalina).

APCs: Del, inglés antigen presenting cells (células presentadoras de antígenos).

B ➔ **BHT:** Butil hidroxitolueno.

C ➔ **CAMK1D:** Del inglés, calcium/calmodulin dependent protein kinase 1D (calcio/calmodulina dependiente de la proteína kinasa 1D).

CAPN10: Del inglés, calpain (calpaína 10).

CAT: Catalasa.

CBF: Del inglés, cutaneous blood flow (flujo sanguíneo cutáneo).

CD-(N°): Del inglés, cluster of differentiation (cúmulo de diferenciación).

CDKAL1: Del inglés, regulatory subunit associated protein 1 like 1 (subunidad reguladora asociada a la proteína kinasa 1).

CHCM: Concentración de hemoglobina corpuscular media.

CK: Del inglés, creatine kinase (creatina quinasa).

CINH₄: Cloruro de amonio.

CR: Cociente respiratorio.

CRP: Del inglés, C-reactive protein (proteína C reactiva).

CTLA 4: Del inglés cytotoxic T-lymphocyte antigen 4 (antígeno 4 del linfocito T citotóxico).

CVD: Del inglés cardiovascular disease (enfermedad cardiovascular).

D ➔ **DCCT**: Del inglés, Diabetes Control and Complications Trial.

DM: Diabetes mellitus.

DNPH: 2,4- dinitrofenilhidrazina.

DBP: Presión sanguínea diastólica.

E ➔ **EDTA**: Del inglés, ethylenediaminetetraacetic acid (ácido etilendiaminotetraacético).

Esm: Error estándar de la media.

F ➔ **FC**: Frecuencia cardíaca.

FID: Federación Internacional de Diabetes.

fl: Femtolitro.

FMD: Del inglés, flow mediated dilation (Dilatación mediada por flujo).

FSC: Del inglés, forward scatter (detector de dispersión frontal).

FTO: Del inglés, fat mass and obesity associated (proteína asociada a la masa grasa y obesidad).

G ➔ **GAD**: Del inglés, glutamic acid decarboxylase (glutamato descarboxilasa o ácido glutámico descarboxilasa).

GGT: Del inglés, gamma glutamyl transferase (gamma glutamil transpeptidasa).

GIP: Del inglés gastric inhibitory polypeptide (péptido insulínico dependiente de glucosa).

GK: Del inglés, glucokinase (glucoquinasa).

GLM: Modelo lineal general.

GLP-1: Del inglés glucagon-like peptide-1 (péptido-1 análogo al glucagón).

GLUT: Del inglés, glucose transporter (transportador de glucosa).

GOT/AST: Del inglés, glutamyl oxaloacetic transaminase/aspartate aminotransferase (transaminasa glutámico-oxalacética/aspartato aminotransferasa).

GPT/ALT: Del inglés, glutamyl pyruvic transaminase/alanine aminotransferase (transaminasa glutámico-pirúvica/alanina aminotransferasa).

GPX: Glutación peroxidasa.

GRD: Glutación reductasa.

GWAS: Del inglés, genome-wide association study (estudios de asociación genómica).

H → **Hb:** Hemoglobina.

HbA1c: Hemoglobina glucosilada.

HCl: Ácido clorhídrico.

HCM: Hemoglobina corpuscular media.

HDL: Del inglés, high density lipoprotein (lipoproteína de alta densidad).

HLA: Del inglés, human leucocyte antigen (antígeno leucocitario humano).

HNF1 β : Del inglés, hepatocyte nuclear factor 1 homeobox B.

HOMA: Del inglés, homeostatic model assessment.

HPLC: Del inglés, high performance liquid chromatography (cromatografía líquida de alta eficacia).

I → **IA-2:** Del inglés, islet antigen-2 (antígeno asociado al insulinoma-2).

ICA: Del inglés islet cell antibody (anticuerpos de las células insulares).

IDAA1c: Índice de HbA1c ajustado a la insulina.

IFCC: International Federation of Clinical Chemistry.

IFG: Del inglés impaired fasting glucose (glucosa alterada en ayunas).

IFN: Interferón.

Ig: Inmunoglobulina.

IGT: Del inglés impaired glucose tolerance (tolerancia anormal a la glucosa).

IL-(N°): Interleuquina.

IL-1Ra: Del inglés, interleukin-1 receptor antagonist.

IMC: Índice de masa corporal.

ISAK: Del inglés, International Society for The Advancement of Kinanthropometry (Sociedad Internacional para el Avance de Kinanthropometry).

K → **Kat:** katalas (unidades de actividad enzimática).

KCNJ11: Del inglés, potassium voltage-gated channel subfamily J member 11 (canal rectificador interno de potasio).

KCNQ1: Del inglés, potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1 (canal de repolarización lenta).

KM: Constante de Michaelis.

K-S test: Test Kolmogorov- Smirnov.

L → **LDF:** Flujometría láser Doppler.

LDL: Del inglés, low density lipoprotein (lipoproteína de baja densidad).

M → **M:** Molar.

Mb: Mioglobina

MDA: malondialdehído.

Meq: Miliequivalentes.

MHC: Del inglés, major histocompatibility complex (complejo mayor de histocompatibilidad (CMH)).

MHz: Megahercio.

MODY: Del inglés, maturity onset diabetes of the young (diabetes de la edad madura que se presenta en el joven).

MPO: Mieloperoxidasa.

N ➔ **NASA:** Del inglés, National Aeronautics and Space Administration (Administración Nacional de la Aeronáutica y del Espacio).

NGSP: National Glycohemoglobin Standardization Program.

NMD: Del inglés, nitrate mediated dilation (dilatación mediada por nitrato).

NOD: Del inglés, nonobese diabetic mouse.

NW: Del inglés, normal weight.

O ➔ **OMS:** Organización Mundial de la Salud.

P ➔ **PAI-1:** Del inglés plasminogen activator inhibitor-1 (inhibidor activador del plasminógeno 1).

PBS: Del inglés, phosphate buffered saline (tampón fosfato salino).

PFR: Proteína fijadora de retinol.

PP: Polipéptido pancreático.

PPAR- γ 2: Del inglés, peroxisome proliferator-activated receptor γ (Receptor activado por proliferadores peroxisomales γ).

PU: Unidades de perfusión.

R ➔ **RDW:** Banda de distribución de hematíes (red cell distribution width).

Rem: Del inglés, roentgen equivalent man.

RIA: Del inglés, radio inmuno assay (radioinmuno ensayo).

Rpm: Revoluciones por minuto.

S ➔ **SBP:** Presión sanguínea sistólica.

SCA: Sujeto caso aislado.

SNP: Del inglés, Sodium nitroprusside (nitroprusiato de sodio).

SOA: Del inglés, severely-obese adolescents.

SOD: Superóxido dismutasa

SSC: Del inglés, side scatter (detectores de dispersión lateral).

T ➔ **TBA:** Ácido tiobarbitúrico.

TCA: Ácido tricloroacético.

TEP: 1,1,3,3-tetraetoxipropano.

Th: Del inglés T-helper (T colaborador).

TGF: Del inglés, transforming growth factor (factor de crecimiento transformante).

TNF: Del inglés, tumor necrosis factor (Factor de necrosis tumoral).

tPA: Del inglés, tissue plasminogen activator (activador del plasminógeno tisular).

U ➔ **UI:** unidades internacionales.

UMH: Universidad Miguel Hernández.

Uniones gap: Uniones hendidura.

USA: Del inglés, Unites States of America (Estados Unidos de América).

V ➔ **VCM:** Volumen corpuscular medio.

VCO₂: Volumen de dióxido de carbono.

VO₂: Volumen de oxígeno.

VO₂max: Volumen de oxígeno máximo.

X ➔ **Xg:** Fuerza centrífuga.

Z ➔ **ZnT8:** Del inglés zinc transporter (transportador de cinc 8).

La diabetes mellitus (DM) es una enfermedad metabólica que se produce cuando el organismo pierde la capacidad de producir suficiente cantidad de insulina o de utilizarla eficientemente. Esto altera la utilización de los macronutrientes (glucosa, ácidos grasos y aminoácidos) por parte de los principales tejidos, como son hígado, músculo, tejido adiposo y cerebro. Si no se trata adecuadamente puede poner en riesgo vital al paciente. Existen 2 tipos prevalentes de diabetes: tipo 1 (10% de los casos) y tipo 2 (90% restante). La diabetes tipo 1 es originada por una destrucción autoinmune de las células β del páncreas endocrino, que son las células productoras de la hormona insulina. En la diabetes tipo 2, la cantidad de insulina producida por el páncreas endocrino es normal. El problema es que los tejidos diana no reconocen a la hormona (resistencia a la insulina). Esto hace que las células β produzcan insulina en exceso para compensar esta situación. El resultado es que la célula β se agota y comienza a morir por mecanismos apoptóticos, en los que intervienen el exceso de glucosa y ácidos grasos circulantes (glucolipotoxicidad). Además, las hiperglucemias persistentes están relacionadas con el desarrollo de complicaciones diabéticas como son la retinopatía, nefropatía, neuropatía y problemas cardiovasculares. En este contexto, el ejercicio físico se ha destacado como una de las primeras líneas de tratamiento para las enfermedades metabólicas dado sus beneficios sobre la salud.

Por ello, el principal objetivo del trabajo que se presenta en esta memoria de tesis ha sido el estudio de la influencia de la actividad física y la nutrición sobre el control metabólico, inflamatorio y oxidativo de la diabetes, tanto tipo 1, como tipo 2. Para ello se han desarrollado 5 estudios piloto en los que los sujetos desarrollaban un ejercicio físico controlado conjuntamente con una dieta equilibrada. Los sujetos presentaron un mejor control de la glucemia, menor dependencia de insulina exógena y una masa residual de célula β más funcional. Además, el abordaje ha puesto de manifiesto el efecto anti-inflamatorio del ejercicio, esencial para la preservación y regeneración de la masa de célula beta residual. En este sentido, aumentos de la IL-22 observados en el estudio, evidencian que esta interleuquina podría ser una diana a considerar en futuros tratamientos de la diabetes. Igualmente, la actividad mieloperoxidasa parece ser un marcador claro para encontrar patrones de cambio a nivel inflamatorio en sujetos con resistencia a la insulina. A nivel antioxidante, las enzimas dependientes del glutatión se activan en sujetos con diabetes tipo 2 que practican

actividad física y esto podría ser el motivo que una disminución del daño oxidativo, evidenciado a través de los marcadores malonil-dialdehído y carbonilos proteicos.

De forma general, se puede considerar que la práctica de ejercicio físico y la nutrición antes del debut de la enfermedad diabética tipo 1 o tipo 2, o incluso durante la misma, pueden ayudar a un mejor control de las mismas.



Diabetes mellitus is a metabolic disorder that is caused by a deficient insulin production or a deficient insulin function. This alters macronutrient metabolism in the main tissues, such as liver, muscle, adipose tissue and brain. An inadequate treatment evolves to a vital risk in the patient. The most prevalent types of diabetes are: type 1 (10% of cases) and type 2 (90%). Type 1 diabetes is caused by an autoimmune destruction of pancreatic β -cells that are the cells that produce insulin. In type 2 diabetes, the amount of insulin produced by the endocrine pancreas is normal. The problem is that the target tissues do not recognize the hormone (insulin resistance). This results in an insulin overproduction by the β -cells trying to compensate the situation. The result is a dramatic decrease in insulin production and the β -cells dies following apoptotic mechanisms, in which the excess of circulating glucose and lipids contribute to the development of the disease (glycolipotoxicity). In addition, persistent hyperglycemias are related to the development of retinopathy, nephropathy, neuropathy and cardiovascular problems. In this context, physical exercise has appeared as one of the most effective treatment tools for metabolic diseases regarding the obtained health benefits.

For this reason, the main objective of the work presented in this thesis document has been the study of the influence of physical activity and nutrition in the metabolic, inflammatory and oxidative control of both, type 1 and type 2 diabetes. To this end, 5 pilot studies have been performed in which participants followed a controlled physical activity program and an equilibrated diet. Subjects presented a better glycemic control, less dependence from exogenous insulin and a more functional residual β -cell mass. In this context, increased amounts of IL-22 suggest that this particular interleukin could be a future target in the treatment of type 1 diabetes. In the same vein, myeloperoxidase activity presents a clear pattern for changes at inflammatory level in insulin resistance subjects. Taking into account the antioxidant status, the glutathione-dependent enzymes are more active in type-2 diabetic individuals practicing physical activity protocols, explaining at the same time the low level of oxidative damage observed from malonyl-dialdehyde and protein carbonyl measurements.

ABSTRACT

In conclusion, physical activity together with diet seem to be instrumental strategies before and during the development of type 1 and 2 diabetes, helping to a better control of both diseases.



INTRODUCCIÓN

OBJETIVOS

MATERIALES Y MÉTODOS



RESULTADOS

DISCUSIÓN

CONCLUSIÓN

BIBLIOGRAFÍA



UNIVERSITAS

Miguel **INTRODUCCIÓN**

Hernández

I. DIABETES MELLITUS.

I.1. Concepto y definición de Diabetes Mellitus.

La diabetes mellitus (DM) es una afección crónica que se desencadena cuando el organismo pierde la capacidad de producir insulina suficiente o de utilizarla con eficacia (*Harris & Zimmet, 1997*).

La insulina es una hormona que se fabrica en el páncreas endocrino. El páncreas endocrino representa el 1-2% de la masa total pancreática. El 98% restante es páncreas exocrino, especializado en producir enzimas digestivas que se vierten al intestino delgado. El páncreas endocrino está formado por unos acúmulos celulares denominados islotes pancreáticos o de Langerhans en honor a su descubridor. Estos islotes están a su vez formados por distintos tipos celulares especializados en la producción y secreción de una determinada hormona. El tipo celular mayoritario son las células β (beta) (50-60% de la masa del islote) que sintetizan y secretan insulina. Le siguen las células α (alfa) (30-35% de la masa del islote) especializadas en la producción y secreción de glucagón. El resto de tipos celulares son minoritarios y los conforman, las células δ (delta) especializadas en producir somatostatina, las células PP (polipéptido pancreático) que producen el mismo compuesto que les da nombre, las células ϵ (épsilon), que solo aparecen durante el desarrollo embrionario de los islotes y producen grelina y las células G (gastrina), que estimulan la producción de ácido clorhídrico por las células parietales del estómago, sintetizan y liberan gastrina (*Muñoz-Barragán, Gómez-Esteban & Carbajo, 2007*) (Figura 1).

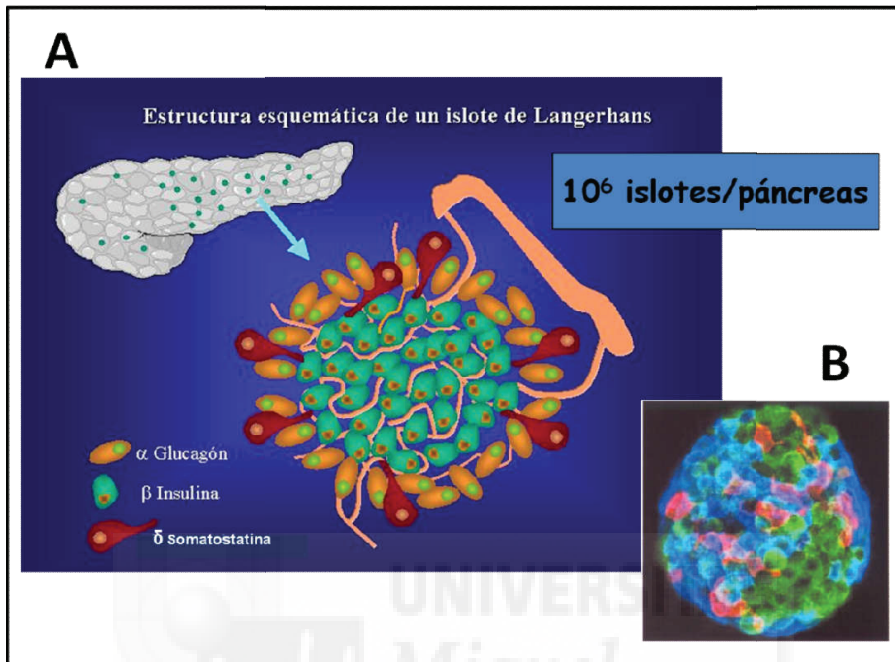


Figura 1. A) Esquema de la estructura de un islote pancreático señalando los 3 principales tipos celulares (α , β y δ) y las hormonas que producen. **B)** Imagen por inmunocitoquímica que revela los tres principales tipos celulares de un islote pancreático humano: α (azul), β (verde) y δ (rojo). Cada tipo celular se ha identificado con anticuerpos específicos contra las diferentes hormonas. Las células β aparecen como menos abundantes porque la mayoría de ellas se encuentran en el interior del islote. Ver texto para más detalles.

En condiciones fisiológicas normales, tras la entrada de glucosa, en las células β se desencadena la secreción de insulina (*Bell & Polonsky, 2001*). Esto ocurre porque la célula β posee un sistema sensor de glucosa formado por el transportador de glucosa (GLUT, del inglés glucose transporter), GLUT-1 (humanos) o GLUT-2 (roedores), y la primera enzima de la glucólisis: la glucoquinasa (GK, del inglés glucokinase). La alta KM (constante de Michaelis), baja afinidad por la glucosa, de estos transportadores y la no inhibición de la GK por el producto de la reacción (glucosa-6-fosfato) hace que la concentración intracelular de glucosa aumente de forma similar a la glucosa extracelular, activando la maquinaria de secreción (*Montanya-Mias & Téllez-Besolí, 2007*) (Figura 2).

La insulina, una vez liberada, llegará a través de la sangre a los tejidos periféricos donde se unirá a sus receptores iniciando una cascada de transducción que dará como resultado la captación de glucosa por las células para su metabolismo, transformándose en energía o almacenándose en forma de glucógeno (*Saltiel & Kahn, 2001*). Para ello, la insulina promueve la translocación del receptor específico (baja KM) de la glucosa GLUT-4, almacenado en vesículas unidas al Golgi, a la membrana celular. Este receptor es característico de tejidos diana de la hormona, como el músculo esquelético y tejido adiposo.

Por el contrario, defectos en la producción o acción de la insulina tendrán como consecuencia que la glucosa no se absorba adecuadamente, de modo que esta queda circulando en sangre, teniendo efectos sobre el metabolismo intermedio de carbohidratos, lípidos y proteínas, y haciendo evidente el síntoma clínico más característico en la diabetes: niveles anormalmente altos de glucosa en sangre (hiperglucemia). Esta hiperglucemia implica ausencia de glucosa a nivel intracelular, afectando al músculo esquelético, pero sobre todo al cerebro, que depende enteramente de la glucosa para su metabolismo.

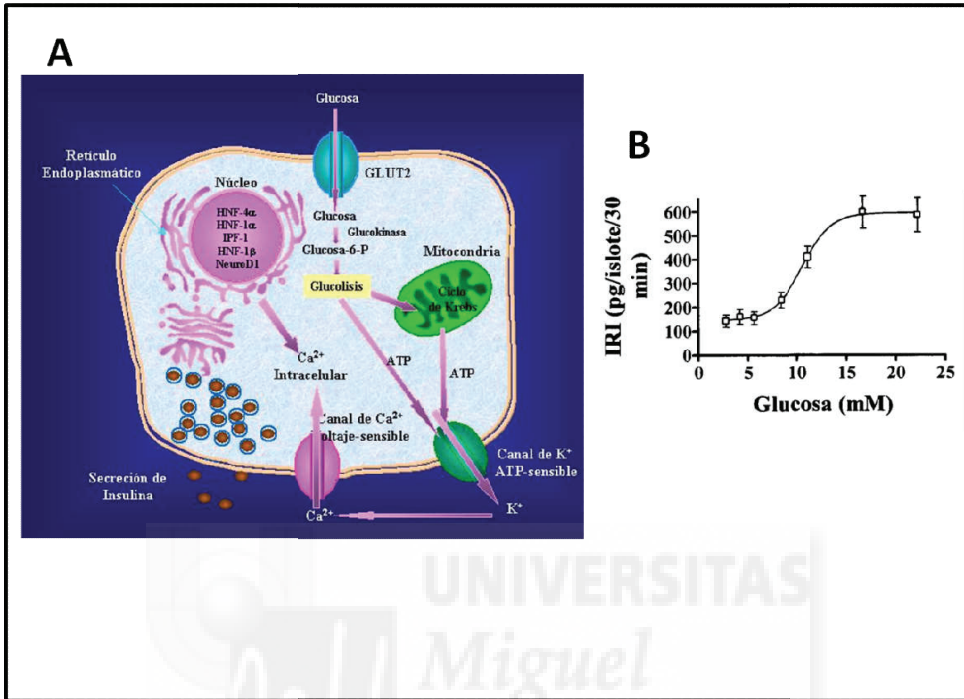


Figura 2. A) Esquema del sistema sensor de glucosa de la célula β pancreática. La glucosa penetra en el interior celular a través del transportador de glucosa GLUT-2 (GLUT-1 en humanos), e inmediatamente es metabolizada por la glucoquinasa entrando en el proceso de glucolisis. Esto genera un aumento en los niveles de ATP (adenosín trifosfato, del inglés adenosine triphosphate) que produce el cierre del canal de K^+ dependiente de ATP. La despolarización de membrana induce la apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y la liberación del Ca^{2+} localizado en el retículo endoplasmático. Al mismo tiempo, se producen otros mensajeros que al interactuar con las vesículas de secreción, estimulan la liberación de la insulina. **B)** La liberación de la hormona (medida RIA (radioinmunoensayo, del inglés radioimmunoassay)) ocurre de forma dosis-dependiente a la concentración de glucosa durante los primeros 30 min del estímulo. Ver texto para más detalles.

I.2. Clasificación.

Los criterios diagnósticos de la diabetes, basados en la etiología de la enfermedad, se adoptaron en 1997 por el comité de expertos de la ADA (Asociación Americana de diabetes, del inglés American Diabetes Association) y posteriormente fueron aprobados por la Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1999 (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación etiológica de la diabetes mellitus.

Clasificación	
I.	Diabetes tipo 1 (destrucción de las célula β que habitualmente provoca déficit absoluto de insulina). A. Mediada por mecanismos inmunes. B. Mecanismo desconocido (idiopática).
II.	Diabetes tipo 2 (varía entre, predominantemente resistencia a la insulina con déficit relativo de insulina y predominantemente un defecto en la secreción de insulina).
III.	Otros tipos específicos de diabetes.
IV.	Diabetes gestacional.

Fuente: American Diabetes Association, 2012.

Esta clasificación, basada fundamentalmente en criterios etiológicos establece cuatro categorías: diabetes mellitus tipo 1 (DM1), diabetes mellitus tipo 2 (DM2), otros tipos específicos de diabetes y diabetes gestacional. La mayor proporción de casos de diabetes (99%) corresponden a los tipos 1 y 2.

Los criterios diagnósticos de la diabetes mellitus tienen como objetivo la detección precoz de la enfermedad, así como la de aquellos casos que presentan mayor riesgo a desarrollar complicaciones crónicas (*American Diabetes Association, 2012*) (Tabla 2).

Tabla 2. Criterios diagnósticos de la diabetes mellitus.

Criterios diagnósticos	
I.	HbA1c $\geq 6,5\%$. La prueba ha de realizarse en un laboratorio usando un método certificado por el NGSP y estandarizado por un ensayo del DCCT.
II.	Glicemia basal en plasma venoso ≥ 126 mg/dl (7 mmol/l).
III.	Síntomas clásicos de diabetes y glicemia al azar en plasma venoso ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l).
IV.	Glicemia en plasma venoso ≥ 200 mg/dl (11,1 mmol/l) a las 2 horas de una sobrecarga oral con 75g de glucosa.

Abreviaturas: NGSP, del inglés National Glycohemoglobin Standardization Program; DCCT, del inglés Diabetes Control and Complications Trial; HbA1c, hemoglobina glucosilada.

Fuente: American Diabetes Association, 2012.

II. DIABETES MELLITUS TIPO 1.

II.1. Etiopatogenia de la Diabetes Mellitus tipo 1.

La diabetes Mellitus tipo 1 (DM1) representa el 5-10% de los casos de diabetes y en la mayor parte, los mecanismos implicados son de tipo autoinmune, por lo que serían clasificados en diabetes mellitus tipo 1A.

La DM1 autoinmune, también conocida como diabetes insulino dependiente o diabetes juvenil, se caracteriza por la destrucción de las células β productoras de insulina de los islotes Langerhans, en individuos predispuestos genéticamente sobre los que inciden factores medioambientales (*Gomis, 2007*). Esta destrucción de las células productoras de insulina por el propio sistema inmunitario del individuo, obligará al paciente con DM1 a administrarse insulina exógena diariamente. A pesar de los avances en el conocimiento de la enfermedad, la etiopatogenia de ésta mantiene muchas incógnitas, entre ellas el elemento o elementos iniciadores del proceso.

Si bien es cierto, que se puede decir que existen tres componentes esenciales en el desarrollo de la diabetes mellitus tipo 1.

- Factores ambientales
- Susceptibilidad genética
- Autoinmunidad

II.1.1. Factores ambientales.

Existe evidencia de que los factores ambientales, principalmente las infecciones, están relacionadas directamente con el desencadenamiento de la enfermedad, bien por la destrucción de la célula β o por el desarrollo de un proceso autoinmune.

Determinados virus, entre los que destacan algunos picornavirus, como el Coxsackie del grupo B, el de la rubeola o el citomegalovirus entre otros, actuarían como paso inicial en una serie de cambios asociados con la destrucción de la célula β (*Álvarez et al., 2000; Gomis, 2007*).

La nutrición, es otro de los factores ambientales relacionados con la patogenia de la diabetes mellitus tipo 1. La introducción precoz del gluten o de la leche de vaca en la dieta podría estar relacionada con el desencadenamiento de la enfermedad. Por el contrario, la suplementación con hidroxicolecalciferol se relaciona con una disminución del riesgo a desarrollar diabetes, ya que el consumo de éste disminuye el estrés oxidativo y la inflamación pancreática al reducir los niveles de nitritos, de la interleuquina 6 (IL-6) y de las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHCI, del inglés major histocompatibility complex I) (*Gomis, 2007*).

II.1.2. Susceptibilidad genética.

La diabetes mellitus tipo 1, presenta un complejo patrón de asociaciones genéticas. No se ha identificado hasta el momento ningún gen que pueda inducir por sí solo DM1, sino que se habla más bien de una enfermedad poligénica, en la que varios genes se combinan para conferir el riesgo a padecer DM1. Además, la presencia de ciertos factores ambientales (vistos en el apartado anterior) parece modular de forma particular la expresión de determinados genes en individuos más susceptibles (*Eringsmark-Regnéll & Lemmark, 2012*).

De las múltiples regiones que parecen asociarse a la enfermedad, la más importante parece encontrarse en el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC), el cual tiene un papel fundamental en la defensa inmunológica del organismo. Concretamente en el cromosoma 6p21 del complejo o región HLA (del inglés, Human Leucocyte Antigen) de clase II (*Gomis, 2007; Giralt, 2002*).

Las moléculas HLA de clase I, se expresan en la mayoría de las moléculas nucleadas y están codificadas por genes dentro de los loci HLA-A,-B y -C, mientras que las moléculas HLA de clase II, son expresadas principalmente en células presentadoras de antígenos (por ejemplo, macrófagos y células dendríticas) y están codificadas por genes dentro de los loci HLA-DP, -DQ y -DR (*Notkins, 2002*).

En las moléculas HLA de clase I y II, los genes son altamente polimórficos y consisten en muchos alelos diferentes. Ciertos alelos HLA de clase II o combinaciones de alelos (haplotipos) que se transmiten a la descendencia, muestran una fuerte asociación con el desarrollo de la diabetes, mientras que otros haplotipos muestran una asociación débil o incluso protectora (*Notkins, 2002*). Por ejemplo, de HLA-B, B-3906 (susceptible) y B-5701 (protector), de HLA-A, A-2402 (susceptible) y A-1101 (protector) y de HLA-DPB1, DPB1-0301 y DPB1-0202, (susceptibles) y DPB1-0402 (protector) (*Howson et al., 2009; Nejentsev et al., 2007*).

Además, parece ser que HLA-DQ es el locus que confiere la principal susceptibilidad genética para desarrollar la DM1 en humanos. Las moléculas DQ tienen dos cadenas, alfa y beta, codificadas por los genes DQA y DQB. La susceptibilidad a la DM1 se ha descrito por la combinación de cadenas alfa-beta con ausencia de aminoácido aspártico en la posición 57 de la cadena beta y la presencia de arginina en la posición 52 de la cadena alfa. Por el contrario, algunas DQ protectoras contienen aspártico en la posición 52 de la cadena beta. Es decir, dependiendo de la secuencia de aminoácidos que haya en cada cadena se puede favorecer o no el desencadenamiento de la diabetes mellitus tipo 1 (*Giralt et al., 2002*).

Las moléculas HLA de clase I (HLA A, B y C) y de clase II (HLA DR, DQ y DP), son glicoproteínas que controlan la respuesta inmune expresándose en la superficie de las células presentadoras de antígenos. Estas moléculas HLA se unen a los antígenos y los presentan a los linfocitos T, responsables de la destrucción autoinmune de la célula β (*Nejentsev et al., 2007; Giralt et al., 2002*). Por lo tanto, el reconocimiento de un determinado antígeno y la consiguiente activación del sistema inmune estarán condicionados por las moléculas HLA de cada individuo.

El mecanismo exacto por el cual las moléculas HLA de clase II confieren susceptibilidad a la destrucción mediada por inmunidad de los islotes pancreáticos todavía no se conoce en su totalidad, pero la unión de péptidos de autoantígenos (glutamato descarboxilasa (del inglés, glutamic acid decarboxylase (GAD)), antígeno asociado al insulinoma-2 (del inglés, islet antigen-2 (IA-2)) y transportador del cinc-8 (del inglés, zinc transporter-8 (ZnT8)) y proinsulina), a moléculas HLA de clase II en el timo y en la periferia es probable que juegue un papel importante. El descubrimiento de que algunos individuos con diabetes tenían autoanticuerpos en su sangre proporcionó la evidencia de que la diabetes tipo 1 tenía un origen autoinmune (*Pociot et al., 2010*).

Recientemente, se ha postulado la presencia de una inflamación innata que puede ser desarrollada en un momento determinado de la vida del sujeto y ser transmitida a generaciones posteriores. Entre los actores que podrían desarrollar este estado inflamatorio, o una mayor susceptibilidad a padecer esta inflamación, estarían

algunas cepas de la microbiota intestinal, una alta permeabilidad intestinal o infecciones por algunas cepas de virus (*Cabrera, Henschel & Hessner, 2016*).

Por lo tanto, a la lista de los genes que regulan la respuesta inmune hay que añadir genes que modulan la inflamación intraislotos y la apoptosis en las células β pancreáticas (*Santin & Eizirik, 2013*).



II.1.3. Autoinmunidad.

La autoinmunidad se define como una reacción del sistema inmune contra componentes propios del organismo, causada por una pérdida de tolerancia hacia las moléculas propias. Este ataque es la causa de enfermedades autoinmunitarias como la diabetes mellitus tipo 1 (*Szablewski, 2014*). El ataque autoinmune y la inhibición funcional de las células β productoras de insulina en el páncreas conducen a la incapacidad, del resto de las células, de captar y metabolizar la glucosa y por lo tanto, al síntoma clínico más característico de la diabetes: niveles anormalmente altos de glucosa en la sangre o hiperglucemia. Esto, en última instancia, conduce a una dependencia exógena de la insulina (*Alba, Verdaguer & Vives, 2004*).

El debut de la DM1 coincide con los procesos de la destrucción de las células β en su fase final. Esta fase es asintomática y presenta inflamación del islote o insulinitis, mayor expresión de HLA, presencia de autoanticuerpos circulantes para las células β (antiGAD, anti IA-2, antiICA o antiinsulina entre otros) y disfunción de las células β , que evidencian una actividad inmunológica humoral y celular.

Los mecanismos que contribuyen a la destrucción de la célula β son principalmente los mediados por la infiltración linfocitaria (*Ting et al., 2012*). Las células mononucleares se infiltran en el tejido del islote incluyendo linfocitos CD4+ y CD8+, macrófagos y componentes del sistema del complemento e inmunoglobulinas. La elevada expresión de moléculas HLA y proteínas transportadoras de antígenos indican una mayor actividad presentadora del antígeno en el tejido del islote. Una vez que el proceso inmune es activado por células T autorreactivas, la estimulación continúa, debido a la presencia de autoantígenos que conducen a la expansión de células efectoras que incrementan el ataque contra la célula β (*Alba et al., 2004; Martínez-Ramonde et al., 2014; Kukreja et al., 2002; Li, Song & Qin, 2014*).

Hay dos clases principales de linfocitos T, los linfocitos T citotóxicos o linfocitos CD8+ y los linfocitos T colaboradores o linfocitos T CD4+.

Los linfocitos T citotóxicos, reconocen autoantígenos procesados y presentados en forma de péptidos unidos a moléculas de clase I de MHC en la superficie de células (por ejemplo, de las células β).

Los linfocitos T colaboradores, reconocen los antígenos procesados unidos a moléculas del MHC de clase II en la superficie de células presentadoras de antígenos (APCs, del inglés antigen presenting cells) como macrófagos y células dendríticas.

En la diabetes tipo 1, la interacción directa (célula a célula) entre los linfocitos T citotóxicos CD8+, específicos del antígeno y los autoantígenos en las células β , conlleva a la muerte de células β directamente, dando lugar a la activación de macrófagos citotóxicos y a la producción de citoquinas como TNF- α (factor de necrosis tumoral, del inglés tumor necrosis factor alpha) e IFN- γ (interferón gamma) que podrían inducir la expresión del ligando Fas (FasL) en las células β pancreáticas, produciendo una serie de eventos de transducción de señales que aumentarían la muerte de la célula por apoptosis.

Por el contrario, los linfocitos T CD4+ no reconocen autoantígenos en células β porque las células β no expresan moléculas de MHC de clase II. En su lugar, actúan reconociendo autoantígenos que han sido recogidos y procesados por APCs que expresan moléculas de clase II. Este mecanismo indirecto resulta también en la liberación de una variedad de moléculas efectoras como citoquinas (IFN- γ y TNF- α) y macrófagos activados, que a su vez secretan más citoquinas (IFN- γ , TNF- α , TNF- β e IL-2 (interleuquina 2, del inglés interleukin)) y que además, pueden activar más células T CD4+ y T CD8+ llevando siempre en última instancia a la muerte de la célula β . Cuando se activan, los linfocitos T CD4+ se especializan, diferenciándose en linfocitos efectores (principalmente en Th1 y Th2, pero hay tras subpoblaciones como Th17), que se distinguen por el tipo de citoquinas que producen.

Tanto la muerte directa como indirecta se cree que ocurre por apoptosis, pero la necrosis también podría desempeñar algún papel. (*Notkins, 2002; Lightfoot et al. 2012; Vega, Hernández & Hernández, 2009*).

Existe por tanto una estrecha colaboración entre células T y macrófagos que participan en el proceso de destrucción de las células β y en la creación de un microambiente para el desarrollo y activación de otras células T y de las células B. En este contexto, la respuesta inmune patogénica estaría mediada por linfocitos Th1 mientras que la protectora por el subconjunto Th2 (*Dirice et al., 2013; Johnson et al., 2013*). Estas poblaciones, se caracterizan como se comentaba anteriormente por la producción de diferentes tipos de citoquinas. Las citoquinas son, en resumen, potentes mediadores del sistema inmune a nivel de presentación antigénica. El subconjunto Th1 secreta citoquinas proinflamatorias tales como TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-12, mientras que los linfocitos Th2 producen citoquinas antiinflamatorias como IL-4, IL-6 y IL-10 (*Martínez-Ramonde et al., 2014*), Th17 es otra subpoblación descubierta recientemente que produce IL-17 e IL-22 (*Betelli, Korn & Kuchroo, 2007; Matsuzaki & Umemura, 2007; McGeachy, Bak-Jensen & Chen, 2007*). IL-1 β fue la primera citoquina que, incubada en islotes, produjo la inhibición en la secreción insulínica postestímulo de glucosa, aunque todo parece indicar que IL-1 β por sí sola no puede producir la destrucción de la célula β (*Walchlin et al., 2003*). Otras citoquinas como, TNF- α , IFN- γ generan quimiotaxis y estimulan la sobreexpresión de linfocitos T citotóxicos. Por el contrario, la sobreexpresión de IL-10 reduce los niveles de IFN- γ e IL-12, retardando la aparición del cuadro diabético (*Erbagci et al., 2001*).

Existen otras citoquinas proinflamatorias que promueven la enfermedad tales como, TNF- β , IFN- α , IL-2, IL-12, IL-17, IL-18, IL-21 e IL-27 (*Taylor-Fishwick et al., 2013*) y antiinflamatorias que pueden tener un efecto inhibitorio o protector como el TGF- β (factor de crecimiento transformante beta, del inglés transforming growth factor beta), IL-5 e IL-13 (*van Belle et al., 2010*). Sin embargo, parece ser que la dosis influye. Así, ciertas citoquinas inflamatorias expresadas de forma transitoria o a bajas dosis, pueden ejercer un efecto protector sobre las células β , preservando su función y favoreciendo su supervivencia (*Ibfelt et al., 2014; Arous et al., 2015; Dwyer et al., 2016*). Además parece ser, que combinaciones de determinadas citoquinas tienen mayores efectos citotóxicos sobre las células de los islotes pancreáticos. Algunas de estas combinaciones son, IL-1 β , IFN- α , IFN- γ , siendo muy efectiva la sinergia entre

IFN- α , IFN- γ (Marroqui et al., 2017; Lightfoot et al., 2012; van Belle, Coppieters & von Herrath, 2011; Kim et al., 2012; Singh et al., 2011). Como puede verse, el papel ejercido por las citoquinas en la patogenia de la diabetes es extremadamente complejo (ver más adelante).

Como se ha señalado, el mecanismo por el cual se desencadena la destrucción de la célula β no está claro, pero la composición de este microambiente y la secreción de citoquinas y quimiocinas es seguramente clave en el resultado de la actividad inmune (Kawasaki, 2012).

Uno de los signos más distintivos de autoinmunidad humoral, que puede ayudar a identificar a los individuos en fase prediabética y posteriormente a distinguir esta enfermedad autoinmunitaria de otras formas de diabetes mellitus, es la presencia de autoanticuerpos. La presencia temprana de autoanticuerpos además, implica un papel de las células B plasmáticas, productoras de anticuerpos en los eventos inmunológicos iniciales. En resumen, mientras que los autoanticuerpos derivados de células β podrían reflejar un preludio de la autoinmunidad, las células B son probablemente participantes activos en la respuesta inmune debido a su capacidad de presentar antígeno a las células T CD4+ y CD8+ diabetogénicas.

Los principales autoanticuerpos en la DM1 reaccionan ante cuatro autoantígenos de las células de los islotes (anticuerpos de las células insulares o ICA): ácido glutámico descarboxilasa-65 (GAD65), antígeno asociado al insulinoma-2 (IA-2 (también conocido como ICA512)), insulina (micro IAA o mIAA) y transportador de cinc 8 (ZnT8).

- GAD65: Entre el 60 y el 80% de los pacientes diabéticos de tipo 1 recién diagnosticados tienen autoanticuerpos contra GAD65 (AntiGAD).
- IA-2: Casi el mismo porcentaje (60-70%) de los pacientes recién diagnosticados con diabetes tipo 1 tienen autoanticuerpos contra IA-2 (AntiIA-2).

- Insulina: Los autoanticuerpos contra la insulina están entre los primeros autoanticuerpos que aparecen en el estado prediabético y generalmente se encuentran en niños muy pequeños. Entre el 30 y el 50% de los niños pequeños con diabetes tipo 1 tienen autoanticuerpos contra la insulina (*Notkins, 2002; van Belle et al., 2011; Kawasaki, 2012*).
- ZnT8: Es un transportador específico de la célula β que está localizado en la membrana de los gránulos de secreción de la insulina. Se han encontrado anticuerpos frente al ZnT8 en un 60-80% de los pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (*Wenzlau et al., 2007*). El cinc es esencial para empaquetar la insulina en los gránulos de secreción, a razón de un átomo de cinc coordinado con seis moléculas de insulina.

Los autoanticuerpos están presentes muchos meses o años antes de la aparición de la diabetes, por lo que pueden utilizarse para predecir individuos con riesgo de desarrollar la enfermedad. Además, han proporcionado una nueva visión en la clasificación de los pacientes, ya que muchos adultos clasificados dentro del grupo de diabetes tipo 2 habían sido mal diagnosticados por padecer realmente diabetes tipo 1 o una combinación de diabetes tipo 1 y diabetes tipo 2 (*Korhonen et al., 2002*).

Por último, hay que mencionar que algunas personas con autoanticuerpos e insulinitis (inflamación de los islotes Langerhans con infiltración celular) tardan muchos años en mostrar síntomas clínicos de la enfermedad o incluso en algunos casos no pasan a desarrollarla. Este fenómeno parece estar relacionado con la cantidad de células β destruidas. Se calcula a partir de estudios en animales que entre 60-90% de las células β deben destruirse antes de que la diabetes sea clínicamente evidente (*Stamper, Jackson & Wang, 2014*).

II.2. Periodo de luna de miel.

Como previamente se mencionó, los síntomas de la enfermedad se hacen evidentes cuando se ha producido entre el 60-90% de la pérdida de células β . Igualmente, no está claro por qué se produce el debut cuando todavía hay una cantidad significativa de células β funcionales (10%-40%) y qué determina este umbral celular (*Stamper, Jackson & Wang, 2014*). Es por ello que, en muchos casos existe una función residual de las células β en el momento del comienzo de la enfermedad y del tratamiento con insulina, durante el cual, la necesidad del paciente al tratamiento insulínico exógeno disminuye e incluso en algunos casos desaparece totalmente y el control metabólico es casi óptimo (*Mortensen et al., 2009*), permitiendo un buen control de la hiperglucemia durante un periodo variable de tiempo.

Basándose en los requerimientos de insulina, esta fase de remisión conocida como fase de luna de miel se categoriza en remisión parcial o remisión completa. La mayoría de los pacientes que experimentan un período de luna de miel requieren una cierta cantidad de insulina, aunque estas necesidades pueden reducirse drásticamente en comparación con las dosis iniciales. Esto se conoce como remisión parcial. La remisión completa, se refiere a pacientes con niveles de glucosa en la sangre bien controlados sin necesidad de insulina o medicación oral antidiabética. Este tipo de remisión es extremadamente raro comparado con la remisión parcial, la cual suelen experimentar gran cantidad de pacientes con DM1 (*Moole et al., 2015*) y que puede durar hasta 24 meses u ocasionalmente más de dos años (*Böber, Dündar & Büyükgemiz, 2001*).

La mayoría de los autores definen la remisión parcial como un periodo donde el requisito de insulina es $\leq 0,5 \text{ unidades} \times \text{kg}^{-1} \times 24\text{h}^{-1}$. Este dato por sí solo podría ser insuficiente, por lo que parece relevante combinar las necesidades de insulina con los niveles de hemoglobina glucosilada ($\text{HbA1c} \leq 7,5\%$). Debido a esta incertidumbre en el diagnóstico, actualmente se sugiere una nueva definición que combina ambos requerimientos, $\text{HbA1c} (\%) + [4 \times \text{dosis de insulina (unidades por kilogramo por 24 horas)}] \leq 9$ para el período de remisión parcial en niños y adolescentes con diabetes

tipo 1. Esta nueva fórmula recibe el nombre de IDAA1c (índice HbA1c ajustado a la insulina).

Como se comentaba, el período de luna de miel ocurre en muchos pacientes con DM1 poco después del inicio del tratamiento, momento en el que el paciente todavía tiene una función residual de célula β . La patogénesis de este fenómeno ha sido objeto de discusión, pero es probable que sea una combinación de dos factores: la recuperación parcial de las células β con secreción mejorada de insulina y la mejora de la sensibilidad periférica a la insulina tras el inicio del tratamiento con hormona exógena (*Mortensen et al., 2009*). Se han propuesto varias hipótesis para explicar el periodo de luna de miel, algunas de ellas se mencionan a continuación.

Por un lado, la suplementación exógena de insulina podría reducir los efectos perjudiciales que tiene la hiperglucemia tanto sobre la capacidad secretora de las células β , como sobre la acción de la insulina, permitiendo así cierta recuperación (*Unger & Grundy, 1985; Stamper, Jackson & Wang, 2014*). Además, las altas concentraciones de glucosa favorecerían la expansión de la masa de células β , pero este sería un efecto transitorio debido a la glucotoxicidad producida por la hiperglucemia persistente (*Chmelova et al., 2015*).

Por otro lado, la célula β está conectada eléctricamente entre sí formando una red mediante las uniones gap. Este acoplamiento intercelular, permite a las células β sincronizar su liberación pulsátil de insulina y responder adecuadamente a las variaciones de la dosis de glucosa extracelular. La hiperglucemia crónica, las citoquinas proinflamatorias, el estrés oxidativo, además de la muerte de las células β , pueden perjudicar la comunicación mediante las uniones gap. Por lo que el inicio del tratamiento, dirigido a eliminar la hiperglucemia y suprimir la autoinmunidad contra la célula β , mejoraría el control glucémico y reduciría los niveles de citoquinas proinflamatorias y de desequilibrio oxidativo, mejorando las conexiones celulares. Con el tiempo, estas uniones gap no pueden mantenerse a causa de la destrucción autoinmune de las células β , culminando el proceso diabético (*Jaberi-Douraki, Pietro & Khadra, 2015; Stamper, Jackson & Wang, 2014*).

Otras hipótesis implican la regeneración rápida de las células β y la respuesta inmune adaptativa. Diversos estudios con ratones NOD (del inglés, nonobese diabetic mouse), modelo animal de diabetes autoinmune, muestran que si se detiene la autoinmunidad y la inflamación de los islotes, se forman nuevas células β (Akirav, Kushner & Herold, 2008). Finalmente, se ha descubierto que en los islotes humanos se encuentran hasta cuatro subtipos diferentes de células β que presentan una diferente respuesta antigénica (Dorrell et al., 2016). Es posible que, considerando este contexto, existan subpoblaciones mejor toleradas por el sistema inmunitario, o más resistentes al ataque inmunológico. En cualquier caso, es un tema de importante relevancia médica que necesita investigaciones adicionales.



II.3. Beneficios de la preservación de la masa de célula β residual.

Tras la destrucción parcial de las células β y el inicio de la enfermedad, quedaría entre 10%-40% de células β residuales funcionales (*Stamper, Jackson & Wang, 2014*), pero esta función residual es insuficiente para generar la insulina requerida para el control metabólico. A pesar de ello, y aunque la destrucción de las células β es muy rápida después del debut de la enfermedad, estudios recientes indican que algunas células persisten más de 50 años después del diagnóstico de la enfermedad y esto está asociado con importantes beneficios (*Lascar, 2013*). Varios estudios de cohorte y análisis retrospectivos del DCCT (Diabetes Control and Complications Trial) han demostrado los beneficios de la conservación durante años de una función residual de la célula β , monitorizada mediante la detección de péptido C en la circulación (*Oram et al., 2014*). Así, cantidades ≥ 200 pmol/l de este péptido indican preservación de la célula β o la presencia de células β residuales. Estos beneficios están circunscritos a la mejora de los niveles de hemoglobina glucosilada, la reducción de crisis hipoglucémicas severas y a menos complicaciones a largo plazo, tales como retinopatía, nefropatía, neuropatía y problemas cardiovasculares. Estudios iniciales parecen indicar que esa estabilidad metabólica se correlaciona con el funcionamiento de la célula β preservada (*Nathan, et al., 2009; Lascar, 2013*).

La preservación de esta célula β residual permite como se decía, un mejor control metabólico de la diabetes a la vez que mejora la calidad de vida del paciente, sobretodo, es de particular interés en ciertos momentos de la vida de éstos, tales como la adolescencia, donde el control metabólico de la enfermedad es complicado debido a la adquisición de nuevas responsabilidades y la falta de interés por ciertos temas como el manejo de la enfermedad (*Martínez- Ramonde et al., 2014*).

A lo largo de los años, se han llevado a cabo diferentes investigaciones para encontrar estrategias que puedan ayudar a preservar la función β residual observada durante el periodo de luna de miel. Dado que la autoinmunidad es el principal mecanismo efector en la DM1, es lógico que muchos ensayos de intervención hayan usado regímenes de fármacos para silenciar y/o modular la respuesta inmune. Varios agentes farmacológicos tales como ciclosporina, azatiopina, prepnisona fueron inicialmente utilizados para esa finalidad, pero rápidamente se descartaron debido a sus efectos secundarios (*Van Belle et al., 2011; Martínez-Ramonde et al., 2014*).

La terapia antígeno-específica, es otra de las posibilidades terapéuticas que está actualmente en estudio. El uso de autoantígenos de células β como, insulina, GAD65, proteína de choque térmico-65 o sus péptidos para inducir tolerancia o inmunorregulación. El Rituximab es un compuesto farmacológico que actúa suprimiendo los anticuerpos antiinsulina sin efectos sobre otros anticuerpos del islote. El mismo razonamiento se aplica a los fármacos antiGAD, los cuales actúan exclusivamente sobre poblaciones específicas de células β que expresan GAD (*Singh et al., 2011; Van Belle et al., 2011*). Más recientemente, estudios en fase III en los que se utiliza anticuerpos monoclonales contra CD3 (del inglés, cluster of differentiation) no lograron retardar la destrucción de la célula β , aunque un régimen de dosis única dio interesantes resultados en jóvenes pacientes. Las intervenciones con antiCD3 parecen ser actualmente las más prometedoras. Otros enfoques utilizan anticuerpos policlonales, anti-linfocitos T (ALS, del inglés antilymphocyte serum) y antitimocito globulina (ATG, del inglés antithymocyte globulin) (*Vega et al., 2009; Ludvigsson, 2012*). Otras terapias experimentales incluyen anticuerpos contra CTLA 4/CD152 (antígeno 4 del linfocito T citotóxico, del inglés cytotoxic T-lymphocyte antigen 4). Se trata de una molécula estimuladora similar a CD28 que es expresada en células T colaboradoras y que está actualmente en fase de estudio.

Las citoquinas, las cuales afectan a la respuesta de las células T y juegan un papel en la inflamación y la muerte de células β , también están siendo objeto de diferentes estudios (*Akerman, Ludvigsson & Casas, 2013*). El bloqueo de ciertas citoquinas en los islotes de las células β (por ejemplo TNF- α) podría evitar la inducción

de otras interleuquinas proinflamatorias, como IL-1 β (Burke *et al.*, 2014), deteniendo el proceso inflamatorio. El Etanercept por ejemplo, es un agente bloqueador del receptor de TNF- α pero puede afectar a otras respuestas celulares en otros órganos donde estas citoquinas estén jugando un papel en la señalización. Por lo tanto, más investigaciones son necesarias relativas al uso de agentes farmacológicos para combatir la respuesta inflamatoria y autoinmune en diabetes (Singh *et al.*, 2011; Martínez-Ramonde *et al.*, 2014; Gallagher, Golland & Greenbaum, 2011).

Por último, es grande la evidencia que señala los efectos beneficiosos del ejercicio sobre la salud, y concretamente las ventajas metabólicas y psicológicas del ejercicio físico en el manejo de la diabetes mellitus tipo 1 una vez la enfermedad ha sido establecida y el periodo de luna de miel ha pasado (Carral San Laureano *et al.*, 2010). Además, estudios recientes con animales señalan que el ejercicio puede ayudar a la regeneración de la célula β pancreática al disminuir la apoptosis (Choi *et al.*, 2006; Park, *et al.*, 2007). Por ello, este ha sido uno de los ejes estudiados para el manejo de la diabetes tipo 1 en el presente documento de tesis.

III. DIABETES MELLITUS TIPO 2.

III.1. Etiopatogenia de la Diabetes Mellitus tipo 2.

La diabetes mellitus tipo 2, también conocida como diabetes del adulto o diabetes no insulino dependiente, es definida por la Asociación Americana de Diabetes (ADA) como un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia, resultado de defectos en la secreción de insulina, acción de la misma, o ambos (Pérez, 2016).

Según la Federación Internacional de Diabetes (FID) se estima que en 2015 había 415 millones de personas con DM2, es decir, alrededor del 8.5% de la población mundial (Zimmet et al., 2016; Quilez & Reig, 2015).

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) es un trastorno multisistémico y complejo que no solo implica al páncreas, si no que incluye al hígado, el músculo, el riñón, el tejido adiposo, el cerebro, la célula α pancreática y el intestino, así como a varias hormonas e incluso factores que contribuirían a la inflamación sistémica (Brunton, 2016). Se trata de una enfermedad multifactorial que viene determinada por factores genéticos y factores ambientales como el sedentarismo, la obesidad y la nutrición hipercalórica que son determinantes en su desarrollo (Vinagre & Conget, 2013).

La diabetes tipo 2 se caracteriza por grados variables de resistencia a la insulina y un defecto de la secreción de misma, existiendo una íntima relación entre la secreción de insulina y la sensibilidad a la acción de la hormona en el control de la homeostasis de la glucosa. Ambos fenómenos suelen coexistir y participan en una proporción diferente en la fisiopatología de la enfermedad (Di Fronzo et al., 1999) (Figura 3).

En condiciones normales, la insulina liberada en respuesta a la estimulación de las células β media la absorción de glucosa, aminoácidos y ácidos grasos por los tejidos sensibles a la insulina. A su vez, estos tejidos retroalimentan la información al islote en cuanto a su necesidad de insulina, cuyo mediador aún no se ha identificado, pero es

probable que implique la integración entre el cerebro y los sistemas humorales. Cuando la resistencia a la insulina está presente, la célula β aumenta su producción de insulina para mantener la tolerancia normal a la glucosa. Sin embargo, cuando la célula β es incapaz de ejercer esta tarea, el resultado es una elevación en la glucosa plasmática (Kahn, Cooper & Del Prato, 2014). Esta hiperglucemia puede afectar el funcionamiento de las células β y la resistencia periférica a la insulina creando un círculo vicioso que empeora el ya afectado estado metabólico (Li et al., 2004).

La resistencia a la insulina es un fenómeno bien conocido que vincula la obesidad con los riesgos metabólicos y cardiovasculares. De hecho, los episodios cardiovasculares constituyen en el 75-80% de casos la causa directa o indirecta de mortalidad en los pacientes con DM2 (Vinagre & Conget, 2013).

Como ya se ha comentado, coexisten en la enfermedad diabética de tipo 2 factores genéticos y factores ambientales que se detallan a continuación.

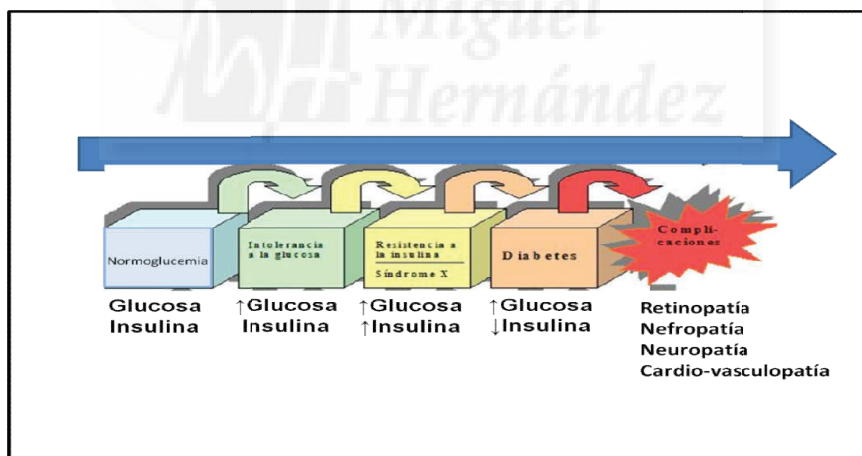


Figura 3. Esquema de los distintos estadios por los que progresa la diabetes tipo 2. En un momento determinado de normoglucemia, pueden aparecer episodios de hiperglucemia en los que la secreción de insulina es normal (intolerancia a la glucosa). Ante las hiperglucemias persistentes, la célula β pancreática responde secretando más insulina, que no llega a controlar el exceso de glucosa (fase de resistencia a la insulina). Finalmente, la célula β empieza a producir menos insulina apareciendo la diabetes tipo 2. Si la hiperglucemia no se controla adecuadamente, se desarrollan complicaciones diabéticas. Ver texto para más detalles.

III.1.1. Susceptibilidad genética.

La diabetes mellitus tipo 2 es una enfermedad poligénica. Algunos de los genes claves relacionados con la enfermedad son, CAPN10, KCNJ11, KCNQ1 y FTO, y actúan en conjunción con factores ambientales. PPAR γ fue uno de los primeros genes identificados. Desde entonces, utilizando ampliamente estudios de asociación genómica (GWAS, del inglés genome-wide association study), más de 50 genes se han vinculado a la diabetes tipo 2 (Morris *et al.*, 2012) (Tabla 3).

Una función disminuida de las células β , está presente en grupos que se sabe que están en mayor riesgo de padecer diabetes tipo 2 antes de la aparición de la enfermedad. Además, se ha demostrado que la función de las células β es hereditaria, lo que determina críticamente la intolerancia a la glucosa y el desarrollo de la patología en diferentes grupos raciales y étnicos (Jensen *et al.*, 2002) (Figura 4).

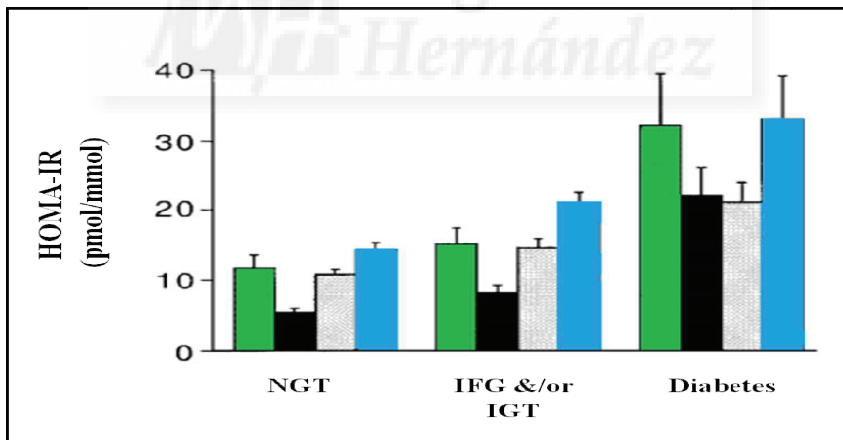


Figura 4. Incidencia de la patología por grupos étnicos. Sensibilidad a la insulina determinada por HOMA-IR en 531 sujetos de diferentes grupos étnicos, afroamericanos ■, asiático-americanos ■, caucásicos ■, hispanos ■. Los sujetos con prediabetes fueron clasificados en IFG (alteración de glucosa en ayunas, del inglés impaired fasting glucose) y/o IGT (tolerancia anormal a la glucosa, del inglés impaired glucose tolerance). Se considera IFG, niveles de azúcar en sangre, en ayunas de 100-125mg/dl e IGT, niveles de azúcar en sangre de 140-190mg/dl después de 2h de una prueba oral de tolerancia a la glucosa, niveles superiores a estos fueron considerados diabetes (Jensen *et al.*, 2002).

Tabla 3. Principales genes involucrados en la DM2

Gen	Nombre	Función
PPAR-γ2	Del inglés, peroxisome proliferator-activated receptor γ . Receptor activado por proliferadores peroxisomales γ .	Proteína nuclear involucrada en rutas metabólicas, principalmente en la vía de los ácidos grasos. Presenta una actividad de receptor nuclear dependiente de ligando similar a los receptores para hormonas esteroides.
CAPN10	Del inglés, calpain. Calpaína 10, (peptidasa).	Sus diferentes productos se localizan en la membrana celular o en el citoplasma. Tiene actividad enzimática intracelular tipo cisteín-proteasa.
KCNJ11	Del inglés, potassium voltage-gated channel subfamily J member 11. Canal rectificador interno de potasio, también denominado Kir6.2.	Constituye el núcleo del canal ATP-sensible al potasio (KATP) crucial en la secreción de insulina.
KCNQ1	Del inglés, potassium voltage-gated channel subfamily Q member 1. Canal de repolarización lenta KvLQT.	Subunidad formadora de poros de los canales de potasio. El gen también se expresa en las células epiteliales del páncreas exocrino y endocrino.
FTO	Del inglés, fat mass and obesity associated. Proteína asociada a la masa grasa y obesidad.	Función desconocida. Afecta al IMC de la población general. La proteína cataliza alquilaciones a nivel ADN y ARN..
HNF1β	Del inglés, hepatocyte nuclear factor 1 homeobox B. Asociado al factor de transcripción 2.	Factor de transcripción que participa en el desarrollo y crecimiento del páncreas y la célula β .
CAMK1D	Del inglés, calcium/calmodulin dependent protein kinase 1D. Calcio/calmodulina dependiente de la proteína quinasa 1D.	Regulador del ciclo celular y de la proteína quinasa.
CDKAL1	Del inglés, regulatory subunit associated protein 1 like 1. Subunidad reguladora asociada a la proteína quinasa 1.	Sensor de toxicidad de glucosa en los islotes Langerhans, inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 5 (CDK5). Desarrollo regeneración y función de la célula β .

Tratado SED de Diabetes Mellitus.

Abreviaturas: ATP, adenosina trifosfato; IMC, índice de masa corporal.

III.1.2. Factores ambientales.

Factores ambientales como la baja actividad física, la obesidad y la nutrición rica en grasas saturadas, son determinantes en el desarrollo de la DM2 (*Vinagre & Conget, 2013*).

La obesidad, es sin duda uno de los factores más importantes en el desarrollo de la enfermedad. Una gran proporción de los pacientes con DM2 son obesos (80%) y la obesidad, especialmente la de localización abdominal, genera resistencia a la insulina. Sin embargo, la DM2 también puede diagnosticarse en sujetos no obesos aunque, la mayoría de ellos, según criterios tradicionales presentan un mayor porcentaje de grasa corporal en la región abdominal (*Nadeau et al., 2016*).

El mecanismo exacto por el cual la obesidad causa resistencia a la insulina es desconocido. En las células grasas de individuos sanos, la insulina inhibe la lipólisis, suprimiendo así la liberación de ácidos grasos libres. En la DM2, la resistencia a la insulina impide que la insulina actúe sobre las células grasas, lo que conduce a una mayor lipólisis y a una elevada concentración de ácidos grasos libres. Éstos tienden a acumularse en determinados tipos celulares, como la propia célula β , generando lipotoxicidad. Aunque existen mecanismos moleculares para paliar los efectos de la lipotoxicidad (incrementando la β -oxidación), los incrementos de ácidos grasos libres circulantes van acompañados de hiperglucemia. El exceso de glucosa impide que los mecanismos contra la lipotoxicidad puedan actuar, provocando a largo plazo la muerte de la célula β por mecanismos apoptóticos (*El-Assaad et al., 2010*). Adicionalmente, aparecen procesos de desregulación hormonal. Así, hormonas incretinas secretadas por células del intestino, como el péptido-1 análogo al glucagón (GLP-1, del inglés glucagon-like peptide-1) y en menor grado, el péptido insulínico dependiente de glucosa (GIP, del inglés gastric inhibitory polypeptide), activan los receptores en las células β del páncreas. Estos receptores acoplados a proteína G estimulan la secreción

de insulina ante niveles elevados de glucosa en plasma, contribuyendo a la respuesta insulínica postprandial. El GLP-1 también actúa sobre las células alfa pancreáticas para reducir la secreción de glucagón y retrasar el vaciado gástrico. En los pacientes con DM2, el efecto de estas incretinas se reduce, reflejando potencialmente en una disminución de la secreción de insulina (Brunton, 2016). Por eso, terapias con inyecciones de GLP-1 resultan beneficiosas en algunos tipos de DM2.

Otra hipótesis, de cómo la obesidad podría contribuir a la DM2, podría explicarse por una disminución de la adiponectina, una citoquina que es liberada por el tejido adiposo y que disminuye la resistencia a la insulina. Los niveles de adiponectina están disminuidos en la obesidad y esto puede conducir a un aumento de la resistencia a la insulina y desarrollo de DM2. Otras sustancias producidas por los adipocitos que pueden estar relacionados con el desarrollo de resistencia a la insulina en la obesidad, incluyen el factor de necrosis tumoral (TNF- α), el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1, del inglés plasminogen activator inhibitor-1), la proteína fijadora de retinol (PFR) y la resistina. El aumento en la cantidad de ácidos grasos libres que aparece en la obesidad aumenta los niveles de TNF- α , que ejerce su efecto principal localmente y puede conducir a un aumento de la resistencia a la insulina a largo plazo (Kaplon-Cieslicka et al., 2014; Jensen et al., 2002).

Además, la obesidad y las enfermedades metabólicas incluyendo la DM2, se caracterizan por la inflamación sistémica de bajo grado, principalmente en tejido adiposo. La evidencia preclínica vincula la inflamación sistémica de bajo grado con la disfunción de las células β (Montane, Cadavez & Novials, 2014) y un funcionamiento anómalo de los adipocitos y otros tejidos periféricos (Hameed et al., 2015). El hallazgo de la inflamación directa de los islotes en la diabetes tipo 2 y su implicación en la disfunción de las células β ha puesto de manifiesto la importancia de la inflamación en las enfermedades metabólicas (Grant & Dixit, 2013). El número de macrófagos intraislotes (al igual que en tejido adiposo) incrementa en la DM2, siendo estas células la principal fuente de citoquinas proinflamatorias dentro de los islotes (Eguchi & Nagai, 2017). Los niveles circulantes de IL-1 β e IL-1Ra (del inglés, interleukin-1 receptor

antagonist) entre otras citoquinas, son elevados en la DM2 (*Park et al., 2017; Jensen et al., 2002*). Por lo que el desbalance entre citoquinas pro y antiinflamatorias puede ser clave en la patogénesis de la DM2 (*Daniele et al., 2014; Rützi et al., 2015; De Fronzo, 1999*).

Existen algunas evidencias que demuestran los beneficios de las intervenciones mediante cambios en el estilo de vida (dieta y actividad física), en la reducción en la incidencia de DM2 y la disminución de los riesgos cardiovasculares (*Padberg et al., 2014*). El ejercicio físico, se ha destacado como una de las primeras líneas de tratamiento para las enfermedades metabólicas, y entre los mecanismos para explicar sus beneficios están sus efectos antiinflamatorios. No obstante, la conexión desde el punto de vista fisiológico y terapéutico entre ejercicio físico y DM2 aún no es clara. Por esto, la búsqueda de biomarcadores séricos en la DM2 modificables por el ejercicio físico es importante y un tema de intensa actividad investigadora (*Gómez-Banoy & Mockus, 2016*).



IV. DIABETES MELLITUS Y ACTIVIDAD FÍSICA.

Es bien sabido que el ejercicio tiene beneficios para la salud. La práctica de actividad física (AF) en personas con diabetes mellitus, teóricamente, ofrece las mismas ventajas que sobre la población general (*Calvo & Gómez, 2013*) y además, ciertas ventajas en cuanto al control metabólico de la enfermedad, como la mejora de los niveles de glucemia plasmática y el aumento de la acción o sensibilidad a la insulina sobre los tejidos periféricos. Además, hay que añadir beneficios derivados de la movilización de los depósitos de glucógeno muscular y hepático, con un incremento paralelo del consumo de glucosa por parte del músculo esquelético, y al incremento en la oxidación de lípidos (*Carral San Laureano et al., 2010*).

En los pacientes con diabetes mellitus tipo 2, la mejora de la sensibilidad periférica a la insulina derivada de la práctica de ejercicio físico, juega un papel clave en la disminución de la glucemia plasmática, por lo que es lógico suponer que la práctica de actividad física regular (AFR) pueda redundar en una mejora del control glucémico a largo plazo, evidenciado mediante la reducción significativa de los niveles de HbA1c (*Carral San Laureano et al., 2010*).

En los pacientes con diabetes mellitus tipo 1, los beneficios del ejercicio sobre la enfermedad son menos evidentes, pero muchos estudios han mostrado también, una disminución de la HbA1c y de la glucemia plasmática postejercicio (*Ruzic, Sporis & Matkovic, 2007; Salem et al., 2010; Adamo, 2016*).

El ejercicio proporciona a los pacientes con diabetes otras ventajas como la disminución de la respuesta glucémica tras la comida y la reducción de las necesidades de insulina diaria, que mejoran la calidad de vida del paciente. Además, diferentes estudios han puesto en evidencia que las mejoras en el control glucémico que favorece la actividad física, pueden suponer una potencial mejoría en el desarrollo y progresión de las complicaciones crónicas derivadas de la enfermedad (*Riddell & Iscoe, 2006*).

Las complicaciones microvasculares como la retinopatía diabética y la nefropatía están fuertemente influenciadas por el control glucémico y suponen un grave problema para el paciente con DM1 (*Carral San Laureano et al., 2010*). Por otro lado, la enfermedad cardiovascular (CVD, del inglés cardiovascular disease) tiende a presentarse tanto en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 como tipo 2. La prevención de estas puede ser el mayor beneficio derivado de la actividad física regular (AFR) (*Carral San Laureano et al., 2010; Miculis et al., 2010; Church, 2011; Galassetti & Riddell, 2013*). Además, mejora significativamente el perfil de lípidos, presión sanguínea y composición corporal (todos los cuales son clásicos factores de riesgo en la CVD).

Por otro lado, el ejercicio está relacionado con hipoglucemias tardías, sobretodo en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 y cambios hormonales durante la pubertad, en los que el control de la glucosa es difícil. Este es el caso de niños y adolescentes. El ejercicio físico, induce un incremento del flujo sanguíneo muscular y del transporte de glucosa al interior celular que persiste hasta horas después de haber finalizado la actividad. Una sustitución de carbohidratos adecuada antes, durante y después del ejercicio y la reducción de la dosis preprandial de insulina de acción rápida son los principales aliados para evitar episodios de hipoglucemia severa entre los niños y los adolescentes diabéticos. Para ello, los pacientes deben realizar sesiones formativas en hospitales, con la idea de conocer la glucemia ideal particular para afrontar determinados volúmenes e intensidades de entrenamientos, así como los alimentos a consumir antes, durante y después del ejercicio. En la mayoría de los casos, un manejo inadecuado de la insulina inyectable y de los suplementos azucarados suele ser la causa principal de las hipoglucemias (*Miculis et al., 2010*).

El tipo, duración e intensidad del entrenamiento también debe considerarse cuando se planifica el reemplazo de hidratos de carbono y la reducción de la dosis de insulina (*Admon et al., 2005*). En cuanto al tipo de ejercicio físico, es necesario diferenciar entre actividad física aeróbica y anaeróbica ya que tienen diferentes efectos sobre la concentración de glucosa en sangre. El ejercicio aeróbico, causa una disminución de los niveles de glucosa durante y después del ejercicio, mientras que la actividad anaeróbica aumenta los niveles de glucosa mientras se realiza el ejercicio (*Riddell & Iscoe, 2006*). Estos aspectos tienen que ser considerados por el paciente

diabético cuando vaya a realizar su actividad física. Algunos estudios parecen indicar que tanto para pacientes con diabetes mellitus tipo 1 como para los de tipo 2, la actividad que mayor efecto tiene sobre la disminución de la HbA1c y la resistencia a la insulina es la actividad aeróbica, pero que si ésta se combina con ejercicio de fuerza puede tener efectos adicionales sobre estas dos variables (*Davidson et al., 2009; Sigal et al. 2007; Church, 2010; D'hooge, 2011; Adamo, 2016; Carral et al., 2013*). Investigaciones recientes sugieren, que los ejercicios de tipo interválico, que supongan un gasto energético similar a un ejercicio aeróbico, parecen tener igualmente un efecto positivo en el control de la diabetes tipo 2 (*Mitranun et al., 2014*). Todos estos estudios, parecen sugerir que el gasto calórico durante la práctica de ejercicio es un factor determinante en el control de la enfermedad.

En cuanto a la duración, la práctica de ejercicio estructurado de más de 150 minutos por semana se asocia con una mayor disminución de la HbA1c que la de menos de 150 minutos por semana. (*Umpierre et al., 2011*). No obstante, numerosas asociaciones científicas deportivas a nivel mundial, como el Colegio Americano de Medicina Deportiva (ACSM, del inglés American College of Sports Medicine), recomiendan en su página WEB (www.acsm.org) la práctica de al menos cinco sesiones semanales de una hora de duración para una óptima prevención de la obesidad y patologías relacionadas, como la DM2. Por último, respecto a la intensidad a la que debe realizarse la actividad, se recomienda una actividad de moderada a vigorosa (40-85% de consumo máximo de oxígeno (VO₂max) o 55-90% de frecuencia cardiaca máxima) (*Hansen et al., 2009*), con 5 o 10min previos de menor intensidad aeróbica, como un calentamiento y 5 a 10min de estiramientos después de cada actividad (*Miculis et al., 2010; Romeo, Wärnberg & Pozo, 2010*).

Por otro lado, estudios previos en seres humanos con diabetes mellitus tipo 1 y en ratones diabéticos no obesos (NOD) han investigado el potencial inmunomodulador beneficioso de la actividad física aeróbica de intensidad moderada/alta. Realizar un alto volumen de ejercicio aeróbico puede regular favorablemente la autoinmunidad en la diabetes (*Adamo, 2016; West et al., 2015*). Además, en el caso de los ratones se ha visto que el ejercicio incrementa los contenidos de insulina de los islotes pancreáticos y mejora la secreción basal de insulina (*Huang et al., 2011*).

En este contexto, la diabetes mellitus tipo 1 se caracteriza por una inflamación elevada y las citoquinas proinflamatorias están íntimamente relacionadas con la insulinitis destructiva al amplificar la reacción autoinmune, la toxicidad directa a las células β y la sensibilización de los islotes a la apoptosis (*Kaminitz, Ash & Askenasy, 2016*). Tras la destrucción de la célula β y el inicio de la enfermedad entre el 40-10% de célula β residual persiste. Esta función residual es insuficiente para generar la insulina requerida para el control metabólico, pero se asocia con importantes beneficios como se ha mencionado anteriormente. El poder inmunoregulador del ejercicio en este periodo puede ser de especial interés por las ventajas que podría suponer para el paciente con diabetes mellitus tipo 1 un perfil de citoquinas antiinflamatorias o la supresión de citoquinas proinflamatorias IL-1 IL-2, IL-6, TNF- α , TNF- β , IFN- γ , que podrían retrasar o reducir la incidencia de DM1 (*Singh, 2011*). Algunos estudios con animales han mostrado que el ejercicio tiene efectos en la preservación de la célula β aunque el mecanismo por el cual ejerce este efecto no está claro, aunque se han señalado descensos en la apoptosis de la célula β (*Choi, Jang & Park, 2005; Park, et al., 2007*).

En pacientes diabéticos de tipo 2, el efecto que el ejercicio puede tener sobre la enfermedad está más estudiado. La actividad física regular puede mejorar la función de las células β y la inflamación crónica sistémica que acompaña a la enfermedad, aportando grandes beneficios al paciente diabético tipo 2 (*Dela et al., 2004*). El hallazgo de la inflamación directa de los islotes en la diabetes tipo 2 y su implicación en la disfunción de las células β ha puesto de manifiesto la importancia de la inflamación también en esta patología (*Eguchi & Nagai, 2017; Karstoft & Pedersen, 2015*).

Como se decía, en la diabetes existe una inflamación crónica, que se refleja en elevaciones sistémicas de dos a cuatro veces en los niveles de algunas citoquinas, tales como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-1ra y de CRP (*Pedersen, 2006*). La determinación de las concentraciones de proteína C reactiva (CRP, del inglés C-reactive protein) en sangre es una medida fácil, precisa y bastante económica. Se trata de un reactivo de fase aguda y un marcador muy sensible de la inflamación (*Wärnberg et al., 2010*). Parece ser que el ejercicio es capaz de reducir la CRP tanto de forma directa, mediante la reducción de la producción de citoquinas en el tejido adiposo y muscular, e indirecta por aumento de la

sensibilidad a la insulina y mejora de la función endotelial y reducción del peso corporal (*Kasapis & Thompson, 2005*).

El papel modulador que el ejercicio tiene sobre éstas es por tanto importante, ya que la producción de determinadas citoquinas se ha sugerido como consecuencia de determinados procesos patológicos. Las citoquinas actuarían no sólo como señales de la función inmune, también son importantes reguladoras de sistemas endocrinos, el metabolismo, la coagulación sistémica y la función cerebral. El músculo esquelético actuaría como órgano endocrino modificando la producción de citoquinas en órganos y tejidos, y este hecho proporcionaría una explicación molecular de porqué el ejercicio media, algunos efectos beneficiosos para la salud relacionados con las enfermedades crónicas (*Panagiotakos et al. 2004*).

El músculo esquelético expresa varias citoquinas, tales como: TNF- α , IL-6, IL-8, IL-16 y IFN- γ . La citoquina que primero aparece tras el ejercicio es la IL-6. Esta citoquina aumenta de forma exponencial con el ejercicio y desaparece rápidamente (a los 30 minutos). Su secreción se relaciona con la intensidad del ejercicio, la duración, la masa de músculo reclutada y la propia capacidad de resistencia (*Wärnberg et al., 2010*). Se ha comprobado que IL-6 induce la oxidación de grasas y la lipólisis sin causar triacilglicerolemia cuando se administra en dosis que imitan los niveles sistémicos durante el ejercicio. IL-6 también interviene en la homeostasis de la glucosa, aumentando la producción de glucosa y el aclaramiento metabólico (*Febbraio et al., 2003*). Además, estimula la producción de otras citoquinas antiinflamatorias como IL-1ra e IL-10 mientras que reduce la expresión de citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-1 β , lo que sugiere que el ejercicio provoca un ambiente antiinflamatorio que favorecería la supervivencia de los islotes pancreáticos (*Christensen et al., 2015; Codella et al., 2015; Brandt & Pedersen, 2010*) y en particular, la función de la célula β (*Dauriz et al., 2015; Paula et al., 2015*).

En el paciente diabético tipo 1 se pueden observar niveles aumentados de TNF- α . Diferentes estudios han mostrado el poder citotóxico que TNF- α tiene sobre la célula β . En los pacientes diabéticos tipo 2, TNF- α induce resistencia a la insulina de forma directa e indirectamente al inducir la lipólisis en los adipocitos con aumento de la liberación de ácidos grasos libres (lipotoxicidad). El ejercicio parece inhibir la

producción de esta citoquina (*Hotamisligil, Shargill & Spiegelman, 1993; Plomgaard, 2005*). Por otro lado, la IL-10 (antiinflamatoria) también inhibe la producción de TNF- α , IL-1 α , IL-1 β y la activación de macrófagos (*Wärnberg et al., 2010*).

A largo plazo el ejercicio también parece atenuar la producción de citoquinas como IL-1 α , IFN- γ y aumentar otras citoquinas antiinflamatorias como IL-4. Además, es probable que otros mediadores contribuyan a estos efectos antiinflamatorios durante el ejercicio, por ejemplo la adrenalina, que parece atenuar la producción de TNF- α y mejorar la producción de IL-10 (*Bruunsgaard, 2005*).

La actividad física también puede reducir la inflamación, mejorando la función endotelial por disminuir los marcadores inflamatorios periféricos relacionados con la disfunción endotelial y por preservar la disponibilidad de óxido nítrico, esencial para la vasodilatación. El ejercicio, también aumenta las defensas antioxidantes y reduce la oxidación de lipoproteínas de baja densidad que, a su vez, ayudan a impedir la lesión endotelial y la inflamación.

En resumen, fomentar y proporcionar oportunidades para la participación en actividades físicas desde la primera infancia puede fomentar el mantenimiento de un activo estilo de vida en la edad adulta con todos los beneficios que esto conlleva para la salud. Si la enfermedad ya se ha declarado, como el caso de la diabetes, el ejercicio podría ayudar a un mejor control metabólico y posiblemente al mantenimiento de un estado más antiinflamatorio. Los potenciales beneficios de esto, han centrado el interés del presente trabajo de tesis.

V. NUTRICIÓN EN EL ESPACIO

Para finalizar esta sección, habría que dar algunas pinceladas sobre aspectos nutricionales aplicados a las situaciones que acontecen en el espacio exterior. Esto es debido, a que una de las intervenciones realizadas en la presente memoria de tesis se ha llevado a cabo con el primer astronauta diabético de la historia de la humanidad. En este contexto, las misiones espaciales requieren una preparación física particular por parte de los astronautas y atender a unas pautas nutricionales muy especiales, que se vuelven más desafiantes cuando el sujeto en cuestión es diabético tipo 1. A continuación se detallan varias situaciones límite que un astronauta debe soportar y que van a condicionar su estado nutricional e ingesta.



V.1. Momento del despegue.

El despegue para alcanzar el espacio exterior exige a los astronautas soportar aceleraciones que multiplican por seis la fuerza gravitacional del planeta. Los astronautas se entrenan en centrifugadoras y utilizan trajes antigraavedad con la idea de minimizar este problema, pero aun así, el despegue es uno de los momentos más críticos de una misión espacial.

El despegue se hace en total inmovilidad y en posición supina. Esto ocasiona que entre 3-6 horas tras el despegue, se produzca una redistribución de unos 2 litros de plasma entre la cabeza y el tren superior. Dado que es un momento crítico y de máximo riesgo, se produce una descompensación en la ingesta de líquidos, principalmente debida a la máxima concentración en el pilotaje, que disminuye la sensación de sed. La ingesta insuficiente de líquidos también viene acompañada de pérdidas de electrolitos. Esta situación es reversible, en cuanto la misión ha alcanzado el espacio exterior y comienza su estancia, ya que en ese momento los tripulantes comienzan a beber agua de forma regular. Los primeros días de estancia en el espacio, algunos astronautas experimentan cierto aturdimiento, denominado “mareo espacial”. Esto se debe a una redistribución del plasma en el tren inferior, que se agudiza con la ingravidez presente en la estación espacial. También se corrige con el paso del tiempo (*Johnston & Dietlein, 1977*).

V.2. Exposición a los rayos cósmicos.

Los rayos cósmicos provienen en su mayor parte de las erupciones solares y de otras galaxias activas. Se trata de protones y partículas alfa en su mayoría. Estas partículas, son desviadas por el campo magnético terrestre y no afectan a los seres vivos en la superficie del planeta. Sin embargo, una nave en el espacio exterior puede recibir una alta intensidad de rayos cósmicos, ya que no se encuentra protegida por la atmósfera terrestre.

Los rayos cósmicos son muy mutágenos. Cuando los astronautas se encuentran fuera de la atmósfera, sufren una elevada exposición a estas partículas, ya que el fuselaje de las naves espaciales no logra absorber la elevada energía de estos rayos. Por esta razón, el cáncer es una de las patologías más prevalentes en los astronautas que han realizado largas misiones espaciales. Para evitar estos problemas se puede limitar la cantidad de exposición a la radiación, que suele ser de 25 rem anuales para los astronautas que trabajan en la NASA. Para tener algunos datos de referencia, un trabajador de una central nuclear debe exponerse un máximo de 5 rem al año (con un máximo de 250 rem para toda una vida), una misión a la luna supone una exposición de 7 rem, y una hipotética misión a Marte supondría unos 100 rem de exposición. A nivel nutricional, lo único que se puede hacer es realizar estrategias preventivas, consumiendo una dieta equilibrada y rica en antioxidantes. Una solución sería aumentar el grosor del fuselaje, pero supondría un peso extra para el despegue. Otra posibilidad sería probar nuevos materiales y sistemas. En cualquier caso, es un tema preocupante, que requiere investigación adicional (*Harding, 1989*).

V.3. Efecto de la ingravidez en la composición corporal.

El esqueleto humano sería el compartimento corporal más influenciado por la gravedad del planeta, ya que ésta es esencial para afianzar el proceso de calcificación de los huesos. Sin embargo, la experiencia acumulada en las distintas misiones espaciales indica que el compartimento muscular también se ve afectado por las estancias prolongadas en ingravidez. Por esta razón, cuando los astronautas regresan de una misión espacial de varios días, se evita que se pongan de pie para evitar fracturas óseas, realizándose protocolos de readaptación para recuperar la masa muscular y otros parámetros alterados durante la misión.

Para averiguar las causas de las variaciones en la composición corporal, se analizaron algunos datos antropométricos y la composición de los desechos corporales (orina y heces) de astronautas de diversas misiones de los programas, Géminis (1962-1968), Apolo (1966-1975) y del laboratorio orbital Skylab (1973-1979). Las muestras se recogieron en contenedores fecales con un desinfectante, para ser luego congeladas y desecadas. Posteriormente se realizaron los análisis en la Tierra, permitiendo establecer las causas de las pérdidas de masa muscular y ósea, junto con otros parámetros de composición corporal que también serían relevantes, como el agua corporal y la masa grasa (*Lachance, 1994*).

La primera variable a evaluar es el peso corporal. La pérdida de peso de los tripulantes ha sido una constante en las misiones americanas y rusas desde su origen. Por ejemplo, en las distintas misiones Apolo, las pérdidas de peso han rondado 2-6% para una media de unos 10 días de misión. Las pérdidas de peso en las misiones Skylab han rondado valores muy similares, teniendo duraciones mayores (28-84 días). La causa de estas pérdidas de peso puede residir en parte en las pérdidas de apetito (anorexia) que experimentan los astronautas. La sensación de falta de apetito parece ocurrir principalmente los primeros días de la misión, que es cuando los tripulantes experimentan una mayor tensión y realizan un mayor volumen de trabajo. Así para una ingesta programada de unas 2550kcal (media de tres misiones Géminis), cada

astronauta consumió realmente 1650kcal y gastó una media de energía de 2200kcal (determinada por el CO₂ recogido en los filtros de litio de la nave). Se ve claramente una deficiencia entre el gasto y el consumo de un 25% que podría ser la causa responsable de la pérdida de peso. Estas deficiencias se acentuaban más en las misiones que duraban pocos días, ya que en ellas se realizaban más trabajos en menos tiempo (*Harding, 1989*).

La segunda variable importante es el contenido en agua corporal, que forma parte de numerosos sistemas y vísceras, como el músculo esquelético. Los datos de las distintas misiones han constatado que las mayores pérdidas de agua corporal ocurren los primeros días de misión, y sobre todo el día del despegue, como ya se ha comentado. Debido a la ingravidez y a una menor percepción de movimiento, los tripulantes tienen la tendencia a ingerir menos agua, quizás por una menor sensación de sed. Las pérdidas medias al finalizar las misiones suelen rondar los 0,5 litros (*Johnston & Dietlein, 1977*).

Otro compartimento clave en la composición corporal de los astronautas es la masa grasa. La grasa es la reserva energética del organismo y es utilizada por éste en caso de deficiencia energética. Ya se ha mencionado, que en las misiones de corta duración, los astronautas experimentaron significativas reducciones en la ingesta energética por la falta de apetito. Fue en estas misiones, donde las reservas de grasa de los astronautas compensaron la deficiencia en la ingesta energética. Ello llevó a pérdidas en la masa grasa cercanas al 50%. Esto obligó a replantear las cantidades a ingerir de grasa en los aprovisionamientos para futuras misiones. Así en la misión Skylab de 84 días, se incrementó el consumo de alimentos grasos, lo que evitó la pérdida de masa grasa e incluso la aumentó un 20% (*Johnston & Dietlein, 1977*).

El compartimento muscular es uno de los más afectados en condiciones de ingravidez. A la pérdida de agua se une, además, la pérdida de proteínas. Estas pérdidas se determinaron midiendo los niveles de K⁺, para el agua intramuscular, y de 3-metil-histidina, un aminoácido marcador de proteínas musculares. En la pérdida de masa muscular parecen converger varios factores, como son un menor gasto postural debido a la ingravidez, la realización de actividades poco usuales con baja demanda energética (atornillar, ajustar, recambiar componentes) y la antes mencionada falta de apetito. Las mayores pérdidas ocurren durante los 30 primeros días y se localizan principalmente en

el tren superior. Para evitar esto, las misiones espaciales actuales cuentan con aparatos especiales para hacer ejercicio. Para simular una situación de gravedad, se utilizan arneses y cintas elásticas que imitarían una situación de gravitacional actuando a modo de anclajes. Gracias a ejercicios programados durante 1-2 horas se han podido reducir de forma significativa, pero no del todo, las pérdidas de masa muscular en los astronautas. Además de la pérdida de masa muscular en ingravidez, aparece atrofia muscular. La pérdida de fuerza muscular se estimó entre 20-25% en las distintas misiones espaciales, afectando principalmente al tren superior. El problema es que este proceso también afecta al músculo cardíaco produciendo taquicardia y arritmias. En estos casos, los astronautas indicaron un mayor grado de fatiga. Al regreso a la Tierra, deben de realizar ejercicios de recuperación, en los que se invierten varias semanas en alcanzar los porcentajes iniciales (*Lachance, 1994*).

Finalmente, el compartimento más afectado por la ingravidez es la masa ósea. A diferencia de la masa muscular, la pérdida de masa ósea en el espacio no se detiene con los planes de ejercicios que se realizan para mantener la masa muscular en las misiones espaciales. Además, la pérdida de masa ósea es proporcional al tiempo de permanencia en el espacio. Así datos de la misión Apolo (7 días de duración media) conllevaron pérdidas de 0,5%. En la misión Skylab (84 días de duración media) ya se indicaron pérdidas de masa ósea cercanas al 2,5%. Finalmente, la misión Salyut (175 días de duración media) se encontraron pérdidas del 8% de masa ósea. La recuperación de la masa ósea se realiza al regresar a Tierra y puede durar varios años (hasta 5), siendo incompleta en muchos casos. Una de las causas de este tipo de pérdidas es el cambio en la concentración de algunas hormonas. Aunque, los niveles de paratohormona, calcitonina, 25-hidroxi-colecalciferol y de calcio plasmático no cambian en ingravidez. Sin embargo, se detectan incrementos en los niveles de cortisol, insulina y hormona de crecimiento. Este desequilibrio hormonal, parece que favorece una mayor presencia de calcio en orina y en heces, produciendo una significativa descalcificación ósea. Los datos observados de pérdida ósea no difieren mucho de los datos provenientes de estudios con sujetos inmovilizados en tierra como causa de alguna patología. En estos

individuos se pueden realizar ejercicios de deambulación supina y administrar suplementos de calcio y fósforo. Sin embargo, las estrategias de deambulación no pueden ser trasladadas a situaciones de ingravidez, haciendo menos eficientes a los suplementos. Esto planteará retos importantes para las largas misiones espaciales, ya que en ellas se podría producir una severa desmineralización ósea (*Davis et al., 2008*).



V.4. Provisión de oxígeno, agua y nutrientes en el espacio exterior.

El reto más desafiante, sobre todo en misiones de muy larga duración, es la ausencia total de oxígeno, agua y nutrientes en el espacio exterior. Todos estos recursos no solo son esenciales para la vida humana, también lo son para casi cualquier forma de vida del planeta Tierra. Esto obliga a transportar alimentos y agua al espacio exterior, lo que consume mucha energía. El agua proporciona oxígeno para el interior de la nave por un proceso electrolítico. Esto obliga a reciclar toda el agua, incluyendo el sudor, el vapor de agua del aliento de los astronautas e incluso de los residuos.

Con respecto a los alimentos, un astronauta requiere un poco menos de 2 kg de comida diarios, de los cuales los envases representan un 10% del peso. La comida de cada astronauta va en raciones individuales. En las antiguas misiones, tan solo se disponía de unos 20 alimentos empaquetados en tubos similares a los de dentífrico. Hoy en día, los astronautas pueden escoger entre más de 70 alimentos y unas 20 bebidas diferentes. La mitad son liofilizadas para ser rehidratadas en la propia estación espacial. La otra mitad son rehidratables en boca, es decir cuando se consumen. Por ello, mantienen una cierta cantidad de agua que les da una textura más suave. Alimentos como las carnes y pastas van comprimidas y esterilizadas (para evitar la presencia de microorganismos) dentro de envases especiales. Algunos alimentos pueden llevarse directamente a la estación espacial sin ningún tipo de procesamiento, como por ejemplo los frutos secos o la fruta desecada. Es importante que el alimento no se desmenuce, ya que partículas del mismo podrían colarse por los conductos respiratorios de los astronautas produciendo obstrucciones pulmonares. Para evitar estos problemas, los alimentos se reconstituyen hasta conseguir texturas tipo gel que sólo pueden desmenuzarse en boca. Por eso, productos como el pan no son aconsejables, utilizándose tortitas de avena en su lugar (*Davis et al., 2008*).

A pesar de esto, no todo tipo de alimentos está aconsejado en una misión espacial. Por ejemplo, los alimentos ricos en fibra insoluble no suelen encontrarse en el menú de los astronautas, ya que estos generan muchos residuos fecales. Los lácteos, por ser difíciles de digerir en situaciones extremas, tampoco son incorporados en los menús de los astronautas. Finalmente, los líquidos son presentados con varios sabores para evitar la monotonía. También hay que tener la precaución de que cuando se manipulen no se produzcan muchas gotas que al igual que las migas, podrían colarse por las vías respiratorias de los tripulantes. Por eso, la rehidratación de los alimentos se realiza conectando la válvula del paquete con un dispensador de agua especial. Finalmente, no existen saleros ni azucareros, ya que tanto la sal como el azúcar podrían esparcirse por la estancia de la nave y causar daños en los aparatos. Existen dispensadores especiales cerrados que permiten administrar de forma segura estos productos (*Smith et al., 2012*).

El cocinado es otro desafío, ya que no existe la transmisión de calor por convección. El calentamiento de los alimentos se realiza en los mismos envases, para evitar que los residuos floten en la estación y ocasionen los problemas por aspiración antes descritos. El calor es necesario además para garantizarla seguridad microbiológica de los alimentos, aunque todos son esterilizados por irradiación en la Tierra. Las latas, los tubos y las bolsas planas son de aluminio y permiten calentar directamente el alimento sin necesidad de abrir el envase. Las cocinas son de tipo maletín, es decir, tienen huecos que encajan perfectamente con los recipientes sin abrir, permitiendo su calentamiento directo (*Smith et al., 2012*). Finalmente, los micronutrientes son una preocupación adicional, ya que muchos de ellos se pierden o alteran en los envases. Para evitar subcarencias, estos se administran en forma de píldoras o pastillas. Su consumo es pautado por los nutricionistas desde la Tierra (*Davis et al., 2008*).

No existe una norma dietética rígida en las misiones espaciales. En un principio, los astronautas prueban en la Tierra los alimentos que van a llevar durante la misión. También reciben consejos nutricionales y de seguridad alimentaria. En la estación espacial, los consumen de forma libre, aunque deben de registrar sus ingestas. El recordatorio es enviado a la Tierra y los médicos analizan si la ingesta ha sido correcta, alertando con un mensaje en caso de desviaciones. La dieta de un astronauta tiene un contenido calórico diario de unas 3000kcal. La dieta podría definirse como ligeramente

rica en proteínas para compensar las pérdidas de masa muscular mencionadas. Su composición en macronutrientes es: 50% de hidratos de carbono, 33% de lípidos y 17% de proteínas. Se realizan 3-4 tomas al día. Los micronutrientes son administrados en forma de píldoras, y algunos como el calcio se añaden a la bebida liofilizada a razón de unos 900 mg diarios (*Smith et al., 2012*).



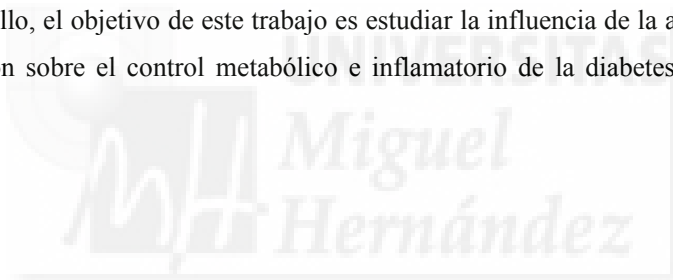


OBJETIVOS

I. OBJETIVO GENERAL.

Se conoce desde hace tiempo el efecto beneficioso que ejerce la nutrición y el ejercicio sobre el control clínico de la enfermedad diabética. Recientemente, se ha descubierto que tanto en la diabetes tipo 1, como en la tipo 2, existe un componente inflamatorio que hace muy difícil cualquier tipo de tratamiento farmacológico de estas patologías. Se desconoce si la dieta combinada con el ejercicio, es decir, un estilo de vida más saludable, podría ayudar a disminuir este componente inflamatorio, evitando la progresión de la enfermedad diabética y mejorando la calidad de vida de los pacientes.

Por ello, el objetivo de este trabajo es estudiar la influencia de la actividad física y la nutrición sobre el control metabólico e inflamatorio de la diabetes, tanto tipo 1, como tipo 2.



II. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- Evaluar los efectos que el ejercicio y la dieta tienen sobre el estado metabólico y el manejo de la diabetes tipo 1 en debutantes de esta enfermedad.
- Evaluar los efectos que el ejercicio y la dieta tienen sobre la respuesta inflamatoria y autoinmune en diabéticos tipo 1 mediante el análisis de citoquinas y anticuerpos.
- Evaluar los efectos que el ejercicio y la dieta tienen sobre el estado metabólico y el control de peso en diabéticos tipo 2 resistentes a la insulina.
- Evaluar los efectos que el ejercicio y la dieta tienen sobre la respuesta inflamatoria en diabéticos tipo 2.



MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS.

Con el objetivo de estudiar cómo la dieta y la actividad física podían controlar los desajustes metabólicos e inflamatorios en la diabetes (tipo 1 y tipo 2), se desarrollaron cinco intervenciones.

Estas cinco intervenciones, se describen de forma independiente tanto en el apartado de materiales y métodos, como en el de resultados y discusión.



I. INTERVENCIÓN 1.

El objetivo de esta primera intervención es el control de parámetros metabólicos e inflamatorios a través de la dieta y el ejercicio en diabéticos tipo 1.

I.1. Sujetos de estudio. Procedimiento y diseño del estudio.

La primera intervención se realizó a 19 sujetos de 26 seleccionados, debutantes en diabetes tipo 1, durante un periodo de dos años en colaboración con el Servicio de Endocrinología del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (España) (<https://sites.google.com/a/goumh.umh.es/clinicaltrials/anuncios>).

El Comité de Ética Autonómico aprobó esta investigación, que cumplió tanto con los requisitos locales como con los establecidos en la Declaración de Helsinki para la investigación con seres humanos. Todos los sujetos fueron informados al inicio, en presencia de sus tutores en el caso de menores, sobre el objetivo y justificación del estudio y firmaron un consentimiento escrito.

El elemento clave del diseño del estudio (Figura 5) tuvo en cuenta que en el momento del inicio, se preguntara a los pacientes sobre sus hábitos de actividad física, de esta forma quedarían incluidos en el Grupo A (sujetos activos) o en el Grupo S (sujetos sedentarios) (ambos grupos se detallan más adelante).

El criterio para la distribución de grupos se basó en los principios del colegio Americano de Medicina Deportiva, considerando como practicante de actividad física al sujeto que realizara un ejercicio moderado-vigoroso durante 1 hora, 5 días o más a la semana. Por lo tanto, una persona menos activa o sedentaria podría ser una persona que practicara menos de 5 horas de ejercicio físico a la semana (*Jakicic et al., 2001*).

En la primera consulta, la cual tuvo lugar pocas semanas después del debut se tuvieron en cuenta otras consideraciones. Se preparó una historia clínica de cada paciente y se realizó una exploración física.

Se tomaron muestras sanguíneas de la vena antecubital por la mañana en ayuno, dichas muestras se utilizaron para determinar HbA1c (hemoglobina glucosilada), péptido C, antiGAD, citoquinas y carbonilos de las proteínas, dichos procedimientos se describen detalladamente en el apartado siguiente.

Además, pacientes y tutores ingresaron en un programa educacional del hospital con el fin de aprender sobre las necesidades dietéticas, monitorización de la glucemia e inyecciones de insulina. En cuanto a la dieta, el consumo de calorías y diseño de las comidas (Tabla 4) se adecuó al tipo de terapia insulínica y condiciones generales de cada paciente. Las dosis de insulina fueron registradas estrictamente por cada participante.

Las consultas se llevaron a cabo inicialmente de forma semanal durante el primer mes y una vez al mes para el periodo restante. En cada consulta, se preguntó a los pacientes de ambos grupos sobre el cumplimiento de la dieta, la monitorización de la glucemia, inyecciones de insulina y rendimiento durante el ejercicio (sólo al grupo A). Además, estas consultas servían para resolver las dudas que podían surgir sobre el manejo de la enfermedad y el control dietético.

Al final del primer año, se extrajo una segunda muestra sanguínea en las mismas condiciones que la primera muestra para cada individuo y se realizó la determinación de los mismos parámetros. Mensualmente se siguió realizando un seguimiento del paciente. Al final de este periodo el estudio fue considerado terminado y la última extracción sanguínea fue realizada con el fin de medir los parámetros mencionados anteriormente.

Todas las muestras de sangre se colocaron en tubos y fueron analizadas por un laboratorio de análisis clínico externo siguiendo los protocolos establecidos. Posteriormente, la sangre sobrante se transportó en frío a los laboratorios de la Universidad Miguel Hernández (UMH) para realizar el resto de las determinaciones.

1.1.1 Grupo Activo.

El grupo A (n=8) incluyó pacientes que solían llevar a cabo una actividad física activa regular antes del comienzo de la enfermedad y que continuaron practicando dicha actividad posteriormente con la misma regularidad.

La edad media del grupo A fue $21,9 \pm 4,2$ años e incluyó 8 individuos, 5 hombres y 3 mujeres diagnosticados en el momento del inicio por hiperglucemia + cetoacidosis (n=4), cetoacidosis (n=2) e hiperglucemia (n=2).

En cuanto al tipo de entrenamiento, la mayoría de los individuos del grupo A declararon practicar regularmente rutinas interválicas del tipo, deportes de equipo: baloncesto (n=1) y fútbol (n=6). Sólo un individuo declaró realizar ejercicio aeróbico (recorrer largas distancias corriendo y nadando).

1.1.2 Grupo sedentario.

El grupo S (n=11) incluyó a individuos que no realizaban ninguna actividad física en el momento del inicio, continuando con los mismos hábitos durante el periodo observacional posterior. Cuatro individuos de este grupo empezaron a practicar ejercicio moderado un máximo de 3 días a la semana y de forma esporádica durante el periodo observacional.

La media de edad del grupo S fue $23,3 \pm 2,2$ años e incluyó 11 individuos, 7 hombres y 4 mujeres diagnosticadas en el momento del inicio de la enfermedad por hiperglucemia + cetoacidosis (n=3), cetoacidosis (n=7) e hiperglucemia (n=1).

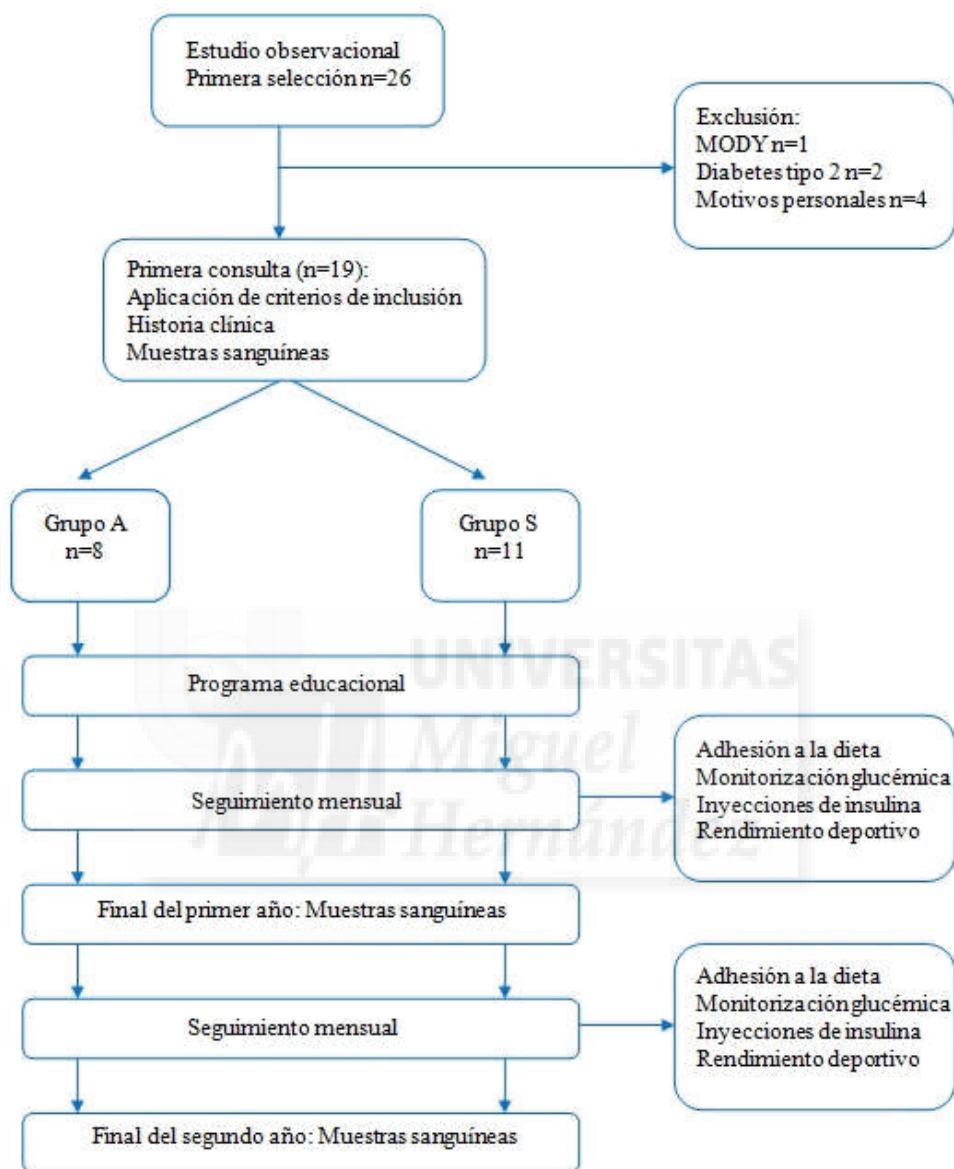


Figura 5. Diagrama de flujo para el diseño del estudio.

Abreviaturas: MODY, del inglés Maturity Onset Diabetes of the Young (diabetes de la edad madura que se presenta en el joven).

Tabla 4. Ejemplo, dieta de 2500kcal para sujetos diabéticos.

Dieta de 2500kcal	
Desayuno	Leche desnatada sola/ café: 250ml Zumo natural: 250ml Pan integral: 60g Aceite de oliva: 15g
Almuerzo	Pan integral: 30g Fiambre de pavo: 50g Aceite: 10g Manzana: 150g Té: 250ml
Comida	Ensalada verde: -Lechuga: 200g -Tomate: 100g -Pepino: 60g Ternera: 150g Patata y zanahoria hervida: 250g
Merienda	Yogurt desnatado: 125g Galletas integrales tipo María: 40g
Cena	Sopa de fideos: 250ml Tortilla con atún: -Huevo: 120g -Atún al natural en conserva: 30g Espinacas: 150g Pan integral: 20g
Recena	Leche desnatada: 250ml

I.2. Determinaciones de hemoglobina glucosilada circulante (HbA1c).

La hemoglobina glucosilada fue determinada mediante inmunoanálisis por un laboratorio acreditado. De acuerdo con la definición de la *International Federation of Clinical Chemistry* (IFCC), la HbA1c es un término genérico que se refiere a un grupo de sustancias que se forman a partir de reacciones bioquímicas entre la hemoglobina A (HbA) y algunos azúcares presentes en la circulación sanguínea, en el caso de la HbA1c, glucosa (*Jeppsson et al., 2002*).

Los métodos inmunológicos para la determinación de la HbA1c, utilizan anticuerpos contra una secuencia de aminoácidos que varían de 3 a 8 de la fracción N-terminal de la hemoglobina glucosilada. Tienen como ventaja el que son específicos contra la HbA1c y pueden ser incorporados a los autoanalizadores de química clínica ya sea por métodos de inmunturbimetría o de inmunoanálisis enzimático (*Wilson et al., 1993; John, Edwards & Price, 1994*). Para ello, los glóbulos rojos son hemolizados para liberar la hemoglobina. Los anticuerpos desarrollados en ratón, que reconocen la secuencia glucosilada humana se unen a la hemoglobina formando micropartículas anticuerpo-HbA1c. Estas micropartículas son reconocidas por un segundo anticuerpo (inmunoglobulina G (IgG)), que desarrolla turbidez en el tubo de ensayo. La turbidez desarrollada se mide en un turbidímetro, siendo directamente proporcional al % de HbA1c.

I.3. Determinación de péptido C.

El péptido C humano fue determinado mediante radioinmunoensayo por un laboratorio acreditado usando el kit coat a count. Se trata de un péptido de 31 aminoácidos que tiene una masa molecular de, aproximadamente, 3000 daltons. El péptido C, forma parte inicialmente de la molécula de pre-pro-insulina, pero es eliminado por cortes proteolíticos cuando la insulina progresa a su forma madura. Por esta razón, el péptido C y la insulina se cosecretan en cantidades equimolares cuando la insulina es producida por el páncreas endocrino. Las formas comerciales de insulina inyectable no tienen péptido C. Por todo ello, el inmunoensayo de péptido C permite la cuantificación de insulina secretada por el sujeto, distinguiendo la insulina endógena de la inyectada.

El procedimiento consiste en un kit que contiene 100 tubos recubiertos de anticuerpos contrainsulina, un set de calibradores para establecer una recta patrón, compuesto por 7 frascos (A-G) con concentraciones crecientes de insulina y un vial de insulina radioactiva marcada con I^{125} (Yodo). La finalidad del radioinmunoensayo es la competición durante un periodo de tiempo fijado, entre la insulina de las muestras del paciente y la insulina radioactiva por unirse a los sitios específicos de los anticuerpos inmovilizados en las paredes del tubo. Una vez transcurrido el tiempo establecido, se finaliza esta reacción mediante la decantación del sobrenadante y se procede a la lectura de los tubos mediante un contador gamma (radiación que emite el I^{125}). La lectura obtenida, se convierte a través de la curva de calibración en la cantidad de insulina presente en la muestra del paciente.

I.4. Purificación de células sanguíneas. Obtención de plasma.

Para la obtención del plasma de las células sanguíneas (Figura 6) se depositó la sangre en un tubo Corning con un volumen de EDTA (ácido etilendiaminotetraacético). Posteriormente se centrifugaron las muestras a 1000xg, durante 30 min a una temperatura de 4°C. A continuación, se recogió el sobrenadante (plasma) con pipetas Pasteur. Finalmente, las muestras fueron almacenadas en tubos Eppendorf de 1,5ml a -80°C hasta ser enviadas a la Universidad Miguel Hernández de Elche para medir los parámetros pertinentes.

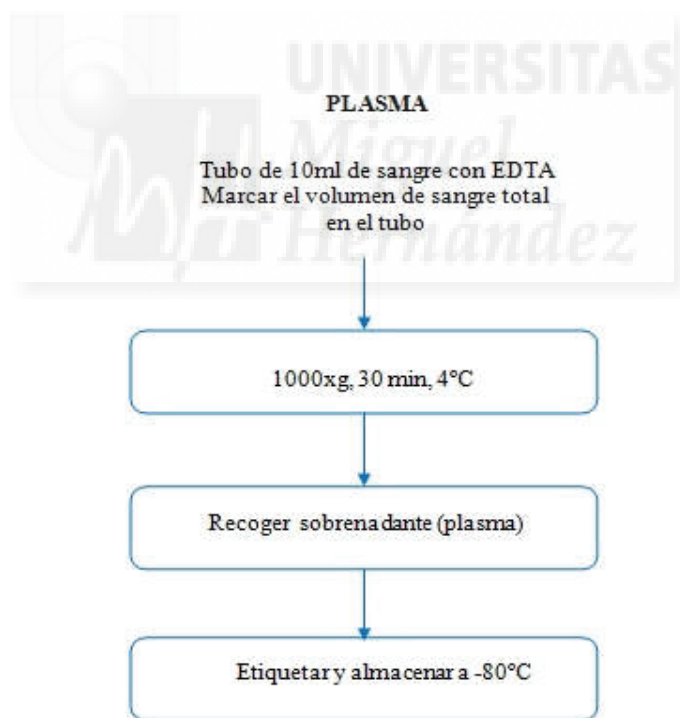


Figura 6. Diagrama de la obtención de plasma.

I.5. Determinación de carbonilos proteicos en plasma.

La determinación de los carbonilos de las proteínas en plasma se realizó mediante una adaptación del método de Levine (*Levine et al., 1994*). La cuantificación de los grupos carbonilos mediante colorimetría sirve como indicador de la oxidación de las proteínas.

El primer paso para la determinación del índice de carbonilos es la desproteinización de las muestras. A 150µl de plasma, se le agregaron 250µl de agua y 500µl de TCA (ácido tricloroacético) al 30%. Se centrifugaron las muestras a 15000xg, durante 5min y 4°C, se eliminó el sobrenadante mediante una pipeta y se guardaron las muestras 24h a -80°C hasta su determinación.

Posteriormente, el precipitado se resuspendió en 0,5ml de DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) 10 mM, disuelto en HCl (ácido clorhídrico) 2M y se incubó a 37°C durante 60 min. Una vez concluido el tiempo, las muestras fueron precipitadas con TCA al 20% y centrifugadas a 1000xg durante 10min a 4°C. En este momento se eliminó el sobrenadante con una pipeta Pasteur y el precipitado se lavó tres veces con etanol:etil acetato (1:1) para eliminar el exceso de DNPH.

Al precipitado resultante se le añadió 1ml, 6M de guanidina (disuelta en 2mM de tampón fosfato de potasio, pH 2,3) y la suspensión se incubó a 37°C durante 1h hasta que se disolvió el precipitado totalmente.

Para finalizar, se centrifugaron las muestras a 3000xg, 5min, 37°C y se midió la absorbancia del sobrenadante a 360nm. Como blanco para las medidas se usó la solución de guanidina. Para cuantificar los niveles de carbonilos se utilizó el coeficiente de extinción molar de 22000 M⁻¹. cm⁻¹ (*Ferrer et al., 2009*).

I.6. Análisis de citoquinas en plasma.

La detección y cuantificación de las citoquinas presentes en las muestras de plasma fue analizado mediante el kit Flowcytomix (eBioscience, North America). Este kit permite analizar mediante citometría de flujo la concentración de hasta 20 citoquinas en una muestra. En la presente intervención se analizaron simultáneamente las siguientes citoquinas, IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17a, IL-22, TNF- α e IFN- γ .

La técnica se basa en la presencia de esferas de látex de dos tamaños diferentes (4 μ m y 5 μ m), que emiten distintos niveles de fluorescencia a 690nm, recubiertas por anticuerpos que están dirigidos frente a una citoquina concreta. De esta forma, cada tipo de esfera sólo se une a una citoquina exclusivamente, emitiendo así una fluorescencia determinada que permite diferenciar las poblaciones. Para que se llegue a emitir dicha fluorescencia se requiere de la adición de otros compuestos que se detallan a continuación.

El kit flowcytomix contiene además, una serie de diluciones conocidas de las citoquinas que se van a medir, con el objetivo de realizar una recta de calibrado y poder calcular las concentraciones de las mismas en la muestra.

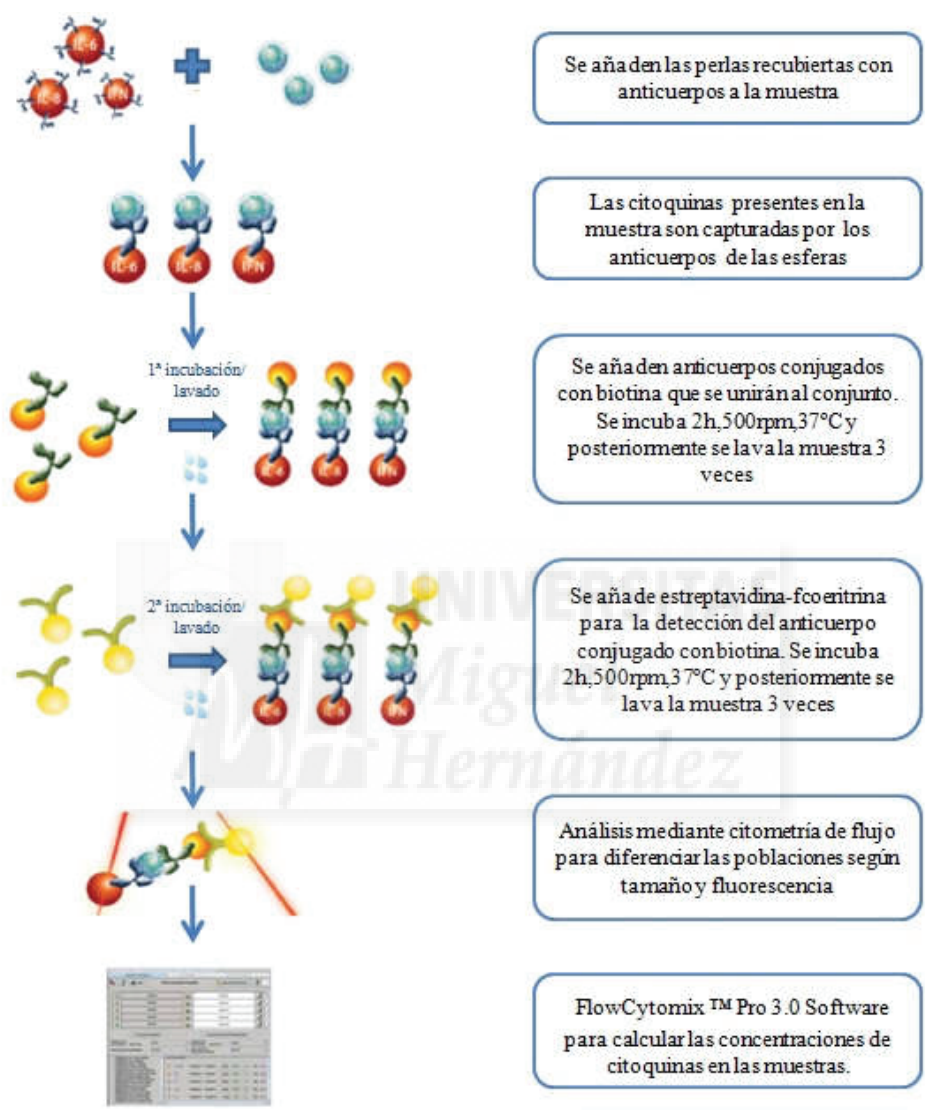
Para la determinación de la concentración de citoquinas (Figura 7), se utiliza una placa de 96 pocillos con filtro millipore en el fondo, donde se adicionan 25 μ l de las muestras a analizar y 25 μ l del cóctel de esferas. Después se añaden 50 μ l de un cóctel de anticuerpos anticitoquinas conjugados con biotina. Los anticuerpos conjugados con biotina también se unen a una misma citoquina, de modo que cada citoquina estaría recubierta por un lado por el anticuerpo específico biotilado, y por otro lado por la esfera conjugada a los mismos anticuerpos específicos.

Una vez añadido a los pocillos la mezcla anteriormente mencionada se deja durante dos horas en agitación a 500rpm, 37°C y en oscuridad. Una vez concluido este tiempo se lavan tres veces los pocillos con tampón de ensayo, un manifold para placas multipocillo (Pall).

Posteriormente se añaden 50µl de una solución de estreptavidina-ficoeritrina y se incuba nuevamente la muestra durante una hora, 500rpm y 37°C. La estreptavidina se une constitutivamente a la biotina y la ficoeritrina emite fluorescencia proporcionalmente a la cantidad de citoquina unida. Una vez concluido el tiempo, se lava como anteriormente se menciona y se añade a cada pocillo 100µl de tampón de ensayo para la lectura de la muestra.

Las muestras, detectadas por citometría de flujo (FacsCantoII, BD Bioscience), se analizaron mediante el software FlowCytomix™ Pro3.0 Software (eBioscience) (Figura 8).





Se añaden las perlas recubiertas con anticuerpos a la muestra

Las citoquinas presentes en la muestra son capturadas por los anticuerpos de las esferas

Se añaden anticuerpos conjugados con biotina que se unirán al conjunto. Se incuba 2h, 500rpm, 37°C y posteriormente se lava la muestra 3 veces

Se añade estreptavidina-foeritina para la detección del anticuerpo conjugado con biotina. Se incuba 2h, 500rpm, 37°C y posteriormente se lava la muestra 3 veces

Análisis mediante citometría de flujo para diferenciar las poblaciones según tamaño y fluorescencia

FlowCytomix™ Pro 3.0 Software para calcular las concentraciones de citoquinas en las muestras.

Figura 7. Diagrama de flujo para la determinación de citoquinas.

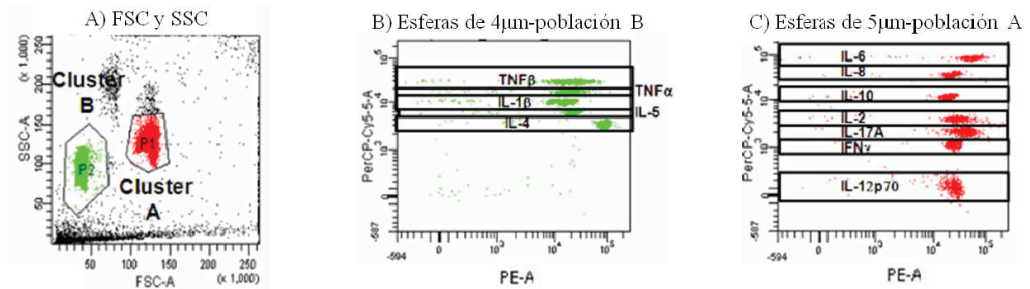


Figura 8. A) El software tras la determinación de la curva estándar, sugiere dos grupos de esferas, la población A, que representa la población de perlas ($5\mu\text{m}$) y la B, que representa las esferas más pequeñas ($4\mu\text{m}$). **B)** y **C)** Los grupos de esferas A y B contienen varias poblaciones de esferas, cada una de ellas correspondiente a una citoquina particular. Las esferas fluorescentes del grupo A y las esferas fluorescentes del grupo B, muestran las diferentes intensidades de fluorescencia. El software proporciona automáticamente una división entre las poblaciones.

Abreviaturas: FSC, Forward Scatter o detector de dispersión frontal; SSC, Side Scatter o detectores de dispersión lateral.

I.7. Análisis estadístico.

El análisis estadístico fue realizado usando el software de Windows SPSS-20. Pruebas de normalidad fueron realizadas de acuerdo con el test Kolmogorov- Smirnov (K-S test). Los resultados fueron expresados como la media \pm el error estándar de la media y los valores con una $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos. El efecto del ejercicio físico sobre los cambios inducidos en los diferentes parámetros circulantes (HbA1c, péptido C, carbonilos de las proteínas y citoquinas) y la insulina inyectada en cada momento en particular fueron validados mediante la T-Student para muestras independientes. La evolución de las diferentes citoquinas dentro de cada grupo particular de individuos a lo largo del tiempo fue analizada mediante una T-Student para muestras pareadas. Aunque hay una limitación en el tamaño de la muestra ($n=8$) para el grupo A y ($n=1$) para el grupo S, se han realizado análisis adicionales como un modelo lineal general (GLM) de medidas repetidas considerando el tiempo como un factor intragrupo y la actividad física como un factor intergrupar y un GLM de medidas repetidas considerando solamente el factor intragrupo (tiempo) y ningún factor intergrupo para todos los parámetros anteriormente mencionados. Correlaciones entre los diferentes parámetros se encontraron según el coeficiente de correlación de Pearson. Se consideró arbitrariamente una baja correlación para $r = \pm 0,0-0,30$, una correlación moderada para $r = \pm 0,31-0,60$ y una buena correlación para $r = \pm 0,61-1$.

II. INTERVENCIÓN 2.

El objetivo que persigue esta segunda intervención, es el control de parámetros metabólicos e inflamatorios a través de la dieta y el ejercicio, en un sujeto debutante como diabético tipo 1 con remisión posterior.

II.1. Sujeto de estudio. Procedimiento y diseño del estudio.

Esta intervención consistió en un caso aislado que se obtuvo a raíz de la intervención número 1. Se trata de un caso clínico, un paciente que debutó en diabetes mellitus tipo 1 y que a las pocas semanas del comienzo de la intervención 1, remitió y no volvió a presentar síntomas de la enfermedad durante los dos años que duró el estudio y hasta la actualidad. Este paciente, aunque siguió participando en dicha intervención, fue considerado de especial interés para un posterior análisis de los resultados de forma individualizada. El seguimiento del paciente se llevó a cabo durante un periodo de dos años en el Servicio de Endocrinología del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña (España).

El Comité de Ética Autonómico aprobó esta investigación, que cumplió tanto los requisitos locales como los establecidos en la Declaración de Helsinki para la investigación con seres humanos. El sujeto, menor de edad, fue informado al inicio de la intervención en presencia de sus tutores sobre el objetivo y justificación del estudio y se firmó un consentimiento escrito.

El seguimiento del paciente, al que se le identificará como SCA (Sujeto Caso Aislado), se realizó en paralelo a los sujetos de la intervención 1. Por tanto, se tuvieron en cuenta los parámetros de actividad física establecidos para la intervención 1 siguiendo las directrices del Colegio Americano de Medicina Deportiva (*Jakicic et al., 2001*).

El sujeto SCA, es un varón que debutó en diabetes mellitus tipo 1 a la edad de 14 años y fue diagnosticado en el momento del inicio de la enfermedad por hiperglucemia + cetoacidosis. El sujeto, llevaba a cabo una actividad física activa y regular antes de debutar como diabético, y continuó practicando dicha actividad posteriormente con la misma regularidad. El sujeto SCA era futbolista de las categorías infantiles del club de fútbol Deportivo de A Coruña. Realizaba rutinas de entrenamiento de 1,5 horas de tipo interválico 3 días a la semana (lunes, miércoles y viernes), con partido de competición de la liga provincial durante los fines de semana. Durante el estudio pasó a la categoría juvenil incrementando el volumen de entrenamiento, pasando de 6h semanales más el partido de competición (8h en total) a 10h, es decir 2h diarias de entrenamiento de lunes a viernes más un partido oficial de la liga regional gallega (12h en total). Durante la intervención no se pudo realizar ninguna prueba de esfuerzo al paciente, por lo que no se tienen datos de su VO_2 max en el momento del estudio. En la actualidad es futbolista profesional y sus datos de VO_2 max son de 52ml/min/kg, catalogada como excelente. Durante los entrenamientos, SCA llevaba un pulsómetro que registraba una frecuencia cardíaca que oscilaba entre 140-160ppm, siendo su frecuencia basal de 69ppm.

En la primera consulta, se preparó una historia clínica del paciente y se le realizó una exploración física. Se tomaron muestras sanguíneas de la vena antecubital por la mañana en ayunas. Dichas muestras se utilizaron para determinar HbA1c, péptido C, antiGAD, carbonilos de las proteínas y citoquinas.

Además, el paciente y tutores ingresaron en un programa educacional del hospital con el fin de aprender sobre las necesidades dietéticas, monitorización de la glucemia e inyección de insulina. En cuanto a la dieta, el consumo de calorías y diseño de las comidas se adecuó al tipo de terapia insulínica y condiciones generales del paciente, llevando una alimentación adecuada y saludable aún después de remitir la enfermedad.

Las consultas se llevaron a cabo inicialmente de forma semanal durante el primer mes y una vez al mes para el periodo restante. En cada consulta, se le preguntó al paciente sobre el cumplimiento de la dieta, la monitorización de la glucemia, inyecciones de insulina y rendimiento durante el ejercicio.

Al final del primer año, se extrajo una segunda muestra sanguínea en las mismas condiciones que la primera muestra y se realizó la determinación de los mismos parámetros. Mensualmente se siguió realizando un seguimiento del paciente. Al final de este periodo, el estudio fue considerado terminado y la última extracción sanguínea fue realizada con el fin de medir los parámetros antes mencionados. Las muestras de sangre se colocaron en tubos y fueron analizadas por un laboratorio de análisis clínico externo, siguiendo los protocolos establecidos. Posteriormente, la sangre sobrante se transportó en frío a los laboratorios de la Universidad Miguel Hernández para realizar el resto de las determinaciones.



II.2. Determinaciones de los distintos parámetros metabólicos e inflamatorios.

Las determinaciones que se le realizaron a las muestras del paciente SCA, fueron las mismas que se llevaron a cabo en la intervención 1 (ver Materiales y Métodos, Intervención 1) y que se mencionan al principio de esta intervención.



II.3. Análisis estadístico.

Aunque se trata de un caso aislado, los datos de SCA se compararon con los obtenidos de los pacientes estudiados durante la intervención 1 (grupos A y S). Ver Resultados y Discusión.



III. INTERVENCIÓN 3.

El objetivo de la intervención 3 es el control de parámetros metabólicos e inflamatorios a través de la dieta y el ejercicio en un sujeto diabético tipo 1 practicante de actividades extremas.

III.1. Sujeto de estudio. Procedimiento y diseño del estudio.

Esta intervención se realizó en un sujeto con diabetes mellitus tipo 1 que practicaba alpinismo y otras actividades extremas, en las que estaba expuesto a bajas concentraciones de oxígeno (O₂) y un elevado nivel de estrés. El seguimiento se llevó a cabo durante un periodo de 6 meses en el Instituto de Bioingeniería de la Universidad Miguel Hernández de Elche (España), aunque el sujeto se tuvo que desplazar a diversas localizaciones del planeta para desarrollar sus actividades.

El Comité de Ética Autonómico aprobó esta investigación, que cumplió tanto los requisitos locales, como los establecidos en la Declaración de Helsinki para la investigación con seres humanos. El sujeto fue informado al inicio sobre el objetivo y justificación del estudio y se firmó un consentimiento escrito.

Durante la intervención, el sujeto desarrolló 2 actividades: a) Un “trekking” al campo base del Everest (Nepal) a 5364 m de altitud. B) Pruebas de aceleración desarrolladas en las instalaciones de la NASA (del inglés, National Aeronautics and Space Administration) en Houston (Texas-USA). Ambas actividades se explican detalladamente más adelante.

El individuo al que se denominará sujeto AD (Astronauta Diabético) se estaba preparando para ser admitido en el programa de astronautas de la NASA. En la actualidad es miembro del programa y sigue con su preparación para salir al espacio,

muy probablemente en 2017-2018. En caso de lograrlo, sería el primer astronauta diabético de la Historia de la Humanidad. Se trata de un varón que en el momento de la intervención tenía 48 años de edad, 165 cm de altura y 69 kg de peso. AD realizaba ejercicio físico principalmente aeróbico de forma habitual y alpinismo profesionalmente antes del estudio.

En la primera consulta (mayo 2013), se le realizó una exploración física y se inició un programa educacional con el fin de que el individuo mejorase su control glucémico y aprendiese algunas pautas sobre sus necesidades dietéticas que le ayudasen también, a mejorar su rendimiento. La dieta, el consumo de calorías y diseño de las comidas se adecuó al tipo de terapia insulínica y condiciones del paciente. La alimentación del sujeto de los días de entrenamiento fue rica en hidratos de carbono (60-65% hidratos de carbono, 25-30% lípidos y 10% proteínas) en comparación con los días de descanso (55% hidratos de carbono, 30% lípidos y 15% proteínas), con un contenido energético de 2400kcal (días de entrenamiento) y de unas 1700kcal (días de descanso). Las ingestas fueron repartidas en 5 comidas, las cuales incluían al menos dos yogures y dos piezas de frutas diarias (Tabla 5 y 6). Los días de entrenamiento el sujeto realizaba un circuito de bicicleta de 1,5h de ruta por la mañana y una sesión de musculación (60-70% del peso máximo levantado) por las tardes (4 días a la semana). Un día a la semana realizaba surf por la mañana (2h) y otro día, realizaba actividades de intensidad moderada: carrera continua al trote de 1h por la mañana y una sesión de core-training de 45min por la tarde. Finalmente, AD descansaba un día a la semana. Algunas semanas cambiaba el ciclismo de ruta por una sesión de bicicleta de montaña (2h) o una sesión de senderismo (3-5h). Este programa de entrenamiento fue proporcionado por la NASA, diseñado conforme a la patología de AD y con la finalidad de la puesta a punto del sujeto conjuntamente con un correcto control glucémico. Para el diseño del plan de entrenamiento se partió de los datos obtenidos en las pruebas de esfuerzo realizadas habitualmente en la NASA. Cuando AD accedió a realizar el estudio con la UMH, ya llevaba un par de años realizando esta rutina de entrenamiento.

Un par de semanas después de la primera consulta, se citó al paciente para preguntarle acerca de la monitorización de la glucemia, inyecciones de insulina y adhesión a la dieta. Además, se le realizó una prueba de esfuerzo (ergometría) en tapiz rodante durante un total de 42min. La idea era tener datos de la condición física de AD en el momento de la intervención y del control de su glucemia durante un esfuerzo máximo como el que podría experimentar durante su paseo espacial, en donde podía alcanzar una frecuencia cardiaca cercana a las 200pulsaciones/min. La prueba se realizó a una velocidad constante de 8,7km/h con el tapiz en posición horizontal. Se realizaron determinaciones de la glucemia por punción en la yema del dedo al iniciar la prueba (180mg/dl), a los 3min (200mg/dl), 13min (153mg/dl), 24min (156mg/dl), 36min (135mg/dl) y al final de la prueba (141mg/dl). La glucemia de un sujeto no diabético oscila entre 70-100mg/dl. Para la toma de la glucemia, la velocidad del tapiz descendía a 4,8km/h, y mientras el sujeto caminaba se realizaba la desinfección del dedo, la punción y la toma de la gota de sangre con la tira reactiva, que era posteriormente analizada por un glucómetro. El proceso duraba 1min aproximadamente. Los parámetros de la ergometría se muestran en la tabla 7.

Tabla 5. Ejemplo, dieta de 1700kcal (día de descanso).

Dieta de 1700kcal	
Desayuno	Leche desnatada sola/ café: 250ml Pan integral: 60g Aceite de oliva: 15g Kiwi: 150g
Almuerzo	Yogurt desnatado: 125g Muesli: 30g
Comida	Ensalada verde: -Lechuga: 100g -Tomate: 100g -Pepino: 60g Arroz: 85g Pavo: 150g
Merienda	Yogurt desnatado: 125g Manzana: 150g
Cena	Bacalao: 150g Patata y brocoli: 250g

Tabla 6. Ejemplo, dieta de 2400kcal (día de entrenamiento).

Dieta de 2400kcal	
Desayuno	Leche desnatada sola/ café: 250ml Zumo natural: 250ml Pan integral: 60g Aceite de oliva: 15g Queso fresco desnatado: 40g
Almuerzo	Yogurt desnatado: 125g Cereales: 60g
Comida	Ensalada verde: -Lechuga: 200g -Tomate: 100g -Pepino: 60g Hamburguesa de ternera: 150g Arroz blanco: 80g
Merienda	Yogurt desnatado: 125g Manzana: 200g
Cena	Sopa de verduras: 250ml Merluza a la plancha: 200g Pimiento asado: 60g Pan integral: 20g

Tabla 7. Valores de la prueba de esfuerzo del sujeto AD.

Parámetro	Final de la ergometría	Recuperación tras ergometría
Tiempo	33:30 min	42 min (+8:30 min)
Velocidad	8,7 km/h	4,8 km/h
VCO₂	2900 ml/min	1735 ml/min
VO₂	3358 ml/min	1874 ml/min
VO₂max	48,7 ml/min/kg	27,2 ml/min/kg
VO₂/FC	17,8%	11,4%
CR	0,86	0,93
Volumen respiratorio	114 l/min	77 l/min
Frecuencia cardiaca	72(basal)-172 latidos/min	110 latidos/min

Abreviaturas utilizadas: CR, cociente respiratorio; FC, frecuencia cardiaca; VO₂, volumen de oxígeno; VCO₂, volumen de dióxido de carbono.

Posteriormente a estos controles iniciales, el control rutinario del sujeto se llevó a cabo una vez al mes. En estas ocasiones se hacía un seguimiento del paciente controlando la dieta, el rendimiento deportivo y los parámetros glucémicos.

A finales del mes de octubre de 2013, 6 días antes de la primera actividad (“trekking” al campo base del Monte Everest), se tomaron muestras sanguíneas de la vena antecubital por la mañana en ayunas para el posterior análisis de los parámetros sanguíneos (tablas 8, 9, 10 y 11). El “trekking” duró 11 días y a su regreso a España, se volvieron a tomar muestras sanguíneas en las mismas condiciones. El tiempo transcurrido entre la finalización del “trekking” y la segunda analítica fue de 5 días. El tiempo transcurrido entre la primera y la segunda analítica fue de 3 semanas aproximadamente.

A los 20 días tras la segunda analítica, se le realizó una tercera analítica, antes de partir a Estados Unidos para realizar las pruebas de aceleración en las instalaciones de la NASA. El tiempo transcurrido entre la primera y la tercera analítica fue de un mes y medio aproximadamente. A su regreso de Estados Unidos a finales del mes de enero de 2014 se le realizó al sujeto AD la cuarta analítica en las mismas condiciones que las anteriores. El tiempo transcurrido entre la primera y la cuarta analítica fue de 3 meses y medio aproximadamente, momento en el que se dio por concluido el estudio (Figura 9).

Todas las muestras de sangre fueron analizadas por un laboratorio de análisis clínico externo siguiendo los protocolos establecidos. Posteriormente la sangre sobrante se transportó en frío a los laboratorios de la Universidad Miguel Hernández para realizar el resto de las determinaciones.

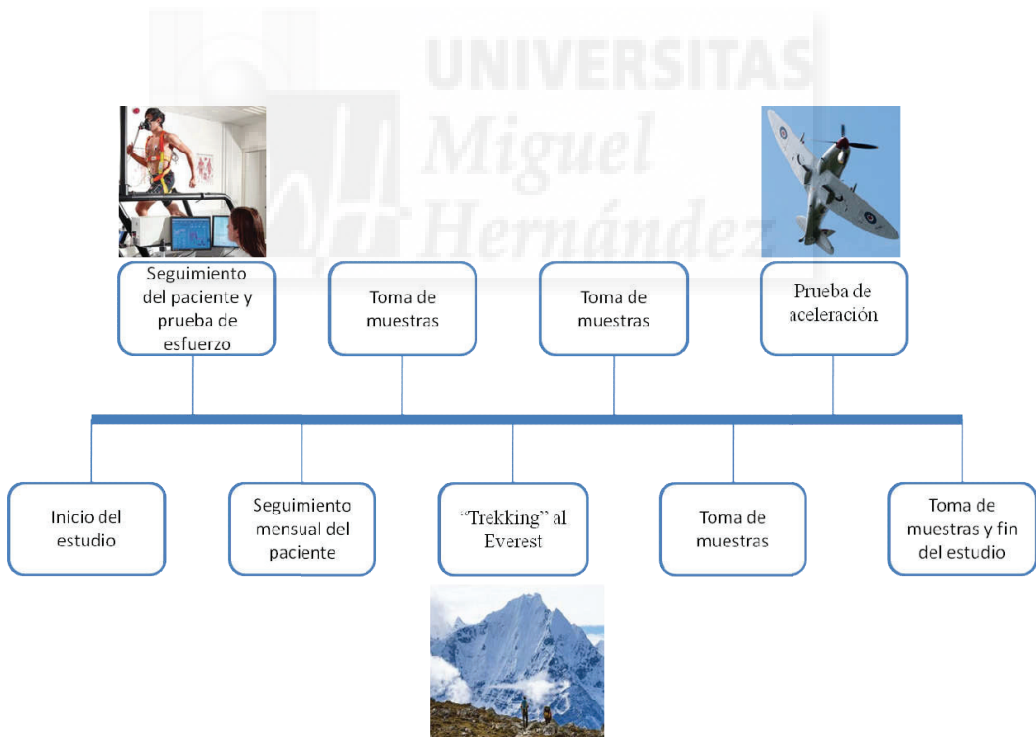


Figura 9. Diagrama de flujo del diseño del estudio, Intervención 3.

III.2. Actividades realizadas por AD.

III.2.1. “Trekking” al campo base del monte Everest.

La salida hacia el Everest tuvo lugar desde Lukla a 2.650m de altura el 24 de Octubre de 2013. El sujeto realizó caminatas diarias de 5 horas excepto el último día, el 1 de noviembre. Ese día, AD realizó una caminata de 10 horas hasta llegar al campo base del Everest a 5.364m de altura aproximadamente. El 2 de noviembre comenzó el descenso con una duración de 8 horas, y el día 3 de noviembre tras otra caminata de 8 horas, AD llegó al punto de partida (Lukla), donde terminó el “trekking”. Durante la expedición al campo base del Everest, el sujeto controló diariamente sus niveles de glucosa y unidades de insulina inyectada.

III.2.2. Prueba de aceleración.

En el mes de noviembre-diciembre 2013 el sujeto realizó las pruebas de aceleración en las instalaciones de la NASA (Houston, Texas). Éstas consistieron, en vuelos de prueba con el avión de entrenamiento Northrop T-38 Talon para el ensayo de vuelos supersónicos, vuelos nocturnos, familiarización con la instrumentación y navegación en condiciones extremas. Durante la estancia se realizó también una prueba de centrífuga a 6xg para simular las condiciones de despegue.

III.3. Análisis sanguíneos.

Al paciente se le realizaron 4 análisis de sangre. Estos análisis fueron realizados por un laboratorio de análisis clínico externo siguiendo los protocolos establecidos. Los parámetros que se midieron en estas analíticas se describen con valores normales en las tablas 8, 9, 10 y 11.

Tabla 8. Parámetros eritrocitarios.

	Valores de referencia	Unidades
Parámetros eritrocitarios		
Eritrocitos	4,6 - 6	$\times 10^6/\text{mm}^3$
Hemoglobina	13 - 16,15	g/dl
Hematocrito	40 - 54	%
VCM	80 - 95	fl
HCM	26,5 - 33,5	pg
CHCM	31,5 - 35	g/dl
RDW	37 - 56	%

Abreviaturas: VCM, volumen corpuscular medio; HCM, hemoglobina corpuscular media; CHCM., concentración de hemoglobina corpuscular media; RDW, banda de distribución de hematíes (red cell distribution width).

Tabla 9. *Parámetros leucocitarios.*

	Valores de referencia	Unidades
Parámetros leucocitarios		
Leucocitos	4,5 - 10	$\times 10^3/\text{mm}^3$
Neutrófilos	42,2- 75,2	%
Linfocitos	20 - 50	%
Monocitos	3 - 10	%
Eosinófilos	1 - 5	%
Basófilos	0 - 1,6	%
Neutrófilos	2,5 - 7,5	$\times 10^3/\text{mm}^3$
Linfocitos	1,5 - 4,5	$\times 10^3/\text{mm}^3$
Monocitos	0,2 - 0,8	$\times 10^3/\text{mm}^3$
Eosinófilos	0,05 - 0,5	$\times 10^3/\text{mm}^3$
Basófilos	0,01 - 0,15	$\times 10^3/\text{mm}^3$

Tabla 10. *Serie plaquetaria.*

	Valores de referencia	Unidades
Serie plaquetaria		
Plaquetas	150 - 450	$\times 10^3/\text{mm}^3$
Volumen medio de plaquetas		fl

Tabla 11. Parámetros bioquímicos.

	Valores de referencia	Unidades
Parámetros bioquímicos		
Glucosa	<70 -110	mg/dl
Hemoglobina A1c	<5,7	%
Hemoglobina A1c	<40	mmol/mol
Colesterol	<200	mg/dl
HDL-Colesterol	40 - 60	mg/dl
LDL-Colesterol	<100	mg/dl
Triglicéridos	<150	mg/dl
Ácido úrico	3,4 - 7	mg/dl
Creatinina	0 – 1,40	mg/dl
Urea	20 - 50	mg/dl
GOT/AST	0 -40	U/l
GPT/ALT	0 - 40	U/l
GGT	0 - 55	U/l
Fosfatasa alcalina	80 - 306	U/l
CK	0 - 195	U/l
Hierro	70 - 160	µg/dl
Ferritina	70 - 435	ng/dl
Sodio	135-145	mmol/l
Potasio	3,5-4,5	mmol/l
Mioglobina	20 - 71	µg/dl
Ácido láctico	4,5 – 19,8	mg/dl

Abreviaturas: HbA1c, hemoglobina glucosilada; GOT/AST, glutamato-oxalacetato transaminasa/aminoaspartato transferasa; GPT/ALT, glutamato-piruvato transaminasa/alanina aminotransferasa; GGT, gamma glutamil transpeptidasa; CK, creatinquinasa; HDL, LDL,

III.4. Determinaciones de los distintos parámetros metabólicos e inflamatorios.

Las determinaciones que se le realizaron a las muestras del paciente AD fueron, HbA1c, péptido C, antiGAD, carbonilos de las proteínas y citoquinas. Estas determinaciones se encuentran ampliamente detalladas en la intervención 1 (ver Materiales y Métodos, Intervención 1).



III.5. Análisis estadístico.

El análisis estadístico fue realizado usando el software de Windows SPSS-20. Los resultados fueron expresados en rangos mínimos y máximos, lo que permitirá observar tendencias.



IV. INTERVENCIÓN 4.

El objetivo de esta cuarta intervención es el control de parámetros metabólicos e inflamatorios a través de la dieta y el ejercicio en prediabéticos tipo 2 con resistencia a la insulina.

IV.1. Sujetos de estudio. Procedimiento y diseño del estudio.

La segunda intervención se realizó a 20 adolescentes (9 chicos y 11 chicas) de $14,3 \pm 0,4$ años de edad, con obesidad severa ($IMC > 30$) que fueron reclutados y evaluados en el Centro Les Oiseaux, Sanary Sur Mer (Francia) durante un periodo de 4 meses.

Se certificaron todas las regulaciones institucionales y gubernamentales con respecto a la participación de adolescentes en la investigación, que fue aprobada por el Comité de Ética Local, cumpliendo los requisitos establecidos en la Declaración de Helsinki para la investigación con seres humanos. Todos los sujetos fueron informados al inicio, en presencia de sus tutores sobre el objetivo y justificación del estudio y firmaron un consentimiento escrito.

Los adolescentes fueron reclutados y evaluados dentro de la primera semana después de su admisión en un centro para el tratamiento de la obesidad en adolescentes. Los criterios para definir la obesidad tuvieron en cuenta los factores de edad y sexo en la infancia, basándose en las indicaciones del International Obesity Task Force (*Cole et al., 2000*). Se midió la circunferencia de la cintura y se calcularon las puntuaciones z del IMC y los valores mayores que 3 se definieron como obesidad severa (*Rolland-Cachera et al., 1991*).

Por otro lado se estableció un grupo control, para el cual se reclutaron 16 adolescentes sanos (9 chicos y 7 chicas) en edad puberal ($15,0 \pm 0,5$ años) y peso normal (IMC= 20-25). Entre los criterios de inclusión en este grupo se estableció que todos los sujetos fueran normotensos (definidos por percentiles de presión $<95^{\circ}$, edad y altura), no diabéticos, no fumadores y libres de cualquier otra comorbilidad conocida relacionada con la obesidad.

Los criterios de exclusión para todos los sujetos incluyeron, antecedentes familiares de enfermedad cardiovascular prematura, consumo de cualquier medicación, estado puberal evaluado por la etapa de Tanner <2 , pérdida de peso mayor del 5% de su peso total durante los 3 meses anteriores a la investigación y la práctica de actividad física (>3 horas de ejercicio por semana para minimizar los efectos del entrenamiento).

En la primera consulta, la cual tuvo lugar pocos días después de ser reclutados, los pacientes del grupo de adolescentes con obesidad severa (SOA, del inglés severely-obese adolescents) se sometieron a una evaluación clínica, vascular y se tomaron muestras sanguíneas para la posterior determinación de parámetros circulantes. Además, se sometió a los sujetos a un programa de pérdida de peso basado en la realización de dieta y ejercicio supervisado, administrado por el centro.

La dieta se prescribió moderadamente hipocalórica (reducción de 300-500kcal diarias) y con una distribución de nutrientes equilibrada: hidratos de carbono (55%), proteínas (15%) y lípidos (30% total, con menos del 10% en grasas saturadas). Además, se fue adaptando a las evoluciones ponderales de cada sujeto (Tabla 12).

El programa de entrenamiento constó de cuatro sesiones semanales de 90min supervisadas. Cada sesión estuvo constituida principalmente por ejercicio aeróbico, incluyendo además baile, tenis y juegos recreativos destinados a fomentar la actividad física en los sujetos.

A los 4 meses de la inclusión en el centro los pacientes del grupo SOA volvieron a someterse a una evaluación clínica, vascular y se tomaron nuevamente muestras sanguíneas.

El grupo de adolescentes con normopeso (NW, del inglés normal weight), fue llamado para su evaluación clínica, vascular y realización de analíticas sanguíneas, en las mismas fechas en las que se realizaron estas pruebas al grupo SOA (Figura 10).

Todas las muestras de sangre se colocaron en tubos y fueron analizadas por un laboratorio de análisis clínico externo, siguiendo los protocolos establecidos. Posteriormente la sangre sobrante se transportó en frío a los laboratorios de la Universidad Miguel Hernández para realizar el resto de las determinaciones.

Tabla 12. Ejemplo, dieta de 1600kcal.

Dieta de 1600kcal	
Desayuno	Leche desnatada sola/ café: 250ml Pan integral: 60g Aceite de oliva: 10g Kiwi: 150g
Almuerzo	Manzana: 150g Té: 250ml
Comida	Ensalada de cous cous - Cous cous: 50g - Pimiento rojo: 20g - Pimiento verde: 20g - Tomate: 40g - Hojas de hierbabuena Bacalao al papillote: 150g
Merienda	Yogurt desnatado: 125g
Cena	Crema de calabaza: 250ml Pechuga de pavo: 150g Yogurt desnatado: 125g

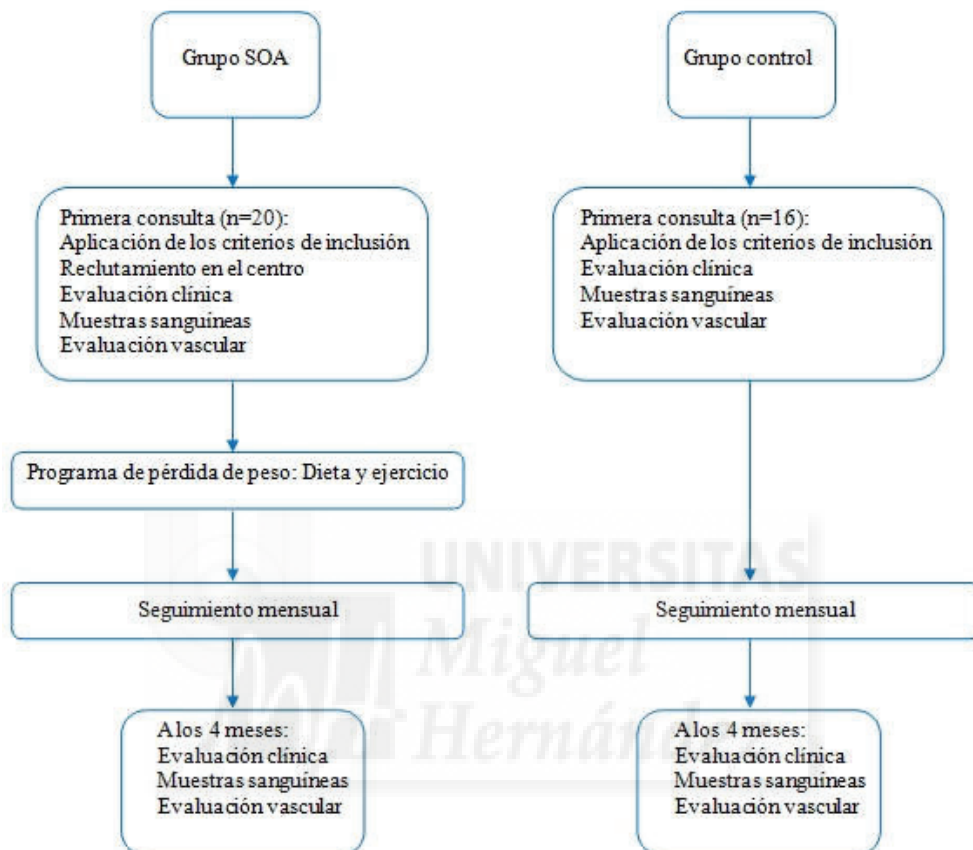


Figura 10. Diagrama de flujo del diseño del estudio, Intervención 4.

IV.2. Mediciones vasculares.

Las dos las mediciones vasculares (al comienzo y al final del estudio), se realizaron por la mañana en ayunas, en una habitación tranquila y con una temperatura controlada de entre 22 y 24 °C. Todos los sujetos se habían abstenido de realizar ejercicio vigoroso 48 horas antes de la prueba. Las mediciones comenzaron después de 20min de aclimatación en posición supina, y las presiones sanguíneas se midieron en el brazo izquierdo mediante un sistema automatizado (Dinamap, GE Medical Systems, Milwaukee, EE.UU.).

IV.2.1. Evaluación macrovascular.

La evaluación vascular de la arteria braquial fue realizada por el mismo investigador, de acuerdo con las Directrices de la International Brachial Reactivity Task Force (*Corretti et al., 2002*). Las mediciones braquiales se realizaron mediante ultrasonografía vascular de alta resolución (MyLab30, Esaote SpA, Firenze, Italia), con una sonda lineal de multifrecuencia de 10MHz. Las imágenes y las señales Doppler se registraron continuamente y simultáneamente.

Se realizó una dilatación mediada por flujo (FMD, del inglés flow mediated dilation), un método no invasivo bien establecido para estimar la función endotelial en el conducto arterial. Consiste en reducir el flujo en el brazo aplicando una banda de presión (250mmHg). Pasados 5min, la banda se abre y el vaso se ensancha como consecuencia del empuje del flujo retenido. Este ensanchamiento de la arteria braquial puede ser medido por ultrasonidos. Este proceso de dilatación, depende enteramente del endotelio vascular. Adicionalmente, los participantes recibieron por vía sublingual 0,4mg de dinitrato de isosorbida, un vasodilatador independiente del endotelio, pero dependiente del músculo liso vascular (dilatación mediada por nitrato o NMD, del

inglés nitrate mediated dilation). Se determinó la velocidad media del flujo sanguíneo y el promedio del flujo sanguíneo. Estas técnicas se pueden encontrar descritas más ampliamente en (Karpoff *et al.*, 2009).

IV.2.2. Evaluación microvascular.

La evaluación microvascular del flujo sanguíneo cutáneo (CBF, del inglés cutaneous blood flow) fue realizada por el mismo investigador mediante flujometría con láser Doppler (LDF). La LDF monitoriza continuamente la perfusión midiendo el flujo microvascular de sangre, usando el principio de Doppler. La técnica permite determinar si el flujo en el vaso de pequeño calibre se dirige hacia la sonda de detección o se aleja de la misma. También permite medir la velocidad de dicho flujo. Al tratarse de vasos de pequeño calibre, no pueden aplicarse las técnicas descritas para la macrovasculatura en el apartado anterior. La técnica LDF no fue desarrollada en nuestro laboratorio, aunque se puede encontrar explicada en (Leahy *et al.*, 1999). El CBF se midió en unidades de perfusión convencionales (PU) usando un sistema LDF (Periflux PF 5000, Perimed, Estocolmo, Suecia), equipado con una sonda termostática de LDF (PF 481, Perimed, Estocolmo, Suecia).

La iontoforesis permite el suministro transcutáneo de fármacos ionizados aplicando corriente continua de baja intensidad. Se trata de una técnica no invasiva, sin efectos sistémicos ni perturbaciones para la piel (Droog *et al.*, 2004). Después de medir el CBF se evaluaron las respuestas microvasculares a iontoforesis de la acetilcolina (ACh) y el nitroprusiato de sodio (SNP). Las sondas de LDF se mantuvieron a una temperatura constante de 33°C durante todo el proceso de medición. Para evaluar la respuesta de hipertermia local, se calentó una sonda de LDF que no contenía fármaco a 42°C durante 5 minutos. Sólo se analizó la fase de meseta (endotelio-dependiente) de la respuesta de hipertermia. Las respuestas máximas de CBF a ACh, SNP, NMD e hipertermia local se determinaron como el valor promedio máximo durante un período de 10 segundos dentro de sus procedimientos respectivos.

IV.3. Determinaciones sanguíneas.

Las muestras de sangre se tomaron por la mañana en ayunas y fueron analizadas por un laboratorio externo cualificado. Dichas muestras sirvieron para realizar diferentes determinaciones y medir diferentes marcadores bioquímicos que podremos encontrar en el apartado de Resultados, Intervención 4 ([Tablas 27a y 27b](#)).



IV.4. Determinación de la glucosa e insulina plasmática.

La insulina plasmática se midió usando el método de radioinmunoensayo (RIA) (kit de recubrimiento RIA TKIN2, Siemens, Berlin, Alemania). La glucosa plasmática se determinó mediante (Abbott, Rangendingen, Alemania). Ambas técnicas fueron llevadas a cabo por un laboratorio externo acreditado. Estas determinaciones se utilizaron para calcular el grado de resistencia a la insulina a través del índice HOMA (del inglés homeostatic model assessment). Para ello se utilizan las siguientes ecuaciones:

$$\text{HOMA-IR} = \text{Glucemia (mM)} \times \text{insulina (mUI/l)} / 22,5$$

$$\text{HOMA-IR} = \text{Glucemia (mg/dl)} \times \text{insulina (mUI/l)} / 405$$

Un valor superior a 3 es indicativo de resistencia a la insulina. Todos los participantes del grupo SOA tuvieron un HOMA > 3.

IV.5. Obtención y purificación de células sanguíneas.

La obtención de las diferentes fracciones celulares se realizó siguiendo una modificación del método de Boyum (*Boyum, 1964*). La sangre se depositó en un tubo Corning, sobre un volumen de ficoll, en una proporción ficoll:sangre de 1:1,5 (4ml:6ml). La muestra se centrifugó a 900xg, durante 30min a 18°C. Como resultado se obtuvo la siguiente distribución celular: la fase inferior, formada por los neutrófilos y eritrocitos, la fase intermedia de ficoll, conteniendo linfocitos y la fase superior correspondiente al plasma.

Para la obtención de los linfocitos, se recogió cuidadosamente con pipetas Pasteur, la capa que los contenía tras la primera centrifugación. Esta suspensión celular se lavó de los restos de ficoll y plasma con 10ml de PBS (tampón fosfato salino, del inglés phosphate buffered saline) y se centrifugó a 900xg, durante 10min a 4°C. El precipitado celular obtenido fue lisado con 2ml de agua bidestilada para las posteriores determinaciones. Las muestras fueron almacenadas hasta su utilización a -80° C.

Los neutrófilos fueron obtenidos de la fase inferior de la primera centrifugación. Se hemolizaron los eritrocitos añadiendo 50ml de 0,15M CINH₄ en un baño de agua/hielo durante 30-60min. Una vez producida la hemólisis se centrifugó la suspensión celular a 750xg, durante 10min a 4°C. Posteriormente, se repitió el tratamiento con CINH₄ en las mismas condiciones mencionadas. Finalmente, el precipitado celular se lavó con 15ml de PBS y se centrifugó en las condiciones citadas. Los neutrófilos se lisaron en un volumen de 2ml de agua bidestilada para medir MDA (malondialdehído) y carbonilos de las proteínas. Como en el caso anterior, las alícuotas fueron almacenadas a -80° hasta su uso.

Para el plasma, se utilizó un tubo nuevo de sangre con EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) y se centrifugaron las muestras a 1000xg, durante 30min a 4°C. Se recogió el sobrenadante (plasma), también para medir MDA y carbonilos de las proteínas, y se almacenó a -80°C hasta su uso.

IV.6. Determinación de carbonilos proteicos en plasma, neutrófilos y linfocitos.

La determinación de los carbonilos de las proteínas en plasma, neutrofilos y linfocitos se realizó mediante una adaptación del método de Levine (*Levine et al., 1994*). La cuantificación de los grupos carbonilos mediante colorimetría sirve como indicador de la oxidación de las proteínas.

El primer paso para la determinación del índice de carbonilos es la desproteinización de las muestras. Se prepararon 9 tubos ependorff, a tres de ellos se les añadió 150µl de plasma, a otros 3 tubos 250µl de linfocitos y a los 3 últimos 250µl de neutrófilos. Se agregaron a todos, 250µl de agua y 500µl al 30% de TCA (ácido tricloroacético). Se centrifugaron las muestras a 15000xg, durante 5min a 4°C, se eliminó el sobrenadante mediante una pipeta y se guardaron las muestras 24h a -80°C hasta su determinación.

Posteriormente, los precipitados se resuspendieron en 0,5ml de DNPH (2,4-dinitrofenilhidrazina) 10 mM, disuelto en 2M de HCl y se incubaron las muestras a 37°C durante 60min. Una vez concluido el tiempo, las muestras fueron precipitadas con TCA al 20% y centrifugadas a 1000xg, durante 10min a 4°C. En este momento, se eliminó el sobrenadante con una pipeta Pasteur y el precipitado se lavó tres veces con etanol:etil acetato (1:1) para eliminar el exceso de DNPH.

Al precipitado resultante se le añadió 1ml, 6M de guanidina (disuelta en 2mM de tampón fosfato potásico, pH 2,3) y la suspensión se incubó a 37°C durante 1h hasta que se disolvió el precipitado totalmente.

Para finalizar, se centrifugaron las muestras a 3000xg, 5min a 37°C y se midió la absorbancia del sobrenadante a 360nm. Como blanco para las medidas se usó la solución de guanidina. Para cuantificar los niveles de carbonilos se utilizó el coeficiente de extinción molar de 22000 M⁻¹. cm⁻¹ (*Ferrer et al., 2009*).

IV.7. Determinación de MDA en linfocitos, neutrófilos y plasma.

El nivel de peroxidación lipídica fue determinado mediante la cuantificación del principal producto resultante de la oxidación de los fosfolípidos, el malondialdehído (MDA), el cual a altas temperaturas y en condiciones ácidas, reacciona con el ácido tiobarbitúrico (TBA) formando un complejo que puede ser detectado y cuantificado por fluorescencia.

Para esto, se prepararon 3 tubos en los que se mezclaron 200 μ l en el caso de neutrófilos y los linfocitos y 50 μ l en el caso del plasma, con 50 μ l de 0,05% en etanol de BHT (butil hidroxil tolueno) y 50 μ l de TCA al 20% en 0,6M HCl. Las muestras se incubaron 15 minutos en hielo y se centrifugaron a 5000xg, durante 15 minutos a 4°C. Posteriormente, se añadieron 100 μ l al 0,6% de TBA en agua, a 100 μ l del sobrenadante de la mezcla centrifugada anteriormente. La mezcla se incubó a 97°C durante una hora. Al terminar la incubación se dejaron enfriar las muestras en hielo durante 10 minutos.

Rápidamente se realizó la extracción líquido/líquido del cromógeno TBA-MDA con 300 μ l de n-butanol. Las muestras se agitaron vigorosamente durante 30 segundos y se centrifugaron a 10000xg, durante 3 minutos. La cuantificación del complejo TBA-MDA se llevó a cabo por HPLC (cromatografía líquida de alta eficacia, del inglés high performance liquid chromatography (LaChrom, Merck-Hitachi)) equipado con detector de fluorescencia. Se inyectaron 20 μ l de cada muestra en una columna de fase reversa LiChrospher® 100 RP-18 con un flujo isocrático de 1ml/min de la fase móvil, metanol:fosfato potásico 50mM, pH 6,8. La detección de los compuestos se llevó a cabo mediante fluorescencia excitando a 515nm y recogiendo la emisión a 553nm.

La concentración de MDA se calculó a partir de una recta de calibrado realizada con 1',3',3'-tetraetoxipropano (TEP) hidrolizado con 1% ácido sulfúrico cuya concentración se obtuvo midiendo la absorbancia a 244nm ($\epsilon=13700 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Los resultados fueron expresados en μ moles MDA/n° células o ml de plasma (*Laporta et al, 2007*).

IV.8. Análisis de citoquinas y marcadores relacionados con la función vascular en obesidad y resistencia a la insulina.

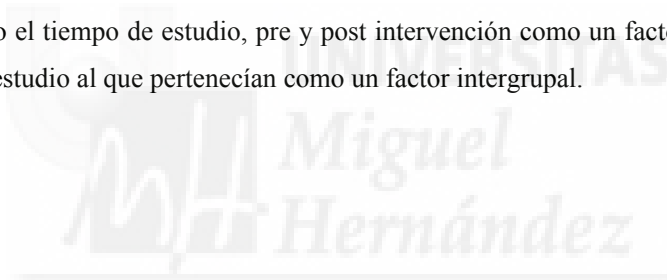
Se midieron diferentes citoquinas como la IL-2, IL-4, IL-6, IL-1 β , TNF- α y otros marcadores relacionados con inflamación y la obesidad, como la leptina, la resistina, la proteína C reactiva (CRP), la mieloperoxidasa (MPO) y el activador del plasminógeno tisular (tPA, del inglés tissue plasminogen activator) en plasma, mediante citometría de flujo (FACS Calibur, BD Bioscience) con el kit Flowcytomix (eBioscience, North America). Esta técnica se encuentra explicada ampliamente en la intervención 1.



IV.9. Análisis estadístico.

El análisis estadístico fue realizado usando el software de Windows SPSS-20. Pruebas de normalidad fueron realizadas de acuerdo con el test Kolmogorov- Smirnov (K-S test). Los resultados fueron expresados como la media \pm el error estándar de la media y los valores con una $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

La evolución de las diferentes citoquinas dentro de cada grupo particular de individuos a lo largo del tiempo, fue analizada mediante una T-Student para muestras apareadas. Dichos datos se expresaron en forma de rangos. Además, se realizaron análisis adicionales, como un modelo lineal general (GLM) de medidas repetidas, considerando el tiempo de estudio, pre y post intervención como un factor intragrupo y el grupo de estudio al que pertenecían como un factor intergrupalo.



V. INTERVENCIÓN 5.

El objetivo que persigue la quinta intervención, es el establecimiento de parámetros inflamatorios generados por la actividad física en sujetos sanos.

V.1. Sujetos de estudio. Procedimiento y diseño del estudio.

Para esta intervención se seleccionaron 19 sujetos, varones sanos que estudiaban Ciencias de la Actividad Física y Deporte en la Universidad Miguel Hernández de Elche (España) y se prestaron voluntarios para el estudio.

Todos los sujetos fueron informados sobre el objetivo y las demandas del estudio y dieron su consentimiento por escrito. El protocolo se ajustó tanto a los requisitos legales locales como a la Declaración de Helsinki sobre la investigación con seres humanos y fue aprobado por el Comité de Ética de los Gobiernos Autónomos correspondientes.

En cuanto a los criterios de selección para la participación en el estudio, se tuvo en cuenta que los sujetos practicasen regularmente rutinas aeróbicas, no sufriesen enfermedades crónicas, fuesen no fumadores y siguiesen hábitos nutricionales regulares. Los criterios de exclusión incluyeron, el consumo de antioxidantes o cualquier tipo de suplementos (aminoácidos, vitaminas, minerales, extractos vegetales) en el momento del estudio, consumo de fármacos antiinflamatorios o la presencia de lesiones musculares.

Una vez seleccionados los participantes, se les citó en una primera consulta para dar paso a un periodo de homogenización. Para ello, se les dio a los participantes una misma rutina aeróbica y siguieron una dieta similar durante un período de 21 días. Todo el periodo de homogenización fue supervisado 2 veces a la semana por los investigadores.

Además, se tomaron los parámetros antropométricos de los participantes. La antropometría de los sujetos se realizó al principio y al final del período de estudio de acuerdo al procedimiento ISAK (Sociedad Internacional para el Avance de Kinanthropometry) (Marfell-Jones *et al.*, 2006). Las muestras sanguíneas se tomaron también al principio del estudio, al final del periodo de homogenización de 21 días de dieta y entrenamiento y al día siguiente, día 22 de estudio, tras realizar la prueba de 2000 m en ayunas (Figura 11).

V.1.1. Rutina deportiva.

La rutina aeróbica consistía en 90 minutos de actividad, 3 días alternos a la semana, durante 3 semanas. La carga total realizada por cada individuo fue de 42-50km/semana, monitorizada por los acelerómetros calibrados Polar RS-800 (Barcelona, España).

V.1.2. Composición dietética.

Para el diseño de la dieta, se calculó el gasto calórico de cada sujeto. Las dietas se adaptaron a cada participante de forma individual y a las actividades deportivas que iban a realizar. La dieta fue diseñada utilizando el software Dietsource (Novartis, Barcelona, España) y adaptada a ejercicios aeróbicos (60% de carbohidratos, 25% de lípidos y 15% de proteínas). La ingesta diaria de energía se estimó en 2700kcal (días de entrenamiento) y 2100kcal (días de descanso). Los participantes fueron supervisados 2 días a la semana con el fin de controlar la realización de la dieta.

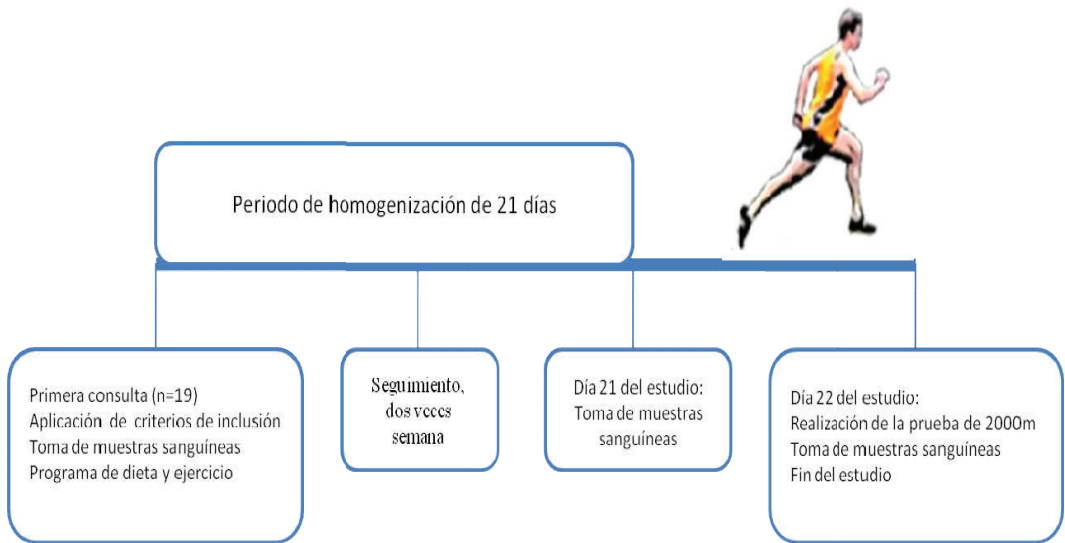


Figura 11: Diagrama de flujo del diseño del estudio, Intervención 5.

V.2. Determinaciones de sanguíneas.

Se obtuvieron muestras de sangre de la vena antecubital después de ayunar durante la noche, en el momento del reclutamiento (día 1), al final del período de entrenamiento y de homogeneización de la dieta (día 21) y al día siguiente durante los 30 minutos que siguieron a la realización de la prueba de 2000 metros (día 22). La extracción del día 1 y 21 se realizó después de un período de reposo de 8-10 horas después de la última sesión de entrenamiento.

V.2.1. Análisis hematológico y determinación de parámetros séricos.

El recuento de células sanguíneas se determinó mediante un analizador automático de hematología (Roche Diagnostics, Barcelona, España).

La glucosa circulante, colesterol, triglicéridos, ácido úrico, urea, creatinina, hierro sérico, ferritina, lactato y suero Na^+ y K^+ fueron determinados por un laboratorio cualificado externo.

Las proteínas plasmáticas, tales como la CK, la Mb, la fosfatasa alcalina (AP, del inglés alkaline phosphatase), la GOT/AST (transaminasa glutámico-oxalacética/aspartato aminotransferasa, del inglés glutamyl oxaloacetic transaminase/aspartate aminotransferase), la GPT/ALT (transaminasa glutámico-pirúvica/alanina aminotransferasa, del inglés glutamyl pyruvic transaminase/alanine aminotransferase), y la GGT (gamma glutamil transpeptidasa, del inglés gamma glutamyl transferase) son determinaciones rutinarias en los laboratorios de análisis certificados, midiéndose mediante procedimientos automatizados.

V.3. Actividades enzimáticas antioxidantes.

Las actividades antioxidantes, incluyendo la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, la glutatión peroxidasa (GPX) y la glutatión reductasa (GRD), se determinaron en un lector de microplacas (SPECTRO star Omega, BMG LabTech GmbH, Offenburg, Alemania) también por un procedimiento automatizado.



V.4. Determinaciones de los distintos parámetros metabólicos e inflamatorios.

La purificación de las células sanguíneas, la determinación de los marcadores de desequilibrio oxidativo (carbonilos proteicos y MDA) y el análisis de citoquinas plasmáticas siguieron los procedimientos descritos en apartados anteriores.



V.5. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó con el software SPSS-20 para Windows. La prueba de normalidad se realizó de acuerdo con la prueba Kolmogorov-Smirnov (prueba K-S). Los resultados se analizaron por ANOVA unidireccional, expresado como la media \pm esm (error estándar de la media) y los valores con $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.





RESULTADOS

RESULTADOS

En este apartado se detallan los resultados con el análisis estadístico de todos los parámetros estudiados en las cinco intervenciones llevadas a cabo.

Los datos se muestran en diferentes tablas como las medias \pm error estándar de la media (esm) y rangos, con la finalidad de estudiar la influencia del ejercicio físico y la nutrición sobre el control metabólico e inflamatorio de la diabetes, tanto tipo 1 como tipo 2. Igualmente, se muestran algunos datos obtenidos en individuos sanos.



I. INTERVENCIÓN 1.

La primera intervención se realizó sobre un grupo de sujetos (grupo A) que seguía una dieta controlada para la diabetes tipo 1 conjuntamente con un programa de entrenamiento, mayoritariamente ejercicios interválicos (n=8) trabajados en rutinas de una hora de duración al menos 5 días a la semana (ver más detalles en el apartado Material y Métodos, Intervención 1). El objetivo fue, estudiar cómo este programa de ejercicio físico podía modular el estado metabólico e inflamatorio en combinación con la terapia de inyecciones de insulina del grupo de sujetos que acababan de debutar como diabéticos tipo 1. En este sentido, se estudiaron diferentes parámetros que permitieron verificar la hipótesis propuesta. Los resultados se compararon con un grupo de sujetos (grupo S), que seguía una dieta controlada para la diabetes tipo 1 pero no realizaban actividad física (n=11) o ésta estaba, por debajo de los niveles mencionados en el grupo A.

Para ello, se midieron diferentes parámetros relacionados con el estado metabólico (Tabla 13) y el estado inflamatorio-inmunológico (Tablas 15, 16 y 17). Las determinaciones se realizaron en el momento del inicio, después de un año y a los dos años (ver Material y Métodos, Intervención 1 para más detalles) de debutar en la enfermedad. La tabla 13 como ya hemos mencionado, muestra las determinaciones de los parámetros relacionados con el control del estado metabólico en diabetes tipo 1 (HbA1c, péptido C, carbonilos proteicos, necesidades insulínicas, IDAA1c e IMC) en los pacientes de ambos grupos. Las correlaciones existentes entre dichos parámetros, también se encontrarán en este apartado (Tabla 14).

La tabla 15, muestra las determinaciones de antiGAD y las tablas 16a, 16b y 17a, 17b, los niveles de citoquinas, expresadas en rangos y como la media \pm esm, en los diferentes momentos de estudio, para ambos grupos (A y S).

I.1. Parámetros relacionados con el control del estado metabólico de los sujetos diabéticos tipo 1 del grupo A y S.

Tabla 13. Parámetros relacionados con el control del estado metabólico de los individuos del grupo A y el grupo S a lo largo del tiempo.

Parámetros (unidades)	Grupo A	Grupo S
Tiempo 0 (inicio del estudio)		
HbA1c (%)	9,57±3,47*	12,68 ± 2,83
Insulina inyectada (UI/Kg de peso)	0,48±0,38	0,72±0,27
Insulina inyectada (UI totales)	31,71±9,74	44,67±5,25
Péptido C (pmol/l)	1,09±0,76*	0,37±0,13
IDAA1c	11,50±4,95	15,02±3,03
IMC (kg/m ²)	20,80±1,42	22,37±0,71
Carbonilos proteicos (μmol/l)	76,19±40,62	75,64±12,43
Tiempo 1 (fin del primer año)		
HbA1c (%)	6,12 ± 0,64*	7,96±1,80
Insulina inyectada (UI/Kg de peso)	0,07±0,04*	0,54±0,25
Insulina inyectada (UI totales)	5,43±1,29*	35,83±5,15
Péptido C (pmol/l)	1,07±0,68	0,67±0,39
IDAA1c	6,18±0,61*	10,23±1,90
IMC (kg/m ²)	21,40±1,33	24,41±1,08
Carbonilos proteicos (μmol/l)	80,73±10,28	87,49±19,25
Tiempo 2 (fin del segundo año)		
HbA1c (%)	6,20±0,75*	8,50±1,96
Insulina inyectada (UI/Kg de peso)	0,14±0,07*	0,61±0,29
Insulina inyectada (UI totales)	7,67±1,94*	37,50±6,53
Péptido C (pmol/l)	1,87±1,58	0,67±0,37
IDAA1c	6,72±0,92*	10,96±2,28
IMC (kg/m ²)	21,57±1,25	24,06±1,12
Carbonilos proteicos (μmol/l)	88,48±19,67	91,87±12,56

Valores expresados como media ± esm.

() Valores estadísticamente significativos (p<0,05) respecto al grupo S.*

Abreviaturas: HbA1c, hemoglobina glucosilada; IDAA1c, índice de HbA1c ajustado a la insulina; UI, unidades internacionales.

La hemoglobina glucosilada (HbA1c) sirvió como marcador del promedio de los niveles de glucemia durante largos periodos de tiempo (Gillett, 2009). Como se puede observar en la tabla 13, el grupo A ya presentaba al inicio valores significativamente menores de HbA1c que el grupo S. Esto es debido al carácter observacional que tenía el diseño del estudio. Los sujetos del grupo A ya realizaban actividad física y se les propuso continuar con ella tras debutar en la enfermedad. El grupo S, como se ha mencionado anteriormente, no realizaba actividad física habitualmente. Tras debutar en la enfermedad se les propuso iniciar un programa de ejercicio, pero lo rechazaron, por lo que los sujetos cumplían los requisitos para pertenecer a este grupo. Algunos sujetos (n=4) del grupo S iniciaron rutinas de entrenamiento en el segundo año, pero no fueron consideradas relevantes por tratarse de actividades esporádicas y de baja intensidad que no alcanzaban las cargas de trabajo de los sujetos del grupo A. Después del primer año, el grupo A mostró valores de HbA1c cercanos a los recomendados (6,5%) por la American Diabetes Association (ADA) para la reducción de las complicaciones cardiovasculares (American Diabetes Association, 2010). Al final del primer y segundo año, el grupo S presentó valores aceptables de HbA1c pero fueron significativamente más elevados que los encontrados en el grupo A.

Los niveles circulantes de péptido C fueron determinados para servir como indicador de una masa residual de células β pancreáticas (Colin & Dayan, 2009). En el momento del debut, individuos del grupo A presentaban niveles circulantes significativamente más elevados de péptido C que los pacientes del grupo S (Tabla 13). Las diferencias entre ambos grupos no fueron significativas al final del primer y segundo año, aunque los valores de péptido C se mantuvieron más elevados en el grupo A. La concentración de péptido C determinada al final del estudio en ambos grupos, fue aproximadamente el doble de la determinada en el momento del inicio.

Sin embargo, los niveles de péptido C por sí solos, pueden ser considerados insuficientes para detectar la funcionalidad en las células β residuales. Por ello, se tuvo en cuenta el IDAA1c (índice de HbA1c ajustado a la insulina) que se calcula según la fórmula, $HbA1c (\%) + [4 \times \text{dosis de insulina (unidades por kilogramo por 24 horas)}] \leq 9$. Este parámetro se ha sugerido como medida para definir el periodo de remisión parcial. Valores de IDAA1c < 9 se correlacionan fuertemente con la existencia de

células β funcionales residuales (*Mortensen et al., 2009*). De acuerdo con esto, el grupo A comparado con el grupo S, mostró valores de IDAA1c significativamente menores al final del primer y segundo año (Tabla 13). Estos datos junto con los de péptido C, indican que ambos grupos tienen unos niveles muy similares de páncreas endocrino residual, pero que en el grupo A dicho páncreas es más funcional que en el S, es decir, es capaz de producir cantidades discretas de la hormona insulina. Estos parámetros, son esenciales para condicionar en cada paciente la cantidad de insulina que debe inyectarse.

La insulina administrada por cada paciente resultó de interés por estar fuertemente relacionada, entre otras, con el control de la glucemia y la presencia de una función endocrina pancreática residual. Dado que las formas farmacológicas de la hormona no pueden imitar con exactitud las acciones fisiológicas que modula la insulina endógena, lo deseable en el control de la diabetes tipo 1, es que el sujeto afectado por la enfermedad tenga que recurrir a un número menor de inyecciones para conseguir un óptimo control metabólico. De acuerdo a los datos registrados en la historia clínica de los participantes, se observó que los individuos del grupo A requirieron menos administración de insulina que los sujetos del grupo S, siendo significativas estas diferencias al final del primer y el segundo año como se refleja en la tabla 13. Considerando las unidades totales de insulina inyectada, los pacientes del grupo A se inyectaban en el momento del debut de la enfermedad una media de $31,7 \pm 9,2$ unidades internacionales por día, mientras que el grupo S se inyectaba $44,7 \pm 5,5$ unidades internacionales por día, reduciendo el grupo A en más de 10 unidades el uso de insulina exógena. Al primer y segundo año de estudio estas diferencias se incrementaron, llegando a reducir el uso de insulina exógena el grupo A hasta en 30 unidades internacionales por día con respecto del grupo S.

En un intento de entender mejor la evolución de la enfermedad en los dos grupos de pacientes, se determinaron los niveles plasmáticos de carbonilos proteicos. Esta elección estuvo basada en la observación de que la diabetes es una enfermedad que presenta eventos de estrés oxidativo, al igual que ocurre con el ejercicio (*Robertson et al., 2004*). La diabetes provoca la glucosidación de la hemoglobina y de otras proteínas circulantes, desarrollando con el tiempo aductos oxidativos, incluyendo la presencia de

grupos carbonilos en las proteínas. Al mismo tiempo, el incremento en el consumo de oxígeno durante el ejercicio también crea situaciones de desequilibrio oxidativo, sobre todo cuando la intensidad está mal diseñada, no permitiendo la adaptación de las defensas antioxidantes. Dado que esta intervención era de tipo observacional y que el equipo de investigación no podía modificar la rutina ni el programa de ejercicios, la determinación de los carbonilos proteicos podría dar una idea indirecta de cómo se adaptaba el organismo de los sujetos participantes a dos situaciones que podrían favorecer el desequilibrio oxidativo: la enfermedad diabética y un programa de ejercicio posiblemente mal diseñado. La tabla 13, muestra que no hay diferencias significativas en los carbonilos de las proteínas de ambos grupos, aunque el A, tiende a tener ligeramente menores valores de carbonilos que el grupo S. Estos datos indican que la diabetes genera una situación de desequilibrio oxidativo en ambos grupos como era de esperar, pero que la realización de ejercicio en el grupo A no supone un empeoramiento de la situación, observándose incluso una tendencia a la mejora.

El índice de masa corporal o IMC (peso en kilogramos dividido por el cuadrado de la talla en metros (Kg/m^2)) es el índice utilizado más frecuentemente para clasificar el sobrepeso y la obesidad en adultos. Según la OMS, (www.who.int/es/) los valores de entre 18,5- 24,99 marcarían un estado de normopeso para los sujetos. No se observan diferencias significativas en el IMC, sin embargo aunque los dos grupos están dentro de unos valores considerados aceptables se puede decir, que el grupo A presenta unos valores óptimos (18,5-21,99) para la realización de ejercicio (Tabla 13).

RESULTADOS

Tabla 14. Correlaciones entre los principales parámetros relacionados con el control metabólico de los individuos del grupo A y el grupo S, incluyendo la frecuencia con la que se realizaba actividad física.

Tiempo 0 (inicio del estudio)					
	1	2	3	4	5
1. HbA1c		-,573*	,827**	-,528*	-,018
2. Péptido C			-,461	,579**	-,320
3. U. Kg/peso				-,502*	-,070
4. Frecuencia AF					,042
5. Carbonilos proteicos					
Tiempo 1 (fin del primer año)					
	1	2	3	4	5
1. HbA1c		-,323	,545*	-,680**	,279
2. Péptido C			-,423	,242	-,090
3. UI/Kg peso				-,810**	,089
4. Frecuencia AF					-,298
5. Carbonilos proteicos					
Tiempo 2 (fin del segundo año)					
	1	2	3	4	5
1. HbA1c		-,449	,768**	-,798**	,412
2. Péptido C			-,334	,507	,278
3. UI/Kg peso				-,884**	,384
4. Frecuencia AF					-,248
5. Carbonilos proteicos					

(**)La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

(*)La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).

Abreviaturas: Frecuencia AF, frecuencia de la actividad física; UI, unidades internacionales; U/Kg, unidades por kilogramo.

Además, se realizó el análisis de correlación de Pearson para establecer relaciones entre los parámetros anteriormente medidos. Dicho análisis reveló que la cantidad promedio de insulina inyectada medida en unidades internacionales por kilogramo de peso corporal (UI/kg peso), se correlaciona moderadamente con los niveles HbA1c al final del primer año ($r= 0,545$) y muy posiblemente, al final del segundo año en el grupo A ($r= 0,768$). Sin embargo, hay menor correlación entre las necesidades de insulina y los niveles de péptido C al final del primer ($r= -0,423$) y segundo ($r= -0,334$) año (Tabla 14).

Como reflejan los niveles bajos de HbA1c, parece que el adecuado control glucémico puede ser un determinante para reducir las necesidades de insulina y el ejercicio regular parece ser un instrumento para conseguir este objetivo. Para verificar esta suposición, se incluyó en el análisis de correlaciones la frecuencia de ejercicio. Los niveles de HbA1c se correlacionan como se puede observar con la frecuencia de actividad física, siendo esta correlación moderada en el momento del inicio ($r= -0,528$) y al final del primer año ($r= -0,680$), pero buena al final del segundo año ($r= -0,798$). Tal y como se esperaba, la correlación entre la frecuencia de ejercicio y las necesidades de insulina evolucionaron positivamente, siendo $r= -0,502$ en el momento del inicio, $r= -0,810$ al final del primer año y $r= -0,884$ al final del segundo año. Sin embargo, la correlación fue moderada o menor cuando se compara la frecuencia de ejercicio con los niveles de péptido C, siendo $r= 0,579$ en el momento del inicio, $r= 0,242$ al final del primer año y $r= 0,507$ al final del segundo (Tabla 14).

En conjunto, todos estos resultados enfatizan la existencia de una fase de luna de miel extendida cuando se practica una actividad física regular, demostrada por la evolución positiva de diferentes parámetros, en particular los niveles de HbA1c. Con la finalidad de entender si otros parámetros podrían estar modulados por el ejercicio regular se estudiaron dos parámetros (niveles de citoquinas inflamatorias y antiGAD) (Tablas 15, 16a, 16b, 17a y 17b) relacionados con la respuesta inflamatoria e inmunológica que aparece en una enfermedad de tipo autoinmune como es la diabetes tipo1 (ver el siguiente apartado).

I.2. Parámetros relacionados con el estado inmunológico e inflamatorio de los sujetos del grupo A y S.

La diabetes tipo 1 es una enfermedad autoinmune que supone la destrucción de un tipo celular (la célula β del páncreas endocrino) lo que desencadena una respuesta inflamatoria en el organismo, que se puede determinar midiendo los niveles circulantes de citoquinas inflamatorias (ver Introducción). La respuesta inflamatoria, juega un papel fundamental en la progresión y severidad de la enfermedad (*van Belle, Coppieters & von Herrath, 2011*).

El proceso autoinmune ocurre porque ciertas proteínas de la propia célula β pancreática son reconocidas como desencadenantes antigénicos, es decir, reconocidas como proteínas extrañas para el organismo, lo que despierta la respuesta inmune. En particular, se determinaron los niveles de anticuerpos contra el antígeno GAD (Tabla 15), uno de los anticuerpos más frecuentes en la diabetes tipo 1 (*Ludvigsson, 2009*) y los niveles de citoquinas, las cuales se encuentran detalladas en las tablas 16a (citoquinas proinflamatorias) y 16b (citoquinas antiinflamatorias) en forma de rangos y expresada como la media \pm esm, en las tablas 17a y 17b, (citoquinas pro y antiinflamatorias, respectivamente).

Tabla 15. Rangos de antiGAD en los grupos A y S a lo largo del tiempo.

	Grupo A	Grupo S
AntiGAD (U/ml)		
Tiempo 0 (inicio del estudio)	<1 – 34	1,2 – >30
Tiempo 1 (fin del primer año)	<1 – 11,4	3,3 – >30
Tiempo 2 (fin del segundo año)	<1 – 10,2	1,9 – >30

No todos los individuos presentaban antiGAD positivos en la circulación. En el grupo A, tres de los ocho individuos presentaron valores antiGAD menores de 1U/ml, mientras en el grupo S, un individuo no presentó antiGAD al debutar en la enfermedad. Para el resto de los individuos con valores positivos para el anticuerpo, los valores antiGAD variaron mucho, oscilando 2-34U/ml en el grupo A y 1,2->30U/ml en el grupo S. Debido a esta alta variabilidad, lo cual suele ser frecuente en enfermedades autoinmunes, los datos de la tabla 14 se expresan en forma de rangos. De forma individual, se observó que los valores antiGAD se mantuvieron sin apenas cambios a lo largo de todo el periodo estudiado. Hay que mencionar dos excepciones entre los individuos del grupo A, el primero presentó un descenso de antiGAD en la circulación que fue de 3,9U/ml en el momento del inicio a 2U/ml el final del segundo año. El segundo individuo se detalla en la intervención 2. Este sujeto presentó al inicio del estudio un nivel de 2U/ml de antiGAD y al final del primer año desapareció la presencia de este anticuerpo. En los análisis del segundo año, el sujeto tampoco presentó ningún valor antiGAD. En el grupo S dos individuos presentaron un descenso, el primero de 30U/ml en el momento del inicio a 6,4U/ml al final del segundo año, y de 4,7 a 1,9U/ml para el segundo individuo en el mismo periodo de tiempo. En conjunto, los resultados obtenidos no permiten establecer una correlación entre la frecuencia de ejercicio practicado y los niveles circulantes de antiGAD. Si bien, sí se puede observar de forma general niveles superiores de antiGAD en los individuos que no realizaban ejercicio físico.

RESULTADOS

Tabla 16a. Rangos, expresados en ng/ml, de citoquinas proinflamatorias de los grupos A y S a lo largo del tiempo.

Citoquinas	Tiempo 0 (inicio)		Tiempo 1 (final 1 ^{er} año)		Tiempo 2 (final 2 ^o año)	
	Grupo A	Grupo S	Grupo A	Grupo S	Grupo A	Grupo S
IL-1β	0-31,35	0-85,48	0-77,68	0-20,90	0	0
IL-9	0-76,72	0-300,14	0-102,79	0-361,89	0-137,17	0-876,57
IL-12p70	0-0,56	0-9,47	0-4,33	0-2,81	0	0
IL-17a	0-13,80	0-83,34	0-17,68	0-57,39	0-8,00	0,49-17,41
IFN-γ	0-2,56	0-11,95	0-7,61	0-3,51	0	0-1,86
TNF-α	0-35,20	0-57,25	0-34,23	0-27,69	0	0-19,83

Abreviaturas: IL, interleuquina; IFN, interferón; TNF, factor de necrosis tumoral.

Tabla 16b. Rangos expresados en ng/ml, de citoquinas antiinflamatorias de los grupos A y S a lo largo del tiempo.

Citoquinas	Tiempo 0 (inicio)		Tiempo 1 (final 1 ^{er} año)		Tiempo 2 (final 2 ^o año)	
	Grupo A	Grupo S	Grupo A	Grupo S	Grupo A	Grupo S
IL-2	0-64,09	0-247,74	0-62,99	0-117,89	0-51,32	0-51,32
IL-4	0-27,66	0-95,74	0-61,95	0-45,92	0-13,83	0
IL-5	0	0-2,18	0	0	0	0
IL-10	0-0,96	0-8,18	0-6,55	0	0	0-1,44
IL-13	0	0-61,73	0-61,73	0-55,99	0	0
IL-22	0-282,26	0-348,44	0-552,67	0-324,76	0	0-282,26

Abreviaturas: IL, interleuquina.

Tabla 17a. Medias \pm esm, expresados en ng/ml, de citoquinas proinflamatorias de los grupos A y S a lo largo del tiempo.

Citoquinas	Tiempo 0 (inicio)		Tiempo 1 (final 1 ^{er} año)		Tiempo 2 (final 2 ^o año)	
	Grupo A	Grupo S	Grupo A	Grupo S	Grupo A	Grupo S
IL-1β	20,70 \pm 42,59	11,23 \pm 27,35	28,71 \pm 50,78	1,90 \pm 6,30	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
IL-9	35,38 \pm 53,92	61,57 \pm 113,88	42,03 \pm 50,01	70,70 \pm 128,92	36,49 \pm 59,60	209,63 \pm 379,68
IL-12p70	0,08 \pm 0,21	1,02 \pm 2,70	2,51 \pm 5,01	0,63 \pm 1,05	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
IL-17a	26,13 \pm 59,03	15,11 \pm 25,35	27,69 \pm 52,51	12,22 \pm 16,18	8,40 \pm 14,17	7,40 \pm 6,66
IFN-γ	2,40 \pm 4,77	2,00 \pm 3,41	4,00 \pm 7,76	1,26 \pm 1,41	1,15 \pm 2,57	0,40 \pm 0,81
TNF-α	13,76 \pm 13,91	16,06 \pm 17,80	16,90 \pm 32,24	10,97 \pm 12,74	0,00 \pm 0,00	7,43 \pm 10,22

Abreviaturas: IL, interleuquina; IFN, interferón; TNF, factor de necrosis tumoral.

Tabla 17b. Medias \pm esm, expresados en ng/ml, de citoquinas antiinflamatorias de los grupos A y S a lo largo del tiempo.

Citoquinas	Tiempo 0 (inicio)		Tiempo 1 (final 1 ^{er} año)		Tiempo 2 (final 2 ^o año)	
	Grupo A	Grupo S	Grupo A	Grupo S	Grupo A	Grupo S
IL-2	21,76 \pm 27,94	34,23 \pm 71,47	45,21 \pm 57,46	19,67 \pm 38,13	19,20 \pm 26,39	19,20 \pm 26,40
IL-4	14,60 \pm 24,04	26,82 \pm 29,74	26,04 \pm 36,48	17,85 \pm 15,85	11,07 \pm 14,53	0,00 \pm 0,00
IL-5	0,09 \pm 0,26	0,18 \pm 0,62	4,31 \pm 11,40	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00
IL-10	0,13 \pm 0,36	0,92 \pm 2,43	4,45 \pm 9,21	0,00 \pm 0,00	0,00 \pm 0,00	0,48 \pm 0,58
IL-13	0,00 \pm 0,00	8,14 \pm 19,79	20,82 \pm 36,13	11,63 \pm 20,62	6,61 \pm 14,78	0,00 \pm 0,00
IL-22	84,08 \pm 143,76	216,68 \pm 133,78	137,99 \pm 239,07	131,30 \pm 151,98	57,04 \pm 127,55	165,21 \pm 150,88

Abreviaturas: IL, interleuquina.

El último parámetro estudiado fueron las citoquinas. Las citoquinas seleccionadas fueron aquellas que conforme a la literatura científica estaban involucradas en las lesiones de las células β en humanos y modelos animales con diabetes tipo 1 (*Rabinovitch & Suarez-Pinzon, 2003; Ludvigsson, 2009*). La idea era estudiar si la actividad física podría modular los niveles de citoquinas circulantes en sujetos con diabetes tipo 1. Cuando se analizaron individualmente, se descubrió que hay una gran variabilidad entre los individuos. Esto era de esperar, ya que las citoquinas son secretadas en respuesta a una gran variedad de factores estresantes, tanto internos como externos. La diabetes tipo 1 es una enfermedad multifactorial, presentando muchos factores de estrés (algunos desconocidos), lo que hace que cada sujeto adopte una respuesta inflamatoria particular. Esto no permitió realizar un análisis estadístico convencional, pero la expresión de los datos en forma de rangos de valores permitió observar algunas tendencias (*Tablas 16a y 16b*). No obstante, los datos se muestran también en forma de medias \pm esm (*Tablas 17a y 17b*).

En el momento del inicio de la enfermedad (tiempo 0), la mayoría de las citoquinas analizadas presentaron un rango similar de variabilidad en los individuos del grupo A y S, incluyendo IL-2, IL-4, IL-5, IL-9, IL-17a, TNF- α y IFN- γ . Otras citoquinas, tales como IL-10, IL-12p70 y IL-13 presentaron un cierto rango de variabilidad en el grupo S siendo casi indetectables en el grupo A. Finalmente, los niveles de IL-1 β fueron más variados en el grupo A que en el S. Además, el grupo S presentó mayores valores para IL-22 que el grupo A, siendo esta diferencia casi significativa ($p < 0,09$).

Al final del primer año, los niveles de IL-9 se mantuvieron con la misma tendencia observada a tiempo 0. Para el resto de las citoquinas, el grupo A presentaba una más amplia variabilidad que el grupo S. Además, se pudo observar que el rango de las citoquinas tanto proinflamatorias como antiinflamatorias en el grupo A aumentaba o se mantenía tras el primer año, mientras que en el grupo S los rangos disminuían o se mantenían tanto para las citoquinas pro como antiinflamatorias.

Finalmente, al final del segundo año IL-2, IL-17a, IL-22 y IFN- γ recuperan rangos de variabilidad observados a tiempo 0 para los grupos A y S. En este momento, ciertas citoquinas tales como IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-10 y IL-12p70 estaban presentes en niveles muy bajos en ambos grupos. IL-9 y TNF- α mostraron un rango de variabilidad más amplio en el grupo S que en el grupo A, presentando valores más bajos en este último (que van entre 2,5-1,5ng/ml para TNF- α). Lo contrario fue observado para IL-4 y IL-13, las cuales eran más variables en el grupo A al final del segundo año.

El análisis de la evolución del tiempo 0 al primer año reveló al menos diferencias casi significativas para citoquinas específicas tales como, IL-4 en el grupo A ($p < 0,08$) y IL-22 en el grupo S ($p < 0,08$). La citoquina IL-6 aunque se analizó, no aparece en las tablas ya que su valor estuvo por debajo del límite de detección de la técnica en ambos grupos de estudio.



II. INTERVENCIÓN 2.

La finalidad de esta intervención fue evaluar los efectos de realizar actividad física y dieta sobre el estado metabólico e inflamatorio de un sujeto debutante como diabético tipo 1 con remisión posterior, al que se le va a identificar como SCA (sujeto caso aislado) (ver Materiales y Métodos, Intervención 2).

Se estudiaron para ello los mismos parámetros que en la Intervención 1, parámetros relacionados con el estado metabólico (Tabla 18a y 18b) y el estado inflamatorio-inmunológico (Tablas 19, 20a y 20b), y los datos obtenidos se comparan con los de ésta. Para realizar mejor esta comparación, algunos datos obtenidos para los sujetos de los grupos A y S se expresan como la media \pm esm, al igual que en forma de rangos.

Las determinaciones se realizaron en el momento del inicio, después de un año y a los dos años (ver Material y Métodos, Intervención 2 para más detalles) de debutar en la enfermedad.

II.1. Parámetros relacionados con el control metabólico de la diabetes tipo 1 en ASC.

Tabla 18a. Parámetros relacionados con el control del estado metabólico de los individuos de los grupos A y S (expresados en forma de rangos), y del sujeto SCA a lo largo del tiempo.

Parámetros (unidades)	Grupo A	Grupo S	SCA
Tiempo 0 (inicio del estudio)			
HbA1c (%)	6,10-14	7,8-18,1	4,70
Insulina inyectada (UI/Kg de peso)	0-0,94	0,25-1,06	0
Insulina inyectada (UI totales)	0-56	18-77	0
Péptido C (pmol/l)	0,23-2,28	0,10-0,6	1,40
IDAA1c	6,10-14	7,8-18,1	4,70
IMC (kg/m ²)	16-26,20	17,90-27	18,00
Carbonilos proteicos (μmol/l)	43,64-162,42	59,24-98,33	55,61
Tiempo 1 (fin del primer año)			
HbA1c (%)	5,50-6,90	5,50-12,20	5,30
Insulina inyectada (UI/Kg de peso)	0,06-0,12	0,16-1,02	0
Insulina inyectada (UI totales)	2-10	10-75	0
Péptido C (pmol/l)	0,60-1,17	0,28-1,28	2,42
IDAA1c	5,50-6,90	5,50-12,20	5,30
IMC (kg/m ²)	16,60-26,20	20-30	18,00
Carbonilos proteicos (μmol/l)	68,18-96,36	66,67-126,06	90,00
Tiempo 2 (fin del segundo año)			
HbA1c (%)	5,50-7,2	5,80-11	5,60
Insulina inyectada (UI/Kg de peso)	0,14-0,21	0,3-1,02	0
Insulina inyectada (UI totales)	4-13	16-58	0
Péptido C (pmol/l)	0,68-4,6	0,3-1,20	1,70
IDAA1c	5,50-7,2	5,80-11	5,60
IMC (kg/m ²)	16,80-25,10	19,80-31	19,90
Carbonilos proteicos (μmol/l)	59,39-111,52	80-110,15	87,88

Abreviaturas: HbA1c, hemoglobina glucosilada; IDAA1c, índice de HbA1c ajustado a la insulina; UI, unidades internacionales.

Tabla 18b. Parámetros relacionados con el control del estado metabólico de los individuos de los grupos A y S (expresados en forma de medias \pm esm), y del sujeto SCA a lo largo del tiempo.

Parámetros (unidades)	Grupo A	Grupo S	SCA
Tiempo 0 (inicio del estudio)			
HbA1c (%)	9,57 \pm 3,47	12,68 \pm 2,83	4,70
Insulina inyectada (UI/Kg de peso)	0,48 \pm 0,38	0,72 \pm 0,27	0
Insulina inyectada (UI totales)	31,71 \pm 9,74	44,67 \pm 5,25	0
Péptido C (pmol/l)	1,09 \pm 0,76	0,37 \pm 0,13	1,40
IDAA1c	11,50 \pm 4,95	15,02 \pm 3,03	4,70
IMC (kg/m ²)	20,80 \pm 1,42	22,37 \pm 0,71	18
Carbonilos proteicos (μmol/l)	76,19 \pm 40,62	75,64 \pm 12,43	55,61
Tiempo 1 (fin del primer año)			
HbA1c (%)	6,12 \pm 0,64	7,96 \pm 1,80	5,30
Insulina inyectada (UI/Kg de peso)	0,07 \pm 0,04	0,54 \pm 0,25	0
Insulina inyectada (UI totales)	5,43 \pm 1,29	35,83 \pm 5,15	0
Péptido C (pmol/l)	1,07 \pm 0,68	0,67 \pm 0,39	2,42
IDAA1c	6,18 \pm 0,61	10,23 \pm 1,90	5,30
IMC (kg/m ²)	21,40 \pm 1,33	24,41 \pm 1,08	18
Carbonilos proteicos (μmol/l)	80,73 \pm 10,28	87,49 \pm 19,25	90
Tiempo 2 (fin del segundo año)			
HbA1c (%)	6,20 \pm 0,75	8,50 \pm 1,96	5,60
Insulina inyectada (UI/Kg de peso)	0,14 \pm 0,07	0,61 \pm 0,29	0
Insulina inyectada (UI totales)	7,67 \pm 1,94	37,50 \pm 6,53	0
Péptido C (pmol/l)	1,87 \pm 1,58	0,67 \pm 0,37	1,70
IDAA1c	6,72 \pm 0,92	10,96 \pm 2,28	5,60
IMC (kg/m ²)	21,57 \pm 1,25	24,06 \pm 1,12	19,90
Carbonilos proteicos (μmol/l)	88,48 \pm 19,67	91,87 \pm 12,56	87,88

Abreviaturas: HbA1c, hemoglobina glucosilada; IDAA1c, índice de HbA1c ajustado a la insulina; UI, unidades internacionales.

La hemoglobina glucosilada (HbA1c) del sujeto SCA se encuentra por debajo de la media comparado tanto con el grupo A como con el grupo S para los tres tiempos de estudio. Aunque en el segundo año estas diferencias se hacen menos evidentes, el sujeto SCA continúa manteniendo valores por debajo del grupo A y S. Además, al comienzo del estudio el sujeto SCA muestra valores de HbA1c óptimos según las recomendaciones de la American Diabetes Association (ADA) (Tablas 18a y 18b). Al final del primer y segundo año, aunque los niveles de HbA1c en SCA aumentan, estos continúan por debajo del 6,5% como recomienda la ADA para la reducción de las complicaciones cardiovasculares (*American Diabetes Association, 2010*).

Los niveles circulantes de péptido C del sujeto SCA en el momento del debut se encuentran por encima de la media de los individuos del grupo A y S, que en general presentan niveles inferiores de péptido C. Las diferencias entre grupos se hicieron todavía más evidentes al final del primer año, cuando el valor de péptido C de SCA superaba en más del doble los niveles del grupo A y hasta cuatro veces los valores medios de péptido C del grupo S (Tabla 18a). La concentración de péptido C al final del estudio, aunque disminuyó con respecto al primer año, siguió manteniéndose elevada en comparación principalmente con el grupo S. El péptido C es un indicador de la masa residual de célula β pancreática (*Colin & Dayan, 2009*), aunque las nuevas directrices sugieren una nueva fórmula para determinar la funcionalidad de las células β residuales, IDAA1c (*Mortensen et al., 2009*), que relaciona la HbA1c con la insulina inyectada (ver Introducción para más detalles). Teniendo en cuenta que la insulina inyectada es 0, los valores IDAA1c del sujeto SCA coincidirían con los valores de la HbA1c. Por tanto, y como es lógico, estos valores de IDAA1c se encuentran muy por debajo de 9.

Los niveles de IDAA1c por debajo de 9 y el hecho de que el sujeto no se inyecte insulina ponen en evidencia la existencia de una significativa masa de célula β residual en el sujeto SCA. Esta masa parece suficiente para que SCA no necesite inyecciones de insulina exógena, aunque los niveles de péptido C y hemoglobina no difieran mucho de los del grupo A al final del primer y segundo año.

El análisis de carbonilos proteicos también se tuvo en cuenta en esta intervención por los motivos ya explicados en la Intervención 1. No se encontraron datos relevantes en los niveles de carbonilos del sujeto SCA, aunque hay que señalar que los niveles de carbonilos se asemejan más a los valores medios del grupo A, los cuales tienden a ser ligeramente menores que los del grupo S.

El IMC, revela que el sujeto está por debajo de las recomendaciones de la OMS. Valores inferiores a 18,5 se consideran bajo peso. El sujeto SCA presenta un IMC de 18 tanto al debut de la enfermedad como al finalizar el primer año, estando este por debajo del IMC medio de los sujetos del grupo A y S. Al final del segundo año el individuo SCA aumenta su IMC, el cual se sitúa en 19,5, considerado por la OMS como un estado de normopeso y estando dentro de los valores que esta organización recomienda. No obstante, el IMC del sujeto SCA al final del segundo año continua estando por debajo del IMC medio del grupo A ($21,57 \pm 1,25$) y del grupo S ($24,06 \pm 1,12$) (Tabla 18b).



II.2. Parámetros relacionados con el estado inmunológico e inflamatorio del sujeto SCA.

Tabla 19. Rangos de antiGAD de los grupos A y S, comparados con SCA a lo largo del tiempo.

	Grupo A	Grupo S	SCA
AntiGAD (U/ml)			
Tiempo 0 (inicio del estudio)	<1 – 34	1,2 – >30	2.00
Tiempo 1 (fin del primer año)	<1 – 11,4	3,3 – >30	negativo
Tiempo 2 (fin del segundo año)	<1 – 10,2	1,9 – >30	negativo

Como ya se ha mencionado en el apartado anterior, la respuesta inmunológica e inflamatoria es fundamental en el desarrollo de la diabetes. En este contexto, el sujeto SCA presentó al inicio de la enfermedad un valor antiGAD de 2U/ml. Interesantemente, al final de primer año y al concluir el estudio al segundo año, los niveles de antiGAD dieron negativo. Es de mencionar, que hubo otro caso en el grupo S en el que el individuo tampoco presentó antiGAD al debut de la enfermedad, pero sí en los posteriores tiempos del estudio. Además, en el grupo A aparecieron varios individuos que presentaron valores antiGAD menores a 1U/ml en los tres tiempos de estudio. Aunque en algunos casos los valores de antiGAD disminuyeron, en ninguno, excepto en el sujeto SCA llegaron a desaparecer. Por este motivo, es difícil establecer una relación comparativa entre el sujeto SCA y los grupos A y S.

Tabla 20a. Rangos de citoquinas proinflamatorias (expresadas en ng/ml) de los grupos A y S, comparadas con SCA a lo largo del tiempo.

Citoquinas	Grupo A	Grupo S	SCA
Tiempo 0 (inicio del estudio)			
IL-1 β	0-31,35	0-85,48	113,59
IL-9	0-76,72	0-300,14	140,95
IL-12p70	0-0,56	0-9,47	0
IL-17a	0-13,80	0-83,34	159,57
IFN- γ	0-2,56	0-11,95	13,03
TNF- α	0.0-35,20	0-57,25	41,52
Tiempo 1 (fin del primer año)			
IL-1 β	0-77,68	0-20,90	123,33
IL-9	0-102,79	0-361,89	107,56
IL-12p70	0-4,33	0-2,81	13,28
IL-17a	0-17,68	0-57,39	146,15
IFN- γ	0-7,61	0-3,51	20,39
TNF- α	0-34,23	0-27,69	84,07
Tiempo 2 (fin del segundo año)			
IL-1 β	0	0	0
IL-9	0-137,17	0-876,57	45,30
IL-12p70	0	0	0
IL-17a	0-8,00	0,49-17,41	33,04
IFN- γ	0	0-1,86	5,75
TNF- α	0	0-19,83	0

Abreviaturas: IL, interleuquina; IFN, interferón; TNF, factor de necrosis tumoral.

RESULTADOS

Tabla 20b. Rangos de citoquinas antiinflamatorias (expresadas en ng/ml) de los grupos A y S, comparadas con SCA a lo largo del tiempo.

Citoquinas	Grupo A	Grupo S	SCA
Tiempo 0 (inicio del estudio)			
IL-2	0-64,09	0-247,74	43,55
IL-4	0-27,66	0-95,74	63,89
IL-5	0	0-2,18	0,69
IL-10	0-0,96	0-8,18	0
IL-13	0	0-61,73	0
IL-22	0-282,26	0-348,44	306,30
Tiempo 1 (fin del primer año)			
IL-2	0-62,99	0-117,89	160,68
IL-4	0-61,95	0-45,92	88,93
IL-5	0	0	30,17
IL-10	0-6,55	0	24,60
IL-13	0-61,73	0-55,99	84,03
IL-22	0-552,67	0-324,76	413,27
Tiempo 2 (fin del segundo año)			
IL-2	0-51,32	0-51,32	0
IL-4	0-13,83	0	34,98
IL-5	0	0	0
IL-10	0	0-1,44	0
IL-13	0	0	33,05
IL-22	0	0-282,26	285,22

Abreviaturas: IL, interleuquina.

Al inicio del estudio, las citoquinas analizadas presentaron una alta variabilidad entre los individuos de los grupos A y S. Las citoquinas proinflamatorias IL-9, IL-17a, TNF- α , IFN- γ y IL-1 β se mostraron elevadas en general en el individuo SCA comparadas con el grupo A, ocurriendo lo mismo al final del primer año. Otras citoquinas, tales como IL-10, IL-12p70 e IL-13 fueron casi indetectables en el grupo A e indetectables en SCA. En el caso de las citoquinas antiinflamatorias IL-2, IL-4, IL-5 e IL-22 hubo mucha variabilidad al inicio del estudio y los valores de estas citoquinas estuvieron en SCA por debajo de los valores máximos encontrados en el grupo S.

Al final del primer año, las citoquinas de los grupos A y S presentaron una amplia variabilidad. Sin embargo, se puede observar que en el grupo A los valores de las citoquinas antiinflamatorias aumentan con respecto a los del tiempo 0 (Tabla 20b). Ocurre lo mismo en SCA con las citoquinas IL-10 y IL-13, que en el momento del debut habían sido indetectables. Las citoquinas proinflamatorias parecen mantener niveles estables.

Finalmente, al final del segundo año, las citoquinas proinflamatorias IL-9, IL-17a, TNF- α , IFN- γ , IL-12p70 e IL-1 β disminuyeron con respecto los dos tiempos de estudio anteriores, llegando a ser indetectables IL-1 β , TNF- α e IL-12p70. Ciertas citoquinas antiinflamatorias IL-2, IL-10 e IL-5 pasaron también a ser indetectables en el sujeto SCA (Tabla 20a).

La citoquina IL-6, aunque se incluyó en el listado, no aparece en las tablas ya que su valor estuvo por debajo del límite de detección de la técnica en ambos grupos de estudio.

III. INTERVENCIÓN 3.

La tercera intervención consistió en la evaluación de los parámetros metabólicos e inflamatorios de un sujeto diabético tipo 1 que practicaba actividades extremas, al que se le llamará AD (Astronauta diabético).

Este sujeto era alpinista profesional, siendo el primer diabético tipo 1 en realizar el circuito de las siete cimas (“Seven Summits”). Este circuito consiste en subir a los picos más altos de los seis continentes, desdoblando el continente americano en América del Norte y América del Sur. Las siete cimas son por orden de altitud: Everest en Asia (8.848m), Aconcagua en América del Sur (6.962m), McKinley en América del Norte (6.198m), Kilimanjaro en África (5.893m), Elbrus en Europa (5.642m), Macizo Vinson en la Antártida (4.892m) y Pirámide de Carstensz en Oceanía (4.884m). AD también fue el primer diabético que realizó la travesía del Polo Norte y del Polo Sur.

Debido a los continuos viajes y la alimentación descontrolada característica de este tipo de expediciones, AD presentaba una diabetes descompensada, sufriendo un coma diabético en su última expedición al Polo Norte. Este acontecimiento le hizo apartarse de su actividad alpinista, pero en 2009 fue seleccionado por la empresa Virgin Galactic para ser el primer astronauta diabético de la historia de la humanidad. AD, ha recibido financiación para desarrollar un nuevo software de telemedicina que permita el control metabólico de la diabetes en el espacio, incluyendo la respuesta inflamatoria. Esto obligó a AD a ordenar su rutina de entrenamiento, así como su dieta. En este contexto, AD ha superado sin problemas pruebas de aceleración, ingravidez y pilotaje con el propósito de salir al espacio en una misión de 24 horas, programada en un principio para finales de 2017.

Nuestro equipo de investigación, se interesó en ver si el nuevo plan de entrenamiento programado por la NASA conjuntamente con la nutrición diseñada por nuestro equipo, había logrado una buena adaptación a las situaciones extremas que se viven en las pruebas de la NASA y el futuro viaje al espacio. Los parámetros medidos

se han comparado con una situación más descontrolada que AD solía sufrir, cuando realizaba actividades de alpinismo extremo, donde la dieta era más difícil de compensar y la actividad física se realizaba en condiciones de hipoxia.

Para obtener información de su perfil metabólico, así como de su estado de salud y su control de la diabetes, se realizaron dos analíticas sanguíneas a AD, una antes de realizar un “trekking” al campo base del Everest y la segunda al regreso de dicho “trekking”. También se realizaron analíticas sanguíneas, antes de realizar unas pruebas de aceleración en el laboratorio de la NASA, y al finalizar dichas pruebas. Aunque diferentes, ambas situaciones se pueden considerar extremas, con la diferencia de que las pruebas de aceleración se realizaron bajo un estricto control de entrenamiento, nutricional e insulínico, comparado con el “trekking” al campo base del Everest.

Mediante las analíticas se estudiaron diferentes parámetros, eritrocitarios, leucocitarios, plaquetarios y bioquímicos (Tablas 21a y 21b, 22a y 22b, 23a y 23b, 24a y 24b) antes y después de cada una de las dos actividades extremas que AD realizó durante el periodo de estudio. Además, se analizaron otros parámetros relacionados con el desequilibrio oxidativo (carbonilos proteicos) (tabla 25) y con el estado inflamatorio (citoquinas) (tabla 26a y 26b) de AD.

III.1. Parámetros hematológicos y bioquímicos del sujeto AD.

Los valores eritrocitarios, leucocitarios, plaquetarios y bioquímicos pueden verse modificados por actividades físicas intensas o situaciones de mucho estrés. Por otro lado, en deportes como el alpinismo, los niveles bajos de oxígeno hacen que el control de estos parámetros sea de relevancia, además de servir para dar una visión del estado general del sujeto AD.

Tabla 21a. Valores eritrocitarios pre y post actividad de “trekking” al campo base del monte Everest del sujeto AD.

	Pre-“trekking” (preTk)	Post-“trekking” (postTk)
Parámetros eritrocitarios (unidades)		
Eritrocitos ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	5,3	5,5
Hemoglobina (g/dl)	16,2	15,9
Hematocrito (%)	47,2	48,3
VCM (fl)	89	88
HCM (pg)	30,5	28,9
CHCM (g/dl)	34,2	33
RDW (%)	12,4	13,4

Abreviaturas: VCM, volumen corpuscular medio; HCM, hemoglobina corpuscular media; CHCM, concentración de hemoglobina corpuscular media; RDW, banda/rango de distribución de hematíes (red cell distribution width).

RESULTADOS

Tabla 21b. Valores eritrocitarios pre y post prueba de aceleración del sujeto AD.

	Pre-aceleración (preAc)	Post-aceleración (postAc)
Parámetros eritrocitarios (unidades)		
Eritrocitos ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	5,7	5,2
Hemoglobina (g/dl)	16,1	15,5
Hematocrito (%)	50,5	45,3
VCM (fl)	89	87
HCM (pg)	28,3	29,8
CHCM (g/dl)	31,8	34,2
RDW (%)	13,9	14,2

Abreviaturas: VCM, volumen corpuscular medio; HCM, hemoglobina corpuscular media; CHCM, concentración de hemoglobina corpuscular media; RDW, banda/rango de distribución de hematíes (red cell distribution width).

En cuanto a los parámetros eritrocitarios, se puede observar que el número de eritrocitos aumentó, como era de esperar, tras la realización del “trekking” al campo base del Everest ($5,3-5,5 \times 10^6/\text{mm}^3$), mientras que tras la prueba de aceleración disminuyeron ($5,7-5,2 \times 10^6/\text{mm}^3$). Todos estos valores se encuentran dentro de los rangos normales para personas adultas: $4,4-5,9 \times 10^6/\text{mm}^3$. Los valores de hemoglobina se encontraban dentro de los parámetros considerados normales (14-18g/dl), aunque se puede observar un descenso del nivel de hemoglobina en las muestras tomadas tras la prueba de aceleración (16,1-15,5g/dl). El hematocrito también se encontraba dentro de unos valores normales (40-52%). Si bien, el aumento postTK (47,2-48,3%) pudiera estar ligado a la altitud a la que estuvo sometido el sujeto AD durante la actividad de “trekking”. El hematocrito disminuyó tras la postAc (50,5-45,3%). El VCM (volumen corpuscular medio), medida que sirve para conocer si el tamaño de los eritrocitos, es normal en todos los momentos de estudio (entre 80-100fl), confirmando que AD no experimentó cambios notables en este parámetro. Además, este dato se completa con el

contenido de hemoglobina corpuscular (valores normales: 26-34pg) y con la concentración media de hemoglobina corpuscular (CHCM, valores normales: 32-36g/dl). Este último parámetro mide la cantidad de hemoglobina que contienen los eritrocitos recién formados, observándose un ligero descenso en postTk, 31,8g/dl.

Tabla 22a. Valores leucocitarios pre y post actividad de “trekking” al campo base del Everest del sujeto AD.

	Pre-“trekking” (preTk)	Post-“trekking” (postTk)
Parámetros leucocitarios (unidades)		
Leucocitos (x10 ³ /mm ³)	5,4	7,6
Neutrófilos (x10 ³ /mm ³)	3,1	5,2
Linfocitos (x10 ³ /mm ³)	1,6	1,5
Monocitos (x10 ³ /mm ³)	0,5	0,7
Eosinófilos (x10 ³ /mm ³)	0,1	0,1
Basófilos (x10 ³ /mm ³)	0,1	0,1
Neutrófilos (%)	57,9	68,7
Linfocitos (%)	30,1	20
Monocitos (%)	8,5	8,7
Eosinófilos (%)	2,1	1,8
Basófilos (%)	1,4	0,8

RESULTADOS

Tabla 22b. Valores leucocitarios pre y post prueba de aceleración del sujeto AD.

	Pre-aceleración (preAc)	Post-aceleración (postAc)
Parámetros leucocitarios (unidades)		
Leucocitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	6,4	5,7
Neutrófilos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	3,5	3,0
Linfocitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	2,1	2,1
Monocitos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0,4	0,3
Eosinófilos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0,2	0,2
Basófilos ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	0,1	0,1
Neutrófilos (%)	55,2	51,8
Linfocitos (%)	32,8	37,7
Monocitos (%)	6,7	5,4
Eosinófilos (%)	3,8	3,7
Basófilos (%)	1,5	1,4

En cuanto a la serie leucocitaria, se puede observar un aumento del porcentaje de neutrófilos de preTk a postTk (57,9-68,7%), y un descenso de preAc a postAc (51,8-55,2%). Además, tras la actividad de “trekking” los niveles de neutrófilos están por encima de los valores considerados normales (40-60%). Por su parte, los linfocitos se encuentran en todos los tiempos dentro de los parámetros establecidos, si bien es cierto que en postTk los leucocitos suponen un 20%, situándose en el límite inferior de los valores considerados normales (20-40%). Los monocitos están por encima de los parámetros establecido (2-8%) antes y después de la actividad de “trekking” (8,5 y 8,7% respectivamente). Los basófilos también están por encima de los valores establecidos (0,5-1%) en preTk, preAc y postAc (1,4, 1,4, y 1,5% respectivamente).

Tabla 23a. Valores plaquetarios pre y post actividad de “trekking” al campo base del monte Everest del sujeto AD.

	Pre-“trekking” (preTk)	Post-“trekking” (postTk)
Serie plaquetaria (unidades)		
Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	278	329
Volumen plaquetario medio (fl)	8,4	9

Tabla 23b. Valores plaquetarios pre y post prueba de aceleración del sujeto AD.

	Pre-aceleración (preAc)	Post-aceleración (postAc)
Serie plaquetaria (unidades)		
Plaquetas ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	389	262
Volumen plaquetario medio (fl)	9,3	9,2

En cuanto a la serie plaquetaria, se puede observar que el número de plaquetas es normal, apreciándose un aumento tras la actividad de “trekking” al campo base del Everest ($278\text{-}329 \times 10^3/\text{mm}^3$) y un descenso tras finalizar la prueba de aceleración. Los valores del volumen plaquetario medio son normales también.

En general, se puede apreciar un aumento de los parámetros eritrocitarios, leucocitarios y plaquetarios postTk, indicando una posible situación de estrés generada por la enfermedad en condiciones de hipoxia. La situación de estos parámetros en la prueba de aceleración se acercó más a la normalidad. Esto podría ser debido a un mejor control en el entrenamiento, dieta e inyecciones de insulina en esta última situación.

RESULTADOS

Tabla 24a. Valores bioquímicos pre y post actividad de “trekking” al campo base del monte Everest del sujeto AD.

	Pre-“trekking” (preTk)	Post-“trekking” (postTk)
Parámetros bioquímicos (unidades)		
Glucosa (mg/dl)	94	110
HbA1c (%)	8,7	8,9
HbA1c (mmol/mol)	72	74
Colesterol (mg/dl)	195	193
Colesterol HDL (mg/dl)	86	68
Colesterol LDL (mg/dl)	95	105
Triglicéridos (mg/dl)	71	100
Ácido úrico (mg/dl)	3,2	3,6
Creatinina (mg/dl)	0,83	0,72
Urea (mg/dl)	30	25
GOT/AST (U/l)	35	25
GPT/ALT (U/l)	29	30
GGT (U/l)	41	30
Fosfatasa alcalina (U/l)	89	95
CK (U/l)	283	184
Hierro (µg/dl)	68	43
Ferritina (ng/dl)	66	52
Sodio (mmol/l)	146	142
Potasio (mmol/l)	4,8	4,6
Mioglobina (µg/l)	30,2	26,7
Ácido láctico (mg/dl)	12	15

Abreviaturas: HbA1c, hemoglobina glucosilada; GOT/AST, transaminasa glutámico-oxalacética/aspartato aminotransferasa; GPT/ALT, transaminasa glutámico-pirúvica/alanina aminotransferasa; GGT, gamma glutamil transpeptidasa; CK, creatina quinasa.

Tabla 24b. Valores bioquímicos pre y post prueba de aceleración del sujeto AD.

	Pre-aceleración (preAc)	Post-aceleración (postAc)
Parámetros bioquímicos (unidades)		
Glucosa (mg/dl)	86	109
HbA1c (%)	9,2	8,5
HbA1c (mmol/mol)	77	69
Colesterol (mg/dl)	229	230
Colesterol HDL (mg/dl)	71	79
Colesterol LDL (mg/dl)	95	94
Triglicéridos (mg/dl)	317	283
Ácido úrico (mg/dl)	4	4,1
Creatinina (mg/dl)	0,74	0,73
Urea (mg/dl)	26	33
GOT/AST (U/l)	35	30
GPT/ALT (U/l)	60	37
GGT (U/l)	60	37
Fosfatasa alcalina (U/l)	124	90
CK (U/l)	296	222
Hierro (µg/dl)	84	71
Ferritina (ng/dl)	73	23
Sodio (mmol/l)	148	138
Potasio (mmol/l)	6	4,2
Mioglobina (µg/l)	25,2	31,2
Ácido láctico (mg/dl)	15	15

Abreviaturas: HbA1c, hemoglobina glucosilada; GOT/AST, transaminasa glutámico-oxalacética/aspartato aminotransferasa; GPT/ALT, transaminasa glutámico-pirúvica/alanina aminotransferasa; GGT, gamma glutamil transpeptidasa; CK, creatina quinasa.

RESULTADOS

En cuanto a los parámetros bioquímicos, los niveles de glucosa están elevados con respecto a los valores normales (70-105mg/dl) tras la realización de ambas actividades (“trekking” y prueba de aceleración): postTk (110mg/dl) y postAc (109mg/dl). La HbA1c (hemoglobina glucosilada) también está elevada en los cuatro momentos en los que se tomaron las muestras, sobre todo tras la actividad de “trekking” y antes de la prueba de aceleración, 8,9 y 9,2% respectivamente, comparado con valores normales (5-8%). Valores de HbA1c por encima del 8% junto con unos niveles de glucosa elevados indican un control deficiente de la glucemia por parte de los sujetos diabéticos. El colesterol también se encuentra ligeramente por encima de los valores recomendados (no superar 200mg/ml) en preAc y postAc (229 y 230mg/ml respectivamente). Ocurre lo mismo con los niveles de triglicéridos (no superar los 160mg/dl) con 283mg/dl en preAc y 317mg/dl en postAc. Los niveles de HDL y LDL están dentro de los parámetros establecidos como normales en todos los tiempos del estudio. No obstante, y conforme a los datos aportados por AD, es probable que el cambio en la alimentación del sujeto durante su estancia en la base de la NASA para la realización de la prueba de aceleración, haya alterado estos parámetros puntualmente.

El ácido úrico y la creatinina muestran valores considerados normales. La urea presenta valores normales (23-44mg/dl) e incluso algo bajos, en todos los tiempos de estudio.

La GTP está aumentada en los análisis realizados antes de la prueba de aceleración (60mU/ml), mientras que lo recomendable son valores entre 7-40mU/ml, aunque se puede apreciar un descenso de estos niveles tras la realización de la prueba. En el caso de la GGT ocurre lo mismo.

La CK está por encima de lo recomendado, entre 10 y 170U/l, en todos los momentos en los que se tomaron las muestras, 283 (postTk), 184 (preTk), 222 (postAc) y 296 (preAc) U/l. Estos resultados sugieren que ambas actividades se relacionan con un gran daño muscular, motivo por el que CK puede verse elevada, lo que es habitual por otro lado en deportistas.

Los niveles de ferritina están dentro de los valores normales (15-400ng/ml) en todos los tiempos. Los niveles de sodio y potasio también están dentro de los rangos normales (136-146mmol/l para el sodio y 3,5-5mmol/l para el potasio), aunque los niveles circulantes de potasio aumentaron ligeramente antes de la prueba de aceleración.

La mioglobina (Mb), se encuentra dentro de los parámetros considerados normales (16-76 μ g/l), pero se puede apreciar un descenso de los niveles de preTk a postTk (30,2-26,7 μ g/l) y un aumento de preAc y postAc (25,2-31,2 μ g/l).



III.2. Parámetros relacionados con el estado oxidativo del sujeto AD.

El siguiente paso fue evaluar si estas dos actividades (“trekking” y prueba de aceleración) tuvieron efectos a nivel oxidativo e inflamatorio (Tabla 25).

Tabla 25. Niveles circulantes de carbonilos proteicos en AD en los cuatro momentos del estudio.

	preTk	postTk	preAc	postAc
Carbonilos proteicos (μmol/l)	65,27	87,91	87,00	57,46

En cuanto a los carbonilos de las proteínas, se puede ver un incremento justo después de la actividad de “trekking” y antes de la prueba de aceleración, sugiriendo un aumento del daño oxidativo.

No se observan grandes diferencias entre los cuatro momentos de estudio, pero estos resultados junto con los datos anteriores parecen indicar que la prueba de “trekking” tuvo mayores efectos a nivel metabólico y oxidativo que la prueba de aceleración.

Por último, dado que el ejercicio junto con la diabetes se acompaña de una respuesta inflamatoria, se analizaron diferentes citoquinas (Tabla 26a y 26b).

III.3. Parámetros relacionados con el estado inflamatorio del sujeto AD.

Tabla 26a. Niveles (ng/ml) de citoquinas proinflamatorias en AD.

Citoquinas	preTk	preAc	postAc
IL-1 β	13,23	3,71	3,71
IL-9	0	0	0
IL-12p70	0,86	0,39	0,11
IL-17a	0,34	0,49	0,4
IFN- γ	5,12	3,55	2,07
TNF- α	7,95	5,84	5,07

Abreviaturas: IL, interleuquina; IFN, interferón; TNF, factor de necrosis tumoral.

Tabla 26b. Niveles (ng/ml) de citoquinas antiinflamatorias en AD.

Citoquinas	preTk	preAc	postAc
IL-2	22,33	12,52	10,09
IL-4	9,77	8,76	8,98
IL-5	0,10	0,20	0,33
IL-10	0	0,19	0,87
IL-13	10,01	9,42	10,00
IL22	120,16	269,06	277,43

Abreviaturas: IL, interleuquina.

En cuanto a las citoquinas, hay que mencionar en primer lugar que sólo se pudieron realizar determinaciones en tres de los momentos de estudio. El análisis de las citoquinas se realizó en las muestras tomadas antes de la actividad de “trekking”, antes de la prueba de aceleración y después de la misma.

Las citoquinas proinflamatorias IL-12p70, IFN- γ , IL-17a, IL-1 β , TNF- α se muestran en general más elevadas en la muestra que se tomó antes de la actividad de “trekking” y tienen sus valores más bajos en postAc. No ocurre esto con la IL-17a, la cual se mantiene estable durante los tres momentos de estudio. En el caso de la IL-9, ésta fue indetectable. Fijándonos únicamente en la prueba de aceleración, se puede observar que no hay grandes cambios entre estos dos momentos de estudio y que las citoquinas se mantienen estables sin existir una gran variabilidad.

En el caso de las citoquinas antiinflamatorias y centrándose sólo en la prueba de aceleración, se puede ver que IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e IL-22 aumentan después de la misma. La IL-2 disminuye aunque de forma muy modesta. Con respecto a las muestras tomadas antes de la actividad de “trekking”, se pueden observar niveles aumentados de IL-5, IL-10, IL-13 y IL-22.

IV. INTERVENCIÓN 4.

En la cuarta intervención se evaluaron los efectos de un programa de entrenamiento y dieta sobre el estado metabólico e inflamatorio en un grupo de sujetos adolescentes prediabéticos tipo 2 con resistencia a la insulina, identificados en este estudio como SOA (del inglés, severely obese adolescents). Se estudiaron para ello diferentes parámetros estrechamente relacionados con la enfermedad, y susceptibles de sufrir cambios significativos con mejoras o empeoramientos en el estado de salud.

Las determinaciones realizadas incluyeron parámetros circulantes relacionados con el desequilibrio oxidativo y la inflamación (proteína C reactiva, MDA (malonil dialdehído), MPO (mieloperoxidasa) y carbonilos proteicos) de diferentes células sanguíneas (eritrocitos, neutrófilos y linfocitos), presiones sanguíneas (sistólica y diastólica) conjuntamente con una evaluación macro y microvascular (ver Material y Métodos) y parámetros antropométricos (IMC y circunferencia de la cintura) (Tabla 27a y 27b), enzimas antioxidantes en distintas células sanguíneas (glutación peroxidasa, glutación reductasa, catalasa y superóxido dismutasa) (Tabla 28a y 28b) y parámetros inflamatorios (citoquinas) (Tabla 29).

Como referencia control se tomó un grupo de adolescentes sanos con normopeso, denominado en esta intervención como NW (del inglés, normal weight). Todas estas determinaciones se realizaron al inicio de la intervención y al final de la misma, tras cuatro meses.

IV.1. Parámetros antropométricos, circulantes y vasculares de los grupos NW y SOA.

Tabla 27a. Datos y parámetros antropométricos y circulantes en el grupo NW expresados en media ± esm.

Grupo NW		
Parámetros (unidades)	Tiempo 0 (inicio)	4 meses (final)
Género (chicos/chicas)	9/7	9/7
Edad (años)	15,0 ± 0,5	15,0 ± 0,5
Edad puberal (Tanner)	3,1 ± 0,3	3,7 ± 0,2
Altura (cm)	164,8 ± 4,6	165,0 ± 2,2
Peso (kg)	53,8 ± 3,9	54,7 ± 3,1
IMC (kg/m ²)	19,8 ± 1,2	19,9 ± 0,8
IMC z-score	0,3 ± 0,5	0,1 ± 0,3
Circunferencia de cintura (cm)	68,7 ± 3,5	69,9 ± 2,4
SBP (mmHg)	104,7 ± 6,8	109,0 ± 3,7
DBP (mmHg)	59,8 ± 2,5	62,2 ± 1,7
Leucocitos (cel·mm ⁻³)	6703 ± 836	6322 ± 587
Eritrocitos (cel·mm ⁻³)	4636767 ± 104671	4634930 ± 73000
Linfocitos (cel·mm ⁻³)	1970 ± 120	1906 ± 136
CRP (µg/ml)	0,5 ± 0,3	1,3 ± 0,6
MPO (ng/ml)	32,2 ± 5,5	28,96 ± 2,7
Carbonilos proteicos (µmol/l)	47,7 ± 7,0	48,6 ± 5,2
MDA (µmol/l)	61,0 ± 10,4	56,9 ± 11,2

Abreviaturas: IMC, índice de masa corporal; CRP, proteína C reactiva; DBP, presión sanguínea diastólica; SBP, presión sanguínea sistólica; MDA, malonildialdehído; MPO, mieloperoxidasa.

Tabla 27b. Datos y parámetros antropométricos y circulantes en el grupo SOA expresados en media \pm esm.

Grupo SOA		
Parámetros (unidades)	Tiempo 0 (inicio)	4 meses (final)
Género (chicos/chicas)	9/11	9/11
Edad (años)	14,3 \pm 0,4	14,8 \pm 0,3
Edad puberal (Tanner)	3,2 \pm 0,3	3,3 \pm 0,4
Altura (cm)	161,6 \pm 1,5	162,6 \pm 1,5
Peso (kg)	85,9 \pm 4,0	79,5 \pm 3,49*
IMC (kg/m ²)	32,4 \pm 1,1	29,7 \pm 1,0 *
IMC z-score	4,0 \pm 0,2	3,3 \pm 0,2 *
Circunferencia de cintura (cm)	109,5 \pm 3,6	101,4 \pm 3,5 *
SBP (mmHg)	101,9 \pm 3,0	104,0 \pm 2,5
DBP (mmHg)	57,3 \pm 2,4	59,3 \pm 1,5
Leucocitos (cel·mm ⁻³)	7137 \pm 510	7733 \pm 375
Eritrocitos (cel·mm ⁻³)	5149112 \pm 43766	51137222 \pm 100473
Linfocitos (cel·mm ⁻³)	2659 \pm 210	2834 \pm 166
CRP (μ g/ml)	2,2 \pm 0,8	1,0 \pm 0,5
MPO (ng/ml)	41,8 \pm 4,9	32,3 \pm 3,6*
Carbonilos proteicos (μ mol/l)	84,1 \pm 8,9	78,8 \pm 7,9
MDA (μ mol/l)	108,3 \pm 14,0	100,7 \pm 16,2

(*) Valores significativamente estadísticos ($p < 0.05$) entre el grupo SOA (pre y post intervención).

Abreviaturas: IMC, índice de masa corporal; CRP, proteína C reactiva; DBP, presión sanguínea diastólica; SBP, presión sanguínea sistólica; MDA, malonildialdehído; MPO, mieloperoxidasa.

En la tabla 27a, se encuentran los principales parámetros relacionados con el estado de los sujetos del grupo NW y en la tabla 27b los mismos parámetros para el grupo SOA. Si se comparan dichas tablas, se puede ver que el grupo SOA presenta un peso, un IMC y una circunferencia de cintura muy elevado, lo que indica obesidad. Sin embargo, aparece un descenso significativo en el peso e índice de masa corporal tras los 4 meses de intervención. Aun así, los valores de IMC siguen estando en 29,7 al final del estudio, poniendo de manifiesto que los sujetos siguen teniendo sobrepeso. Posiblemente, sería necesaria una intervención más prolongada en el tiempo para conseguir normalizar estos parámetros. Como ya se ha comentado en apartados anteriores, la OMS recomienda valores de entre 18,5-24,99, para marcar un estado de normopeso de los sujetos.

Tampoco se observaron diferencias significativas en los datos de presión arterial al comparar ambos grupos. No obstante, los sujetos SOA presentaron mayores alteraciones en la macro y microvasculatura a partir de los datos obtenidos con las técnicas de evaluación explicadas en Material y Métodos, Intervención 4. Estos resultados no se muestran, ya que pertenecen a otro proyecto llevado a cabo por otro investigador. Sin embargo, con todo esto se quiere enfatizar que la simple determinación de la presión arterial no refleja los problemas vasculares que aparecen en este grupo de pacientes y que a largo plazo van a predisponer a problemas cardiovasculares severos. La utilización de metodología complementaria es absolutamente necesaria en el tratamiento y seguimiento de personas con resistencia a la insulina, sobre todo si son adolescentes o jóvenes.

En cuanto a los carbonilos proteicos, marcadores de desequilibrio oxidativo, se puede observar una diferencia significativa con respecto al grupo NW, siendo en este último los niveles de carbonilos la mitad que en SOA. También se aprecia un descenso de estos tras los cuatro meses de intervención en el grupo SOA que posiblemente esté relacionado con la pérdida de peso de los sujetos, aunque estas diferencias no son significativas al comparar SOA a lo largo del tiempo. Las mismas diferencias significativas se aprecian con los niveles de MDA al comparar NW con SOA. Los

resultados muestran por tanto, la existencia de un desequilibrio oxidativo asociado a la obesidad confirmando diferencias significativas con respecto a NW en dos marcadores: carbonilos proteicos y MDA.

En cuanto a los valores de PCR y MPO, los niveles de PCR están dentro de los valores de referencia, lo que indica que no existe ningún proceso inflamatorio grave causado por agentes externos. No obstante, la obesidad se correlaciona con un estado inflamatorio más leve, pero persistente, por lo que la determinación de otros marcadores como las citoquinas inflamatorias (Tabla 29), podría arrojar más pistas acerca de esta cuestión (ver más adelante). En cuanto a MPO, se puede observar un descenso significativo de los niveles en el grupo SOA. Dado que MPO es una enzima de los neutrófilos que se activa en procesos inflamatorios, estos resultados indicarían un proceso inflamatorio al inicio de la intervención, con una tendencia a la normalización con el paso del tiempo al comparar con la MPO de NW. Al principio del estudio los valores de MPO fueron $41,8 \pm 4,9$ mientras que a los cuatro meses, coincidiendo con el final del estudio, encontramos niveles de $32,3 \pm 3,6$, valores similares a los del grupo NW ($28,96 \pm 2,7$).

En cuanto a los parámetros eritrocitarios, se puede observar que el número de eritrocitos se mantuvo prácticamente igual al principio que al final de la intervención en el grupo NW y en el grupo SOA. Se encontraron niveles de eritrocitos modesta pero significativamente elevados en SOA al comparar con NW. También SOA presenta linfocitos y leucocitos más elevados, pero las diferencias no son significativas.

IV.2. Actividades de enzimas antioxidantes en los grupos NW y SOA.

Con la idea de completar la información proporcionada por los marcadores de desequilibrio oxidativo medidos anteriormente (carbonilos proteicos y MDA) y entender su evolución en los sujetos diabéticos, se determinaron las actividades de las principales enzimas antioxidantes en linfocitos y eritrocitos (Tabla 28a y 28b). Los eritrocitos son células sin núcleo, cuya vida media es de cuatro meses (justamente el tiempo de la intervención). Los cambios que se observen en las enzimas antioxidantes deben por tanto responder a modificaciones postraduccionales. Por el contrario, los linfocitos son células nucleadas, lo que sugiere que los cambios observados al final de la intervención pueden responder tanto a mecanismos postraduccionales, como transcripcionales. Es decir, relacionados con la expresión de genes.

Tabla 28a. Actividades de las enzimas antioxidantes del grupo NW expresados como media \pm esm.

Grupo NW		
Parámetros (unidades)	Tiempo 0 (inicio)	4 meses (final)
GPX eritrocitos (nKat/g Hb)	4223,7 \pm 243,1	3773,3 \pm 130,7
GPX linfocitos (nKat/10 ⁹ células)	639,7 \pm 142,2	386,7 \pm 42,7
GRD eritrocitos (nKat/g Hb)	5750,8 \pm 1577,4	4209,0 \pm 363,6
GRD linfocitos (nKat/10 ⁹ células)	2260,7 \pm 265,2	1558,0 \pm 118,2*
SOD eritrocitos (nKat/g Hb)	14,5 \pm 2,8	73,0 \pm 4,5*
SOD linfocitos (nKat/10 ⁹ células)	27,6 \pm 5,1	20,2 \pm 3,5
CAT eritrocitos (Kat/g Hb)	104,2 \pm 10,8	83,2 \pm 5,3
CAT linfocitos (Kat/10 ⁹ células)	395,9 \pm 72,7	153,4 \pm 21,2*

(*) Valores significativamente estadísticos ($p < 0.05$) entre el grupo NW (pre y post intervención). Abreviaturas: GPX, glutatión peroxidasa; GRD, glutatión reductasa; Hb, hemoglobina; Kat, katalas; SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa.

Tabla 28b. Actividades de las enzimas antioxidantes del grupo SOA expresadas como la media \pm esm.

Grupo SOA		
Parámetros (unidades)	Tiempo 0 (inicio)	4 meses (final)
GPX eritrocitos (nKat/g Hb)	3810,3 \pm 1445,2	5280,0 \pm 310,1 *
GPX linfocitos (nKat/10 ⁹ células)	361,4 \pm 51,2	501,9 \pm 81,5 *
GRD eritrocitos (nKat/g Hb)	4254,9 \pm 404,4	5366,6 \pm 1286,5 *
GRD linfocitos (nKat/10 ⁹ células)	1540,8 \pm 124,5	1083,8 \pm 123,7*
SOD eritrocitos (nKat/g Hb)	75,2 \pm 5,0	40,0 \pm 7,0 *
SOD linfocitos (nKat/10 ⁹ células)	20,8 \pm 4,4	25,4 \pm 2,7 *
CAT eritrocitos (Kat/g Hb)	77,2 \pm 3,9	84,0 \pm 15,8 *
CAT linfocitos (Kat/10 ⁹ células)	169,6 \pm 21,9	271,6 \pm 65,2

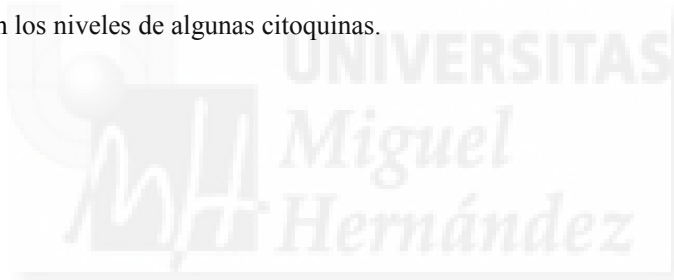
(*) Valores significativamente estadísticos ($p < 0,05$) entre el grupo SOA (pre y post intervención).

Abreviaturas: GPX, glutatión peroxidasa; GRD, glutatión reductasa; Hb, hemoglobina; Kat, katalas (unidades de actividad enzimática); SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa.

En general, todas las enzimas antioxidantes dependientes del glutatión muestran un aumento significativo en los linfocitos y eritrocitos en el grupo SOA cuando se comparan pre y postintervención, excepto GRD en linfocitos, que disminuye significativamente. Por el contrario, las mismas enzimas antioxidantes disminuyen en el grupo NW cuando se comparan los resultados pre y postintervención, aunque este descenso solo es significativo para la catalasa en linfocitos. Los resultados parecen sugerir que las enzimas antioxidantes dependientes el glutatión se activan en los sujetos SOA con la intención de mitigar el daño oxidativo que aparece con la obesidad y que incluso podría verse incrementado al iniciar estos sujetos programas de actividad física.

Además estos cambios no son debidos a fenómenos de expresión génica, ya que las determinaciones de los niveles de ARNm por PCR cuantitativa en linfocitos pre y postintervención, no revelaron diferencias significativas. Como los eritrocitos experimentan una tendencia de cambio similar, se propone como hipótesis que los cambios son postraduccionales, aunque este punto debe ser verificado experimentalmente. En el grupo NW, es posible que se produzca una adaptación del estado antioxidante al ejercicio, por lo que con el paso del tiempo el daño oxidativo sea menor, lo que requiere menos activación de las enzimas antioxidantes. Las restantes enzimas (SOD y catalasa) presentan más variabilidad no ajustándose a ningún patrón concreto en ninguno de los grupos.

Finalmente y con la idea de completar la información del estado inflamatorio, se determinaron los niveles de algunas citoquinas.



IV.3. Parámetros relacionados con el estado inflamatorio de los grupos SOA y NW.

Tabla 29. Rangos de citoquinas en los diferentes tiempos de estudio para el grupo SOA y NW.

Citoquinas	SOA		NW
	Tiempo 0 (inicio)	4 meses (final)	4 meses (final)
Antiinflamatorias			
IL-2	0	0	0-302,03
IL-4	0-68,87	0-43,99	0-37,72
IL-22	0-155,11	0	0-155,10
Proinflamatorias			
IL-1 β	0	0	0
TNF- α	0-16,33	0	0

Abreviaturas: IL, interleuquina; TNF, factor de necrosis tumoral.

Los resultados parecen indicar que las citoquinas medidas no son las que mejor se correlacionen con la inflamación asociada a la obesidad o a la diabetes tipo 2, con lo que es necesario buscar marcadores alternativos. La MPO determinada anteriormente parece mostrar un patrón más claro de cambio. Por otro lado, existe una gran variabilidad para las distintas citoquinas y para los diferentes grupos. La única interpretación que puede hacerse con mucha precaución, es que parece que los sujetos del grupo NW poseen una mejor dotación de citoquinas antiinflamatorias que los sujetos SOA. No obstante, esta es una cuestión que queda abierta para futuras investigaciones.

V. INTERVENCIÓN 5

La finalidad de esta quinta y última intervención fue evaluar el efecto que el ejercicio físico (entrenamiento aeróbico) ejerce sobre la respuesta oxidativa e inflamatoria de sujetos sanos. En otras palabras, la idea sería ver la influencia que tiene la actividad física sola, sin la presencia de una patología, en los parámetros antioxidantes e inflamatorios en sujetos que practican una actividad muy habitual y de moda, como es la carrera de larga distancia. No obstante, los resultados obtenidos en esta intervención no son comparables con el resto de intervenciones, en las que la patología está siempre presente. La idea es recabar información sobre el posible daño inflamatorio que puede provocar la actividad física “per se”, y si esta circunstancia podría agravar la situación inflamatoria que genera la enfermedad. Por esta razón, se ha elegido como ejercicio la carrera a pie, que suele recomendarse habitualmente a los enfermos de diabetes. No se han buscado rutinas que de inicio causaran daño inflamatorio, como pueden ser los ejercicios excéntricos o las pesas con cargas máximas.

Para la intervención se tuvieron en cuenta diferentes parámetros antropométricos (IMC, porcentajes de masa grasa y muscular) (Tabla 30), parámetros hematológicos y bioquímicos (Tabla 31), parámetros circulantes relacionados con el estado oxidativo (MDA, carbonilos proteicos) (Tabla 32), actividades de las principales enzimas antioxidantes (glutatión peroxidasa, glutatión reductasa y superóxido dismutasa) (Tabla 33) y parámetros inflamatorios (citoquinas) (Tabla 34). Las mediciones se realizaron en todos los individuos antes de comenzar la intervención (niveles basales de referencia) y 21 días después. Los voluntarios recibieron el mismo programa de entrenamiento y plan dietético (ver Material y Métodos, Intervención 5). Se realizaron idénticas determinaciones el día 22, tras una prueba de 2000m. Esta prueba suele realizarse para verificar la existencia de mejoras en la condición física, como consecuencia del plan de

RESULTADOS

entrenamiento, pero al mismo tiempo servirá para determinar los efectos agudos del ejercicio en los parámetros oxidativos e inflamatorios.

Los valores circulantes de los diferentes parámetros en los tres tiempos de estudio se muestran en este apartado expresados en formas de rangos o como la media \pm esm. Los valores con una $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.



V.1. Parámetros antropométricos y test 2000 metros del grupo de sujetos de estudio.

Tabla 30. Parámetros antropométricos y resultados del test de 2000m en el grupo de estudio expresados como la media ± esm.

Parámetros (unidades)	Día 1	Día 21
Edad (años)	22 ± 1,5	
Estatura (cm)	176 ± 2,2	
Peso (kg)	71,5 ± 2,8	70,7 ± 2,5
IMC (kg/m ²)	22,5 ± 0,8	22,2 ± 0,6
Masa grasa (%)	14 ± 1,2	14 ± 1,0
Masa muscular (%)	42,5 ± 2,3	41,8 ± 2,2
Test de 2000m		
Tiempo (min)		7,9 ± 0,2
FC (latidos/min)		164,0 ± 7,2

Abreviaturas: FC, frecuencia cardíaca (latidos por minuto), justo al final de la prueba.

Los parámetros antropométricos reflejan que se trata de un grupo de sujetos con un IMC de normopeso, que obedece a lo recomendado por la OMS.

El test de 2000m se realizó dentro del tiempo considerado y la media de latidos por minuto también fue la normal en este tipo de pruebas. Hay que mencionar que todos los sujetos superaban los ocho minutos antes de realizar el plan de entrenamiento propuesto, lo que sugiere que dicho plan homogeneizó la muestra y supuso una mejora en el rendimiento de los participantes.

V.2. Parámetros hematológicos y bioquímicos del grupo de sujetos de estudio.

Tabla 31. Parámetros hematológicos y bioquímicos del grupo de estudio expresados como la media \pm esm.

Parámetros (unidades)	Día 1	Día 21	Día 22
Hemograma			
Eritrocitos (106 cel/ μ l)	5,1 \pm 1,0	5,3 \pm 0,7	5,1 \pm 0,7
Hemoglobina (g/g serum proteína)	2,3 \pm 0,1	2,4 \pm 0,1	2,3 \pm 0,2
Hematocrito (%)	44,3 \pm 0,8	45,6 \pm 0,4	44,9 \pm 0,5
RDW-SD (fl)	41,1 \pm 0,4	40,8 \pm 0,5	40,8 \pm 0,4
Plaquetas (103 cel/ μ l)	230,9 \pm 10,2	225,6 \pm 9,4	221,1 \pm 9,0
Neutrófilos (103 cel/ μ l)	3,0 \pm 0,2	3,5 \pm 0,2	3,2 \pm 0,2
Linfocitos (103 cel/ μ l)	2,2 \pm 0,1	2,3 \pm 0,1	2,1 \pm 0,7
Metabolitos/elementos circulantes			
Glucosa (mg/dl)	79,7 \pm 1,6	85,4 \pm 1,9	83,4 \pm 2,5
Triglicéridos (mg/dl)	70,3 \pm 8,1	71,2 \pm 7,4	59,1 \pm 6,3
Colesterol total (mg/dl)	148,1 \pm 4,6	155,8 \pm 4,8	146,5 \pm 3,8
Creatinina (mg/dl)	0,96 \pm 0,0	0,92 \pm 0,0	0,92 \pm 0,0
Ácido úrico (mg/dl)	4,0 \pm 0,2	4,3 \pm 0,1	4,7 \pm 0,2*†
Urea (mg/dl)	34,1 \pm 1,8	37,8 \pm 2,0	36,2 \pm 1,8
Lactato (mg/dl)	9,0 \pm 0,7	7,8 \pm 0,7	11,9 \pm 1,5*†
Na (mEq/l)	139,0 \pm 0,3	138,7 \pm 0,3	138,7 \pm 0,3
K (mEq/l)	4,2 \pm 0,1	4,3 \pm 0,1	4,2 \pm 0,1
Fe sérico (μ g/dl)	77,0 \pm 82	68,1 \pm 5,6	80,6 \pm 7,8

Proteínas circulantes			
Ferritina (ng/ml)	97,8 ± 13,4	88,2 ± 13,9	80,5 ± 10,0
Mioglobina (ng/ml)	35,4 ± 2,7	28,4 ± 3,1*	41,2 ± 8,0*†
GGT (U/l)	18,8 ± 1,4	17,7 ± 1,0	17,7 ± 1,4
GOT/AST (U/l)	21,0 ± 1,2	23,3 ± 1,1	25,2 ± 1,0
GPT/ALT (U/l)	19,7 ± 1,5	21,8 ± 1,6	22,8 ± 2,0
CK (U/l)	189,7 ± 36,2	205,1 ± 11,9*	295,8 ± 11,7*†
Fosfatasa alcalina (U/l)	149,7 ± 9,3	168,4 ± 10,7	174,0 ± 11,9

(*) Diferencias significativas ($p < 0.05$), del día 21 y 22 comparados con el día 1 según el test de ANOVA.

(†) Diferencias significativas ($p < 0,05$), el día 22 comparado con el día 21 (tras la realización de la prueba) según el test de ANOVA.

Abreviaturas: GOT/AST, transaminasa glutámico-oxalacética/aspartato aminotransferasa; GPT/ALT, transaminasa glutámico-pirúvica/alanina aminotransferasa; GGT, gamma glutamil transpeptidasa; CK, creatina quinasa; RDW-SD, rango de distribución de glóbulos rojos.

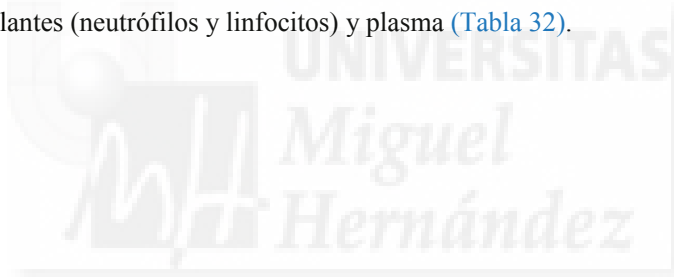
La mayoría de parámetros no sufrieron cambios con respecto a las muestras obtenidas en los días 1 y 21 de estudio. Al día siguiente del periodo de homogeneización (día 22), los individuos realizaron la prueba de 2000m e inmediatamente (pasado menos de 30min), se tomó una muestra de sangre. La hemoglobina y el hematocrito disminuyeron tras la prueba de 2000m pero dichas diferencias no fueron significativas.

La creatinina y el lactato aumentaron el día 22 con respecto a los niveles del día 1 y 21. El componente anaeróbico de la prueba y el agotamiento de la fosfocreatina muscular podrían explicar en parte estos valores.

No se observaron tampoco cambios significativos en las proteínas circulantes cuando se compararon los días 1 y 21, excepto una pequeña disminución en el Mb (mioglobina) circulante y un aumento en la CK. Hay que tener en cuenta que las muestras fueron tomadas después de un periodo de reposo de entre 8-10 horas, lo cual puede afectar a los valores en plasma debido a la semivida de estas proteínas. Al día siguiente del período de homogeneización (día 22), la Mb y CK presentaron un incremento marcado y significativo, lo cual puede deberse a la presencia de daño muscular después de la prueba de 2000m.

En conjunto, los resultados indican que la actividad física intensa durante la prueba dio como resultado daño eritrocitario y muscular.

El siguiente paso del estudio fue evaluar los cambios en las respuestas oxidativa e inflamatoria. Con este fin, se analizaron los niveles de MDA y carbonilos proteicos en células circulantes (neutrófilos y linfocitos) y plasma ([Tabla 32](#)).



V.3. Parámetros relacionados con el estado oxidativo del grupo de sujetos de estudio.

Tabla 32. Marcadores oxidativos determinados en neutrófilos, linfocitos y plasma en el grupo de estudio expresados como la media ± esm.

Marcadores (unidades)	Día 1	Día 21	Día 22
Neutrófilos			
MDA (mmol/l)	6,3 ± 0,4	7,0 ± 0,3	6,1 ± 0,5
Carbonilos proteicos (mmol/l)	9,2 ± 0,6	10,3 ± 0,5	10,9 ± 0,8
Linfocitos			
MDA (mmol/l)	4,7 ± 1,0	16,3 ± 1,3	16,7 ± 1,1
Carbonilos proteicos (mmol/l)	8,8 ± 0,3	8,7 ± 0,7	11,9 ± 0,8*†
Plasma			
MDA (mmol/l)	15,9 ± 0,8	16,3 ± 0,9	17,8 ± 0,8
Carbonilos proteicos (mmol/l)	78,6 ± 2,4	84,2 ± 2,3	92,8 ± 2,9*†

La concentraciones intracelulares de MDA y proteínas de los carbonilos fueron calculadas asumiendo un valor de 300 µl/10⁹ células.

() Diferencias significativas (p<0,05), del día 22 (tras la realización de la prueba) comparados con el día 1 según el test de ANOVA.*

(†) Diferencias significativas (p<0,05), el día 22 (tras la realización de la prueba) comparado con el día 21 según el test de ANOVA.

No se observaron cambios significativos en los niveles de MDA en ninguno de los tiempos y tipos celulares. Sin embargo, sí se observan alteraciones oxidativas en las proteínas apreciándose cambios significativos en linfocitos y plasma. No hay cambios significativos en los neutrófilos.

En general, se puede apreciar en los resultados un aumento de los marcadores de daño oxidativo a nivel proteico y en plasma tras la prueba de 2000m. A nivel celular, los cambios no fueron tan evidentes. Para verificar este punto, se procedió a determinar la actividad enzimática de las principales enzimas antioxidantes.



V.4. Actividades de enzimas antioxidantes en el grupo de sujetos de estudio.

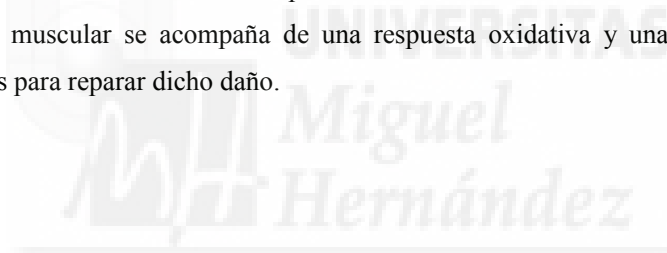
Tabla 33. Actividades enzimáticas antioxidantes determinada en neutrófilos, linfocitos y eritrocitos en el grupo de estudio expresados como la media ± esm.

Marcadores (unidades)	Día 1	Día 21	Día 22
Neutrófilos			
SOD (pKat/10 ⁹ cel)	16,64 ± 0,7	17,1 ± 0,4	32,8 ± 4,4*†
Catalasa (Ks/10 ⁹ cel)	48,9 ± 6,7	38,2 ± 4,0	67,5 ± 19,9
GPX (nKat/10 ⁹ cel)	75,5 ± 6,5	100,1 ± 23,9	174,7 ± 23,7*†
GRD (nKat/10 ⁹ cel)	496,6 ± 46,7	632,7 ± 75,2*	579,4 ± 51,3*
Linfocitos			
SOD (pKat/10 ⁹ cel)	22,5 ± 1,6	25,0 ± 1,7	60,6 ± 4,2*†
Catalasa (Ks/10 ⁹ cel)	85,9 ± 11,7	86,5 ± 12,0	120,3 ± 32,5*†
GPX (nKat/10 ⁹ cel)	73,6 ± 9,3	75,2 ± 8,2	97,5 ± 14,6
GRD (nKat/10 ⁹ cel)	378,7 ± 41,7	396,7 ± 49,9	303,4 ± 24,2*†
Eritrocitos			
SOD (pKat/10 ⁹ cel)	2,4 ± 0,2	3,1 ± 0,3*	6,9 ± 0,7*†
Catalasa (Ks/10 ⁹ cel)	1,3 ± 0,1	1,5 ± 0,2	2,7 ± 0,2*†
GPX (nKat/10 ⁹ cel)	14,0 ± 1,1	15,7 ± 2,3	20,4 ± 4,5
GRD (nKat/10 ⁹ cel)	14,1 ± 4,2	12,1 ± 1,7	18,7 ± 1,9†

(*) Diferencias significativas ($p < 0,05$), del día 22 (tras la realización de la prueba) comparados con el día 1 según el test de ANOVA. (†) Diferencias significativas ($p < 0,05$), el día 22 (tras la realización de la prueba) comparado con el día 21 según el test de ANOVA. Abreviaturas: GPX, glutatión peroxidasa; GRD, glutatión reductasa; Hb, hemoglobina; Kat, katalas (unidades de actividad enzimática); SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa.

Los principales cambios significativos se observaron después de la prueba de 2000m. Las enzimas antioxidantes (SOD, catalasa y GPX) presentaron una actividad enzimática significativamente más elevada en neutrófilos con respecto a los valores basales. SOD y GPX también estuvieron significativamente más elevadas con respecto al día 21 de estudio. En linfocitos también se encuentran diferencias significativas en todas las enzimas antioxidantes, excepto en la GPX, aunque ésta también está elevada después de la prueba de 2000m.

La activación de las enzimas antioxidantes observadas parece ser muy rápida (menos de 30 minutos después de una prueba de siete de duración), lo que sugiere que teóricamente no está relacionada con los cambios en la expresión génica. Para ello se determinó la activación de las enzimas en eritrocitos, que son células anucleadas y por lo tanto, no depende de eventos de expresión génica. Todas las enzimas muestran un aumento significativo cuando las comparamos con el día 21 de estudio, lo que indicó que el daño muscular se acompaña de una respuesta oxidativa y una activación de antioxidantes para reparar dicho daño.



V.5. Parámetros relacionados con el estado inflamatorio del grupo de sujetos de estudio.

Tabla 34. Niveles de citoquinas plasmáticas en el grupo de estudio expresados como la media ± esm.

Marcadores (unidades)	Día 1	Día 21	Día 22
IL-6 (pg/ml)	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,3	1,4 ± 0,7
IL-8 (pg/ml)	6,1 ± 1,6	6,2 ± 1,3	4,3 ± 1,7
IL-10 (fg/ml)	330,1 ± 96,0	322,1 ± 88,0	281,9 ± 120,0
TNF-α (pg/ml)	5,8 ± 3,3	5,1 ± 3,5	12,1 ± 6,9
Leptina (ng/ml)	1,9 ± 0,6	2,3 ± 0,5	1,5 ± 0,5

Abreviaturas: IL, interleuquina; TNF, factor de necrosis tumoral.

Por último, se analizaron los niveles de diferentes citoquinas (IL-6, IL-8, IL-10, TNF-α y leptina) para evaluar la respuesta inflamatoria, y no se observaron cambios significativos en los niveles circulantes de ninguna de ellas. La IL-6 se mantiene prácticamente igual en los tres momentos de estudio. Las IL-8 e IL-10, aunque disminuyeron después de la prueba, no fueron cambios significativos. El TNF-α parecía aumentar modestamente después de la prueba de 2000m, pero de nuevo los cambios no fueron significativos. Los resultados sugieren que, el daño muscular inducido por el ejercicio no fue acompañado por una respuesta inflamatoria clara inmediatamente después del ejercicio, al menos basándose en los perfiles de citoquinas inflamatorias.



DISCUSIÓN

I. INTERVENCIÓN 1.

El objetivo de la intervención 1, fue estudiar la influencia que tenía la dieta conjuntamente con el ejercicio en el control metabólico e inflamatorio de la diabetes tipo 1. Los participantes eran sujetos que acababan de debutar en esta patología. El estudio fue de tipo observacional, es decir, los experimentadores no podían modificar las pautas de actividad física que realizaban los sujetos. Por cuestiones de ética, sí que se intervino a nivel de dieta y del régimen de inyecciones de insulina, colaborando con el personal del Hospital Universitario de A Coruña, donde se realizó el estudio.

En esta intervención, un grupo de pacientes que ya realizaba ejercicio físico de forma regular y voluntariamente continuó con la misma rutina a pesar de debutar en la enfermedad. En este aspecto, el criterio de inclusión (establecido por la American Diabetes Association) era realizar al menos 5 días a la semana, una hora diaria de ejercicio físico de intensidad moderada-alta (*Galassetti & Riddell, 2013*). El otro grupo, era sedentario antes de debutar y continuó con la misma pauta de actividad tras el debut. Aunque algunos individuos de este grupo comenzaron rutinas de ejercicio durante el periodo de tiempo que duró el estudio, estas fueron esporádicas y en ningún momento llegaron a las frecuencias, ni intensidades del grupo más activo. A ambos grupos se les realizó el mismo seguimiento (ver Materiales y Métodos, Intervención 1).

Los resultados parecen indicar, que los individuos que practicaban actividad física regular (grupo A) antes del inicio de la diabetes tipo 1, debutaron con un perfil metabólico más favorable para afrontar la enfermedad que los sedentarios (grupo S), presentando unos niveles significativamente menores de HbA1c y mayores de péptido C. El primer parámetro indica claramente un mejor control de la glucemia a largo plazo, con menores fluctuaciones a lo largo del día. Esto implica, un mejor ajuste de la dosis de insulina inyectada y un menor riesgo de desarrollar complicaciones diabéticas con el paso del tiempo. La presencia de mayores cantidades de péptido C indicó la existencia de una mayor cantidad de páncreas endocrino residual, lo que ayudó posiblemente al

control de la glucemia y a una menor dependencia de la insulina exógena (*Vanbuecken & Greenbaum, 2014*).

Además, al debut de la enfermedad los individuos del grupo A presentaron menos casos de cetoacidosis (2 de n= 8) que los individuos del grupo S (7 de n= 11). La cetoacidosis es la forma de diagnóstico más grave, que indica una fuerte descompensación metabólica, requiriendo una urgente intervención clínica. En este contexto, se ha descrito que la cetoacidosis asociada a una mala regulación metabólica, se correlaciona a largo plazo con una reducida masa de célula β residual (*Fredheim, et al., 2013*). Se puede decir por ello que, el ejercicio practicado antes del inicio de la enfermedad, ayudó a un mejor pronóstico de la misma. No obstante, todos estos puntos comentados necesitan ser confirmados mediante experimentos adicionales.

No hay que olvidar, que los resultados enfatizan que el programa educacional que se propuso desde el hospital (el cual incluía el manejo de la dieta y la monitorización de las inyecciones de insulina) (ver Materiales y Métodos, Intervención 1) mejoró el control de la enfermedad en ambos grupos. En otras palabras, durante el periodo de estudio, ambos grupos presentaron un descenso de los niveles de HbA1c de hasta un 4% y un aumento de casi el doble de los niveles de péptido C. Por lo que cabría plantearse, a la luz de los resultados iniciales obtenidos en este estudio, si en las políticas de tratamiento hospitalario sería conveniente incluir, además de la dieta y el control de la insulina inyectada, un programa personalizado de actividad física para cada paciente, ayudando a un mejor control de esta patología.

Los niveles circulantes de péptido C fueron determinados en este estudio como un indicador de la masa residual de célula β pancreática (*Ali & Dayan, 2009*). Aunque no se observaron diferencias significativas entre grupos, los resultados indicaron que los individuos del grupo A parecían tener una tendencia a presentar valores más elevados de péptido C comparados con los del grupo S. Es posible, que dado que las personas activas (grupo A) comenzaron el período experimental con un mejor perfil metabólico circulante, esto pudiera influir a largo plazo sobre la funcionabilidad de la célula β residual. Los valores obtenidos por el índice de IDAA1c se usaron para definir el periodo de luna de miel y se correlacionaron fuertemente con los niveles residuales de célula β (*Mortensen, et al., 2009*).

En este contexto, el grupo A presentó unos niveles de IDAA1c de 9 o menos tanto al final del primer año como del segundo, lo que indicó un mejor control metabólico con respecto al grupo S, el cual presentó niveles más elevados. Por ello, el grupo A podría estar experimentando una fase de luna de miel extendida (*Mortensen, et al., 2009*). De esta manera, se puede plantear la hipótesis de que la práctica regular de ejercicio físico antes y después del debut de la enfermedad permite a los individuos entrar en un período óptimo de control metabólico, similar en muchos aspectos al periodo de luna de miel anteriormente mencionado (*Chmelova et al., 2015*). Esta fase de luna de miel se caracteriza por unos bajos niveles de HbA1c en los sujetos, como indicador del correcto control de la glucemia, y unos bajos requerimientos de insulina exógena.

Los resultados del estudio también ponen de manifiesto, que un estilo de vida sedentario no es la mejor manera para adquirir las ventajas metabólicas que proporciona esta fase de luna de miel extendida, y que la dieta y las inyecciones de insulina por sí solas no son suficientes para que los individuos mantengan un óptimo control metabólico una vez la enfermedad se ha establecido, siendo la práctica regular de actividad física el factor fundamental para ello. Puesto que el estudio ha sido observacional, no se han podido aportar datos acerca de la frecuencia, intensidad o tipo de entrenamiento más apropiado para los pacientes con diabetes tipo 1. Estas cuestiones deberán ser respondidas en futuras investigaciones.

Por otro lado y dado que los individuos del grupo A poseían mejores parámetros metabólicos circulantes que el grupo S en el momento del debut, se especuló que los individuos del grupo A deberían haber sido diagnosticados más tarde que los individuos del grupo sedentario. Sin embargo, la edad de admisión en la Unidad de Endocrinología fue similar en ambos grupos. Se ha de tener en cuenta, que la severidad de la enfermedad depende de factores individuales que se reflejan en la variabilidad de los valores de antiGAD y citoquinas analizadas. Sin embargo, los datos obtenidos parecen arrojar la idea de que en similares condiciones medioambientales y genéticas, los sujetos con un estilo de vida activo, parecen desarrollar la enfermedad con una menor severidad que los sedentarios.

Varias intervenciones y estudios observacionales han analizado el impacto de la actividad física en el control de la diabetes, pero siempre una vez la patología se ha establecido. En este sentido, los cambios en HbA1c, tomados como un marcador del manejo de la glucemia observados en estos estudios fueron modestos y no significativos (*Nielsen et al., 2006; Conn et al., 2008*). No se pueden comparar estos estudios con el realizado en esta memoria de tesis, debido a dos diferencias claras. En primer lugar, los individuos del grupo activo practicaban actividad física antes de debutar en la enfermedad. En segundo lugar, la frecuencia de ejercicio del grupo A es una de las más altas analizadas comparada con los estudios publicados: al menos 5 días/semana y 1h/día. Estas particularidades refuerzan la originalidad del abordaje experimental del presente estudio, enfatizando en la importancia de instaurar desde el principio en la población, pautas nutricionales y de actividad física adecuadas.

Además, la realización de ejercicio físico previa al debut de la enfermedad, conjuntamente con un mayor volumen de la misma, parecen ser dos puntos clave en las reducidas necesidades de insulina de los sujetos del grupo A. Este grupo, presentó durante los dos años de estudio menores requerimientos de insulina que el grupo S. Estas diferencias fueron significativas en el estudio, llegando a ser de hasta 30 unidades de insulina la diferencia en la dosis inyectada.

Un punto que preocupaba a los investigadores de este estudio, era la calidad del entrenamiento. Una actividad física mal programada suponía un incremento en el daño oxidativo e inflamatorio. Esto es lo que suele ocurrir en situaciones de sobreentrenamiento, en las que el riesgo de lesiones y la susceptibilidad a determinadas enfermedades se ven incrementadas. La población de diabéticos es además, especialmente sensible al desequilibrio oxidativo, que es un componente clave en la progresión de la enfermedad. Por ello, se midieron los niveles de carbonilos proteicos plasmáticos en ambos grupos. En este contexto, las diferencias entre los grupos A y S no fueron significativas. Algunos estudios indican, que los periodos prolongados de hiperglucemia en la diabetes tipo 1 favorecen el desarrollo de estrés oxidativo (*Robertson, 2004*). Por el contrario, un adecuado control glucémico minimizaría el daño

oxidativo. Además, es conocido que la actividad física permite la activación de genes que codifican para enzimas antioxidantes, conduciendo a una mejor defensa (*Niess & Simon, 2007*). Dado que los sujetos estudiados se encontraban al inicio de la enfermedad, es muy probable que el tratamiento con dieta e insulina fuera suficiente para controlar el desequilibrio oxidativo. La descompensación de la enfermedad con el paso del tiempo, es lo que agravaría la situación de estrés oxidativo. Especulando, es en ese momento, donde las determinaciones de carbonilos proteicos podrían arrojar diferencias significativas. La modulación del estrés oxidativo en pacientes diabéticos que realizan ejercicio regular, aún no ha sido estudiada con detalle. Por cuestiones presupuestarias, este punto sólo pudo ser abordado de una forma más completa en las intervenciones 4 y 5, por lo que futuras investigaciones más amplias en el campo de la diabetes tipo 1 y con un diseño experimental similar son necesarias.

Por otro lado, el ejercicio parece ser capaz de modular la producción de citoquinas, lo cual es de gran interés dado que la respuesta inmunológica e inflamatoria juega un papel fundamental en la progresión y severidad de la enfermedad (*van Belle, Coppeters & von Herrat, 2011*). Sin embargo, los cambios en los niveles de citoquinas dependen entre otros factores de la intensidad, tipo y duración del ejercicio (*Hirose et al., 2004; Malm, 2004*). Varios estudios han demostrado que rutinas específicas pueden aumentar en la circulación los niveles de citoquinas antiinflamatorias, que pueden a su vez activar mecanismos de reparación del daño muscular producido por el ejercicio, ayudando a la recuperación del tejido (*Toft et al., 2002*). No obstante, esto no parece ser tan simple cuando hay un trastorno crónico, tal como la diabetes tipo 1. Además, la interpretación de los resultados resulta muy compleja si se tiene en cuenta que la mayoría de las citoquinas son producidas en respuesta a una gran variedad de factores de estrés medioambientales tanto internos como externos, siendo la diabetes uno de ellos. La alta variabilidad interindividual que se aprecia en los resultados, suele ser la tónica que aparece en la mayoría de los estudios (*Codella et al., 2015*). Muchos expertos coinciden en afirmar que no es posible establecer un patrón claro de respuesta antiinflamatoria, sino que cada individuo produciría los perfiles de citoquinas que mejor se adapten a su situación fisiopatológica particular. Por otra parte, la mayoría de los datos sobre el papel de las citoquinas en el desarrollo de la diabetes tipo 1 son de

estudios realizados en animales (*Singh et al., 2011*). Por lo tanto, la interpretación de los datos obtenidos en esta intervención debe hacerse con extrema precaución.

Sin embargo, algunas observaciones particulares del estudio merecen ser señaladas. En primer lugar, ciertas citoquinas consideradas como proinflamatorias en el desarrollo de la diabetes tipo 1 fueron detectadas con valores más elevados en individuos del grupo A (IL-1 β , IL-12p70, IL-17a, IFN- γ e TNF- α) que en el grupo S, al debut de la enfermedad y al final del primer año (*Tabla 16a y 17a*). Estos resultados podrían sugerir un efecto del ejercicio en la respuesta inflamatoria. Por lo que se conoce a partir de estudios en modelos animales, las células T efectoras diabetogénicas (responsables de la respuesta con anticuerpos) son fundamentales para activar las células Treg, que proporcionan protección en la diabetes controlando a las anteriores (*Grinberg-Bleyer et al., 2010a*). De hecho, la terapia adyuvante requiere la activación de IFN- γ , TNF- α y IL-17 para estimular una respuesta de protección en ratones NOD (*Serreze et al., 2001; Qin, Chaturvedi & Singh, 2004*).

Además, en el presente estudio las citoquinas antiinflamatorias IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 y IL-13 aumentaron al final del primer año encontrándose en cantidades mucho más elevadas en el grupo A que en el grupo S (*tabla 16b y 17b*). Este dato se ha de interpretar con cautela, pero es posible que el efecto inflamatorio de la enfermedad no pueda ser compensado con el efecto antiinflamatorio que proporciona el ejercicio. Es posible, que durante el periodo de inicio de la enfermedad deba de adaptarse el programa de actividad física de forma muy diferente al programa que se desarrollaría cuando la enfermedad esté establecida. Experimentos adicionales son necesarios para evaluar ésta y otras posibilidades, como por ejemplo un efecto modulador de unas citoquinas sobre otras (*Rütti et al., 2015*).

Además, las citoquinas IL-2, IL-4, IL-10 y IL-13 deben ser analizadas cuidadosamente, ya que los niveles de expresión en cada individuo varían en gran medida, independientemente de pertenecer al grupo A o S. La IL-2 junto con la IL-21 están bajo el control de Idd3, un locus del gen susceptible en el desarrollo de la diabetes. Niveles reducidos de IL-2 en islotes de ratones NOD se correlacionan con una reducida función de las células Treg (*Yamanouchi et al., 2007; Sgouroudis, Albanese & Piccirillo, 2008; Johnson et al., 2013; Dwyer et al., 2016*). En este contexto, IL-2 ayuda

a mantener la balanza en favor de las células Treg CD4⁺ en islotes (*Grinberg-Bleyer et al., 2010b; Tang et al., 2008*) e IL-4 evita el desarrollo de la diabetes por inducir células Th2 en este mismo tejido (*Rapoport et al., 1993*). Además, la IL-10 también juega un papel protector en el desarrollo de la diabetes (*Goudy et al., 2003*), pero algunos descubrimientos muestran resultados discrepantes (*Hillhouse et al., 2010*). Todo esto puede explicarse porque según los contextos, las citoquinas consideradas como antiinflamatorias se convierten en proinflamatorias. Por ejemplo, la IL-6 en patología se considera proinflamatoria, pero cuando la produce el músculo dentro de un contexto deportivo, se considera antiinflamatoria (*Scheele, Nielsen & Pedersen, 2009*).

Por otro lado, la IL-22 se encuentra muy aumentada al final del primer año en el grupo A (las diferencias fueron casi significativas con respecto al grupo S) (tabla 16b). Se trata de una citoquina incluida en la familia de la IL-10 que merece una especial atención. La IL-22 estimula la expresión de genes Reg en el islote (*Takasawa, 2015*). Estos genes, codifican para proteínas tales como Reg2 o Reg3B que están involucradas en la regeneración de las células β (*Xiong et al., 2011; Xia et al., 2015*), siendo muy activas durante el desarrollo embrionario de los islotes pancreáticos (*Vicente-Salar et al., 2011*). Además, el receptor de IL-22 se expresa en las células pancreáticas alfa (productoras de glucagón) y beta, pero no en el epitelio exocrino acinar o ductal (*Shioya et al., 2008*). Además, aunque las células beta desaparezcan en su totalidad debido a un ataque autoinmune masivo, la posibilidad de que las células alfa se transdiferencien a beta, ha sido demostrada en modelos animales y existen evidencias en islotes humanos (*Thorel et al., 2010*). Por todo ello, una posible hipótesis de continuación de esta línea de trabajo es que IL-22 se secrete cuando los niveles de masa pancreática residual sean muy bajos, con el fin de restaurar la masa de célula β por activación de las proteínas Reg. Sin embargo, esta acción no puede llevarse a cabo debido a la elevada presencia de citoquinas proinflamatorias en el islote. Los procesos de transdiferenciación tampoco podrían funcionar por la misma razón, ya que las nuevas células β generadas, podrían ser dianas de nuevo del sistema inmunitario. El ejercicio podría ayudar a controlar esta situación o a completar la acción de terapias farmacológicas diseñadas para estimular la diferenciación y la transdiferenciación a nuevas células β .

Por otro lado, la IL-6 aumenta su secreción por parte del músculo tras la realización de actividad física en pacientes con diabetes (*Rosa et al., 2008*), siendo también capaz de activar las proteínas Reg (*Luo et al., 2013*). En el presente estudio, la IL-6 ha estado por debajo de los límites de detección del ensayo, posiblemente debido a su baja vida media y a que las extracciones no se realizaron nada más realizar actividad física. Por esta razón, esta citoquina no ha sido incluida en las tablas, aunque también sería interesante analizarla en futuros estudios.

Por todo ello, aunque las pautas de dieta, ejercicio e inyecciones de insulina no permiten restaurar la masa de célula β residual, sí que se puede indicar, que dichas pautas (particularmente el ejercicio) son muy eficientes para favorecer un perfil circulante de citoquinas antiinflamatorias, paso esencial para permitir la replicación de las células β residuales (*Oram et al., 2014*). Se ha de considerar por tanto, que la actividad física practicada antes del debut de la enfermedad y durante la misma, puede ayudar a alcanzar unos adecuados parámetros circulantes que resulten en un mejor control metabólico de la enfermedad y posiblemente, un mejor control inflamatorio, promoviendo indirectamente la regeneración del páncreas endocrino. Nuevos experimentos deberán ser diseñados para el estudio de estas cuestiones. Justamente, los hallazgos encontrados en las Intervenciones 2 y 3 parecen confirmar en parte las conclusiones obtenidas en la presente intervención.

2. INTERVENCIÓN 2.

Los datos obtenidos en la presente intervención parecen confirmar que el ejercicio practicado antes y después del inicio de la enfermedad, junto con la dieta y posiblemente otros factores no identificados, permiten conseguir mejoras metabólicas e inflamatorias que evitan el debut de la enfermedad.

En primer lugar, mencionar que el sujeto SCA realizaba un gran volumen de ejercicio físico, una frecuencia de 10-15 horas/semana en sesiones de 2-3 horas/día. Durante la primera consulta que realizó al Servicio de Endocrinología del Hospital Universitario de A Coruña, SCA tenía una fuerte descompensación glucémica (hiperglucemia prolongada) y una titulación positiva antiGAD. Los niveles de péptido C eran muy similares, o incluso inferiores, a los de algunos sujetos del grupo A. Estos parámetros parecían sugerir un posible debut en la enfermedad.

No obstante, a nivel metabólico SCA presentaba un mejor control que los sujetos del grupo A, con unos niveles de HbA1c significativamente menores. Como en todos los casos de la Intervención 1, SCA entró en la fase de luna de miel, consiguiendo prolongarla durante más tiempo que el resto de los pacientes de los grupos A y S. De hecho, desde el Servicio de Endocrinología se decidió no intervenir con inyecciones de insulina y tener al sujeto en observación, controlando su glucemia diariamente. SCA continuó con su rutina de actividad física hasta el final del estudio y en la actualidad es jugador profesional de fútbol.

Al final del primer año, SCA presentaba bajos niveles de HbA1c, consiguiendo un significativo aumento en los niveles de péptido C, sugiriendo una posible recuperación en la masa de células β pancreáticas. Estos cambios coincidieron con una desaparición completa de los anticuerpos antiGAD. Al final del estudio, SCA presentó un buen control metabólico en términos de HbA1c y unos niveles de péptido C muy similares a los sujetos del grupo A, con una ausencia total de anticuerpos.

Estos cambios, vienen acompañados de una evolución positiva en los niveles de citoquinas inflamatorias. Aunque el sujeto SCA, debutó con unos niveles altos de citoquinas proinflamatorias, con el paso del tiempo, éstas fueron disminuyendo e incluso desapareciendo al final del segundo año, como es el caso de IL-1 β , IL-12p70 y TNF- α . Los niveles que alcanzaron estas citoquinas en SCA entraron dentro de los rangos observados en sujetos del grupo A. Paralelamente a esta disminución en las citoquinas proinflamatorias, se observó un aumento en las antiinflamatorias. El mayor repunte se produce al final del primer año, que es cuando consigue un pico significativo en los niveles circulantes de péptido C. Los valores para SCA en este momento particular del estudio, fueron significativamente más altos que los detectados en el grupo A, y desde luego en S, no habiendo diferencia en el resto de los periodos de estudio. La única diferencia por tanto, fue que los sujetos de la primera intervención seguían con titulaciones positivas antiGAD, lo que sugiere procesos persistentes de destrucción de células β . Es muy probable que SCA no presentara estos eventos de muerte celular, lo que le permitió normalizar todos los parámetros inflamatorios al final de la intervención.

Es importante mencionar, que no existe un patrón particular y específico para explicar el daño inflamatorio, y es muy posible que cada sujeto lo experimente de manera muy diferente, influenciados en cada caso por una gran variedad de factores genéticos y ambientales (*von Herrath & Homann, 2003*).

SCA es un caso aislado y los datos presentados, así como las interpretaciones realizadas deben de ser tomadas con suma precaución. Es muy posible, que el sujeto tuviera una predisposición genética a desarrollar una forma leve de diabetes tipo 1, que no se agravó en parte por el estilo de vida que llevaba, donde la actividad física sin duda jugaba un papel preponderante. Por todo ello, sería interesante seguir profundizando en los parámetros que convergen en SCA e intentar correlacionarlos con la defensa frente a la diabetes. No obstante, el componente inmunitario debe tener un peso muy importante en todo el proceso que SCA ha experimentado, ya que objetivamente sus parámetros metabólicos e inflamatorios son muy similares a los del grupo A, con la única diferencia de que SCA era negativo a antiGAD.

3. INTERVENCIÓN 3.

La tercera intervención describe un caso aislado muy diferente al de SCA, ya que AD es un sujeto que por su actividad deportiva tenía una diabetes muy descompensada que llegó a ponerle en serio riesgo vital.

AD realizaba alpinismo de forma profesional, exponiéndose con frecuencia a situaciones extremas que descontrolaban enormemente su glucemia. Igualmente, durante las expediciones, AD no llevaba un plan dietético adecuado, presentando muchos desajustes en las inyecciones de insulina. Además, es probable que AD tampoco siguiera un plan correcto de entrenamiento.

Considerando las 2 situaciones deportivas de estudio, en primer lugar hay que mencionar, que AD presentó un aumento de los parámetros eritrocitarios, leucocitarios y plaquetarios “post-trekking” (Tablas 21a, 22a, 23a) lo que indicó una posible situación de estrés generada por la enfermedad en condiciones de hipoxia. La situación de estos parámetros en la prueba de aceleración se acercó más a la normalidad. No obstante, AD seguía presentando descompensación en muchos parámetros metabólicos, como la HbA1c en el periodo que realizó la prueba de aceleración. Sin embargo, lo más llamativo de este sujeto, es que en el periodo en el que estuvo entrenando para la NASA, logró disminuir los niveles de citoquinas proinflamatorias y aumentar los de las antiinflamatorias, en particular la IL-22. Aunque sólo se dispone de una determinación de citoquinas durante el periodo en el que practicaba alpinismo, el perfil es predominantemente proinflamatorio. Está pendiente la determinación de citoquinas tras la actividad de “trekking” en altitud, que no se realizó en su momento por la falta de presupuesto.

Al igual que en la intervención anterior, AD es un caso aislado y nuevamente las interpretaciones obtenidas deben ser tomadas con extrema precaución. Es evidente, que las mejoras metabólicas son muy modestas y que sería necesario prolongar el estudio más allá de 4 meses para poder observar mejoras más significativas. Lo que parece más

claro es la tendencia a una mejora positiva en el plano antiinflamatorio. En ambas fases del estudio, AD realizaba ejercicios de intensidad extrema, con la diferencia de que cuando comenzó a entrenar para la NASA, normalizó ostensiblemente su estilo de vida, incluyendo alimentación, entrenamiento y posiblemente el control del estrés. La lección que puede extraerse de este caso y que merece ser investigada con más detalle, es que una mala planificación de la actividad física juntamente con la dieta, pueden no resultar tan efectivas en el control de la enfermedad. Esta es la situación que AD vivía en sus expediciones alpinas. Por el contrario, una correcta planificación puede ayudar a una recuperación, aunque sea parcialmente, de casos muy descompensados, como es el ejemplo de este sujeto.

Finalmente, varias intervenciones y estudios observacionales han analizado el impacto de la actividad física en el control de la diabetes otorgándole efectos positivos a nivel metabólico, pero siempre utilizando actividades aeróbicas y/o anaeróbicas más comunes y de menos intensidad (*Carral et al., 2010; Calvo and Gómez, 2013*). No se puede olvidar, que el sujeto de estudio realizaba actividades extremas y que la intensidad, tipo y frecuencia de ejercicio han de tenerse en cuenta para lograr un buen manejo de la enfermedad. Además, es probable que este tipo de actividades no sean las más indicadas para lograr un buen control metabólico en el paciente diabético. Aunque es necesaria más investigación acerca de qué tipo de ejercicio físico es el más adecuado, algunos estudios sugieren que el ejercicio moderado intermitente, que combine el ejercicio aeróbico con el de fuerza podría tener los efectos más positivos en este sentido (*Church, 2011*).

4. INTERVENCIÓN 4.

La cuarta intervención se centra en la diabetes tipo 2, en concreto en la situación de resistencia a la insulina que muchos pacientes experimentan. Se trata de una situación en la que no hay una actividad del sistema inmunitario y en la que la destrucción del tejido pancreático no es tan severa. Por ello, surgió la pregunta de saber cómo sería el perfil metabólico de estos pacientes, si existía un desequilibrio oxidativo e inflamatorio, y si nuevamente la dieta y el ejercicio podían revertir esta situación desfavorable. Esta intervención permitió por tanto, evaluar si cambios en el estilo de vida (mediante dieta y ejercicio) de un grupo de sujetos adolescentes prediabéticos tipo 2 con resistencia a la insulina y obesidad, denominados SOA, ejercían un efecto positivo sobre el estado metabólico e inflamatorio (ver, Materiales y Métodos, Intervención 4). El presente estudio permitió además, poder abordar con más detalle los aspectos relacionados con desequilibrio oxidativo, ya que formaban parte de un proyecto colaborativo más amplio, con lo que el grupo de investigación dispuso de más apoyo económico.

Al comparar los datos sobre el estado de los sujetos del grupo SOA (tabla 27b) con los del grupo NW (tabla 27a), se apreció que, antes de la intervención la mayoría de los parámetros estudiados estaban alterados y descompensados, presentando un perfil típico de individuos obesos. El desarrollo de diabetes mellitus tipo 2 viene determinado por factores genéticos y ambientales siendo el sedentarismo y la obesidad claves en su desarrollo (Vinagre & Conget, 2013). Es bien sabido, que estados como la obesidad, se caracterizan por cambios dinámicos hormonales y fisiológicos en niños y niñas, que pueden alterar la homeostasis metabólica y vascular mediante mecanismos proinflamatorios y prooxidantes (Golbidi, Badran, & Laher, 2012).

Los marcadores de estrés oxidativo estudiados, niveles de carbonilos proteicos y MDA, estaban elevados al inicio del estudio y esto puso de manifiesto una situación de desequilibrio. Por un lado, los periodos prolongados de hiperglucemia derivados de un

estado prediabético favorecían la formación de productos oxidativos en macromoléculas como lípidos y proteínas circulantes (*Robertson, 2004; Vincent, Innes & Vincent, 2007*). Es probable por ello, que la actividad física, junto con la dieta realizada por los sujetos del grupo SOA durante su estancia en el Centro Les Oiseaux, Sanary Sur Mer (Francia) durante un periodo de 4 meses, sea el motivo principal del descenso de los niveles de carbonilos proteicos y MDA al final del estudio. Esta mejora en el perfil oxidativo de los sujetos vino acompañada de la pérdida de peso ligada a la práctica de ejercicio y a la normalización de la dieta. Dicha pérdida fue aproximadamente de un 7% al final del estudio. Además, la pérdida de peso se asoció a mejoras en la sensibilidad a la insulina, lo que se podría relacionarse a su vez con unos mejores niveles de glucosa y por lo tanto un mejor control metabólico. No se tienen datos acerca de los niveles de glucosa de los sujetos antes y después de la intervención para comprobar esta teoría.

Por otro lado, SOA presentó valores más altos en los niveles de PCR y MPO que el grupo NW, lo que sugirió la presencia de cierta inflamación sistémica (*Rocha & Folco, 2011*) y de estrés oxidativo-inflamatorio mediado por neutrófilos (*Loria et al., 2008*). Los niveles de PCR, aunque más elevados en SOA, están dentro de los valores de referencia, lo que indicó que no existía ningún proceso inflamatorio grave causado por agentes externos. No obstante, la obesidad se correlaciona con un estado inflamatorio más leve, pero persistente, en el que la acumulación excesiva de tejido graso es un factor desencadenante. Esto explicaría la activación de la MPO al inicio del estudio y la presencia de ciertas citoquinas proinflamatorias (*Hameed et al., 2015*).

Es interesante observar que la MPO disminuyó al final del estudio. Esta enzima presente en los neutrófilos, se activa en procesos inflamatorios, por lo que los niveles aumentados al inicio de la intervención indicarían un proceso inflamatorio, mientras que su descenso, significaría una tendencia a la normalización que podría venir dada por la pérdida de peso y la mejora del estado metabólico de los sujetos, donde la adaptación al ejercicio jugaría un papel fundamental. No obstante, al finalizar la intervención, los sujetos no alcanzaron valores óptimos de normopeso, aunque la tendencia fue positiva. Todos estos datos tomados de forma conjunta sugieren, que un programa más largo para la pérdida del peso podría ser necesario para inducir cambios metabólicos más significativos en SOA.

Además, los incrementos en la PCR y MPO en plasma se han asociado recientemente con riesgo cardiovascular en niños obesos. Otros parámetros también relacionados con el riesgo cardiovascular a nivel de macro y microcirculación fueron analizados en el presente estudio por la Universidad de Avignon (Francia), pero no se discuten en esta tesis (*Montero et al., 2014a, 2014b*).

Con la idea de completar la información proporcionada por los marcadores de desequilibrio oxidativo, carbonilos proteicos y MDA, se determinaron las actividades de las principales enzimas antioxidantes en linfocitos y eritrocitos (*tabla 28a y 28b*). Las enzimas antioxidantes dependientes del glutatión se activan en los sujetos SOA al final de los 4 meses, aumentando significativamente. Este aumento podría deberse al comienzo de la práctica de actividad física por parte del grupo SOA. La ejecución de actividad física conlleva un aumento discreto en la producción de radicales libres y especies reactivas del oxígeno y nitrógeno, que a largo plazo inducen la expresión de genes que codifican enzimas antioxidantes. La actividad de estas enzimas podría ser la responsable de la disminución de los marcadores MDA y carbonilos proteicos. Las actividades de estas enzimas al inicio del estudio fueron inferiores a las del grupo NW, pero presentaron una tendencia a aproximarse a ellas al final de la intervención. Estos cambios no fueron debidos a fenómenos de expresión génica, ya que las determinaciones de los niveles de ARNm por PCR cuantitativa en linfocitos pre y postintervención, no revelaron diferencias significativas. Como los eritrocitos experimentaron una tendencia de cambio similar, se propone como hipótesis que los cambios enzimáticos son de tipo postraduccional, aunque este punto debe ser verificado experimentalmente. Entre dichos cambios se encuentra la propia autooxidación de las mismas enzimas antioxidantes, lo que deteriora su actividad. Las enzimas dependientes del glutatión son especialmente sensibles a sufrir oxidaciones y una actividad disminuida (*Mallard et al., 2017*). Por ello, estos fenómenos de autooxidación serán las primeras modificaciones postraduccionales a ser verificadas en una futura línea de investigación.

Aunque los niveles de PCR y MPO indican, como se comentaba anteriormente, un proceso inflamatorio de bajo grado principalmente en tejido adiposo que indirectamente podría afectar a las células β (Montane, Cadavez & Novials, 2014) se determinaron algunas de las citoquinas que previamente se habían determinado en la Intervención 1. Los resultados no mostraron un patrón concreto ni una tendencia clara de estas citoquinas. Es posible, que las escogidas para ser analizadas no sean las que mejor se relacionen con la inflamación asociada a la obesidad o que exista una gran variabilidad para diferentes situaciones de obesidad, es decir, si el sujeto sufre de hipertensión o presenta disfunción cardiovascular. Por ello, la única interpretación que puede hacerse de los resultados obtenidos y con mucha cautela, es que a nivel antiinflamatorio, los sujetos del grupo NW poseen una mejor dotación de citoquinas antiinflamatorias que los sujetos SOA. A nivel proinflamatorio algunos estudios sugieren que el ejercicio regular se asocia a menores niveles de TNF- α (Golbidi, Badran, & Laher, 2012; Karstoft & Pedersen, 2015). Justamente, un descenso en los niveles de esa citoquina se pudo apreciar a los 4 meses del estudio.

En conclusión, el ejercicio físico se ha destacado como una de las primeras líneas de tratamiento para las enfermedades metabólicas, y entre los mecanismos para explicar sus beneficios, están sus efectos antiinflamatorios y antioxidantes a largo plazo. No obstante, la conexión desde el punto de vista fisiológico y terapéutico entre ejercicio físico y diabetes tipo 2 aún no es clara (Nieuwoudt et al., 2017). Por eso, la búsqueda de biomarcadores séricos de diabetes tipo 2 modificables por el ejercicio físico es importante y un tema de intensa actividad investigadora (Gómez-Banoy & Mockus, 2016). La MPO puede ser el marcador más claro para encontrar patrones de cambio a nivel inflamatorio (Eguchi & Nagai, 2017). Nuevas investigaciones que aborden este tema son necesarias.

5. INTERVENCIÓN 5.

Finalmente, con la quinta intervención se pretende obtener información de referencia de cómo la actividad física per se modifica el patrón inflamatorio. Por dicha razón, se realizó en sujetos sin diabetes. En este contexto, aparecen también numerosas variables, aunque se tomó la decisión de comenzar un estudio piloto con sujetos que realizaban rutina aeróbica. Estas rutinas son más fáciles de controlar a nivel de cargas de trabajo y es más sencillo verificar su progresión mediante el uso de aparatos simples, como los acelerómetros. Para estudiar cambios tras un cierto nivel de stress inflamatorio, se realizó una analítica sanguínea adicional tras la ejecución de un test de 2000m. Se trata de una prueba que suelen realizar los sujetos que entrenan rutinas aeróbicas para confirmar mejoras en su respuesta anaeróbica.

Los datos recabados informan, en primer lugar, de que después de la prueba de 2000m hubo un incremento del daño oxidativo, evidenciado por la presencia incrementada de carbonilos proteicos en plasma y en linfocitos. En este contexto, las principales variables que podrían influir en la respuesta oxidativa son el tipo de ejercicio y la duración. En cuanto al tipo de ejercicio, existen evidencias científicas que indican que el componente anaeróbico del tipo de ejercicio realizado por los participantes del estudio, puede causar estrés oxidativo afectando principalmente a las proteínas (*Bloomer et al., 2001*), mientras que otros estudios indican la presencia de peróxidos lipídicos tras ejecutar las pruebas de esfuerzo (*Groussard et al., 2003*). Los peróxidos lipídicos pueden evolucionar a la formación de MDA si las defensas antioxidantes no actúan adecuadamente.

En la presente intervención, se observó también un aumento muy rápido en las actividades de las principales enzimas antioxidantes. Nuevamente, los cambios a nivel enzimático parecían no ser debidos a fenómenos de expresión génica, sino a modificaciones postraduccionales.

El incremento de Mb y CK (tabla 31) después de la prueba, posiblemente se deba a la presencia de daño muscular, lo que conllevaría a una activación de la respuesta inflamatoria. A este nivel, no aparecen cambios significativos en los niveles de citoquinas estudiadas (tabla 34). Como ya se ha comentado en intervenciones anteriores, los datos obtenidos en las citoquinas se han de interpretar con mucha cautela, ya que pueden verse afectadas por muchos factores, como el tipo de ejercicio, intensidad y la duración (Hirose et al. 2004; Malm, 2004). Muchos estudios relacionan las actividades aeróbicas intensas de larga duración con el incremento de citoquinas proinflamatorias (Scheele, Nielsen & Pedersen, 2009). Por otro lado, los ejercicios anaeróbicos incluyen una gran variedad de movimientos que pueden causar diferentes grados de daño muscular, determinado por los aumentos de CK en la circulación y dando lugar a la elevación de citoquinas proinflamatorias (Bruunsgaard et al., 1997). Además, el nivel de entrenamiento puede ser determinante a la hora de inducir una respuesta inflamatoria adaptativa. Este sería el caso de los sujetos de este estudio, que realizaban regularmente actividad aeróbica y que no experimentaron un aumento de las citoquinas proinflamatorias tan marcado tras la prueba (Wadley et al., 2016; Steinberg et al., 2007). Esto hace pensar, que las citoquinas circulantes presentes en los voluntarios podrían reflejar una adaptación a las rutinas de ejercicio. En este contexto, se sabe que los descensos intramusculares en los niveles glucógeno actúan como un potente estímulo para la liberación de IL-6 (Febbraio et al., 2003). Se puede plantear la hipótesis de que la ausencia de cambios en la IL-6 justo después de la ejecución del ejercicio podría deberse a que la prueba de 2000m no produce agotamiento severo de glucógeno para inducir la liberación de esta citoquina, manteniéndose un correcto control inflamatorio ante el estrés que supone dicha actividad.

Finalmente, en cuanto a las citoquinas antiinflamatorias, muchos estudios sugieren que determinadas rutinas de ejercicios pueden aumentar en la circulación los niveles de éstas, con el objetivo de controlar el daño inflamatorio producido a nivel muscular (Toft et al., 2002). El presente estudio no mostró cambios en este contexto,

posiblemente por la ausencia de daño proinflamatorio tras el estrés, lo que no produciría la respuesta de los sistemas antiinflamatorios para reparar estructuras no dañadas. Esta intervención abre nuevas líneas de trabajo e interrogantes que es necesario responder en futuras investigaciones.



APUNTE FINAL

La presente memoria, exhibe una serie de estudios piloto que pretenden abrir nuevas vías de investigación sobre el papel que el ejercicio y la dieta ejercen sobre patologías metabólicas prevalentes, como la diabetes tipo 1 y 2, en aspectos tan relevantes como el control del daño inflamatorio. Los resultados obtenidos han mostrado que este es un campo todavía por explorar y que ha sido olvidado por las políticas científicas, en favor de las investigaciones que fomentan las intervenciones farmacológicas. Es indudable, y así lo sugieren los resultados de este documento, que la planificación correcta de la actividad física junto con la dieta supone una estrategia preventiva y terapéutica más barata y eficiente para la sanidad pública. En este contexto, el control de los procesos inflamatorios a través de la dieta y el ejercicio va a abrir en un futuro interesantes vías de investigación y de trabajo para los profesionales de la Nutrición y las Ciencias de la Actividad Física.



CONCLUSIÓN

1. El ejercicio físico practicado antes del diagnóstico de la diabetes mellitus tipo 1 permite a los sujetos debutar con un perfil metabólico más favorable, caracterizado por bajos niveles de HbA1c y mayores niveles de péptido C que los sujetos sedentarios.

2. La práctica regular de actividad física llevada a cabo antes y después del debut de la diabetes tipo 1, permite a los individuos entrar en un periodo óptimo de control metabólico similar al periodo de luna de miel, caracterizado por un mejor control de la glucemia, menor dependencia de insulina exógena y una masa residual de célula β más funcional que en los sujetos sedentarios.

3. Un programa educacional basado en el manejo de la dieta y monitorización de la insulina mejora el control metabólico de la enfermedad en los sujetos con diabetes tipo 1, pero no es suficiente para que los individuos mantengan un óptimo control metabólico una vez la enfermedad se ha establecido, siendo la práctica de actividad física un factor fundamental.

4. Es probable, que el tratamiento con dieta e insulina sea suficiente para controlar el desequilibrio oxidativo al inicio de la enfermedad diabética, pero puede ser que a largo plazo el ejercicio regular sea también fundamental para dicho control.

5. Los resultados obtenidos a nivel de citoquinas parecen sugerir un efecto del ejercicio en la respuesta inflamatoria. El efecto antiinflamatorio del ejercicio no es suficiente para compensar el efecto proinflamatorio de la diabetes tipo 1.

6. La combinación dieta, ejercicio e inyecciones de insulina no permite restaurar la masa de célula β residual, pero podría ser muy eficientes para favorecer un perfil circulante de citoquinas antiinflamatorias, que permitiera mantener una masa de células β residuales en los diabéticos tipo 1.

7. La IL-22 aumentó de forma casi significativa durante el primer año tras el debut en los diabéticos tipo 1 que practicaban actividad física. Por su participación en procesos regenerativos de los islotes pancreáticos, la modulación de la IL-22 podría ser una diana a considerar en futuros tratamientos de la diabetes.

CONCLUSIÓN

8. Parece ser que el tipo y volumen de actividad física han de tenerse en cuenta para lograr un buen manejo de la enfermedad, pudiendo ser las actividades extremas un tipo de ejercicio inadecuado para sujetos con diabetes tipo 1.

9. No obstante una correcta planificación del ejercicio físico conjuntamente con la dieta y unas medidas higiénicas adecuadas, pueden ayudar a una cierta recuperación inflamatoria, aun en casos de diabéticos tipo 1 muy descompensados.

10. La actividad mieloperoxidasa parece ser por ahora un marcador claro para encontrar patrones de cambio a nivel inflamatorio en sujetos con resistencia a la insulina.

11. El ejercicio y el control de peso a través de la dieta de los sujetos con resistencia a la insulina disminuyen la actividad mieloperoxidasa.

12. Las enzimas antioxidantes dependientes del glutatión, tales como la glutatión peroxidasa y reductasa, se activan en sujetos con resistencia a la insulina que practican actividad física. Dicha activación podría ser responsable de la disminución del daño oxidativo, evidenciado a través de los marcadores malonil-dialdehído y carbonilos proteicos.

13. Los cambios en las enzimas antioxidantes que ocurren en los sujetos con resistencia a la insulina que realizan ejercicio físico parecen ser de tipo postraduccional.

14. De forma general, se puede considerar que la actividad física practicada antes del debut de la enfermedad diabética tipo 1 o tipo 2, o incluso durante la misma, puede ayudar a alcanzar un mejor control metabólico de la enfermedad, un menor desequilibrio oxidativo y posiblemente, un mejor control inflamatorio.

15. Similares beneficios se pueden alcanzar igualmente en sujetos sanos, haciendo que el ejercicio junto la dieta bien planificados, y comparados con los medicamentos, sean herramientas preventivas baratas y sin efectos secundarios.

The logo of Universidad Miguel Hernández is a watermark in the background. It features a stylized 'U' and 'M' on the left, and the text 'UNIVERSITAS Miguel Hernández' on the right.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

A ➔ **Alba A, Verdaguer J, Vives M.** Diabetes mellitus tipo 1: autoinmunidad frente a la célula beta. *EndocrinolNutr* 2004; 51:121-5.

Ali M, Dayan CM. The importance of residual endogenous beta-cell preservation in type 1 diabetes. *Br J Diabetes Vasc Dis.* 2009;9:248–53.

Alvarez EC, Darias GA, López-Guzmán A, Pallardo SL. Etiopatogenia de la diabetes mellitus. *Medicina* 2000; 8:991-1000.

Akerman L, Ludvigsson J, Casas R. Low C-peptide levels and decreased expression of TNF and CD45 in children with high risk of type 1 diabetes. *Clin Immunol* 2013; 148: 4-15.

Akirav E, Kushner JA, Herold KC. Beta cell mass and type 1 diabetes: going, going, gone?. *Diabetes* 2008; 57(11): 2883-8.

American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2010; 33 1:S62-9.

American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 2012; 37 (1):S81-90.

Arous C, Ferreira PG, Dermitzakis ET, Halban PA. Short-term exposure of beta cells to low concentrations of interleukin-1beta improves insulin secretion through focal adhesion and actin remodeling, and regulation of gene expression. *J Biol Chem* 2015; 290: 14491.

B ➔ **Baumann B, Olza J, Aguilera CM, Gil-Campos M, Leis R, Bueno G, Martínez Jimenez MD, Valle M, Canete R, Tojo R, Moreno LA, Gil A.** Myeloperoxidase is an early biomarker of inflammation and cardiovascular risk in prepubertal obese children. *Diabetes Care* 2012; 35(11): 2373-6.

Bell GI, Polonsky KS. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function. *Nature* 2001; 414 (6865): 788-91.

Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: The third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol* 2007; 19(6):652-7.

- Bloomer RJ, Fry AC, Falvo MJ, Moore CA.** Protein carbonyls are acutely elevated following single set anaerobic exercise in resistance trained men. *J Sci Med Sport* 10 (6): 411-17.
- Böber E, Dündar B, Büyükgebiz A.** Partial remission phase and metabolic control in type 1 diabetes mellitus in children and adolescents. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2001;14 (4):435–42.
- Brunton S.** Pathophysiology of type 2 diabetes: the evolution of our understanding. *J Fam Pract* 2016; 65(4).
- Bruunsgaard H, Galbo H, Halkjaer-Kristensen J, Johansen TL, MacLean DA, Pedersen BK.** Exercise-induced increase in serum interleukin-6 in humans is related to muscle damage. *J Physiol* 1997; 499(Pt 3): 833-841.
- Burke SJ, Lu D, Sparer TE, Karlstad MD, Collier JJ.** Trnascrption of the gene encoding TNF- α in increased by IL-1 β in rat and human islets and β -cell lines. *Mol Immunol* 2014; 62: 54-62.
- C** → **Cabrera SM, Henschel AM, Hessner MJ.** Innate inflammation in type 1 diabetes. *Transl Res* 2016; 167: 214-227.
- Calvo-Muñoz I, Gómez-Conesa A, Sánchez-Meca J.** Physical therapy treatments for low back pain in children and adolescents: a meta-analysis. *BMC Musculoskelet Disord* 2013; 14:55.
- Carral San Laureano F, Gutiérrez Manzanedo JV, Ayala Ortega C, García Calzado C, Silva Rodríguez JJ, Aguilar Diosdado M.** Impact of physical activity on metabolic control and the development of chronic complications in patients with type 1 diabetes mellitus. *Endocrinol Nutr* 2010; 57(6):268-76.
- Carral F, Gutiérrez JV, Ayala MC, García G, Aguilar M.** Intense physical activity is associated with better metabolic control in patients with type 1 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract.* 2013;101(1):45-9.

Chen MC, Schuit F, Eizirik DL. Identification of IL-1beta induced messenger RNAs in rat pancreatic beta cells by differential display of messenger RNA. *Diabetologia* 1999; 42(10):1199-203.

Chmelova H, Cohrs CM, Chouinard JA, Petzold C, Kuhn M, Chen C, Roeder I, Kretschmer K, Speier S. Distinct roles of beta cell mass and function during type 1 diabetes onset and remission. *Diabetes* 2015; 64: 2148-2160.

Christensen CS, Christensen DP, Lundh M, Dahllöf MS, Haase TN, Velasquez JM, Laye MJ, Mandrup-Poulsen T, Solomon TP. Skeletal muscle to pancreatic β -cell cross-talk: the effect of humoral mediators liberated by muscle contraction and acute exercise on β -cell apoptosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100: E1289-E1298.

Codella R, Luzi L, Inverardi L, Ricordi C. The anti-inflammatory effects of exercise in the systemic thread of diabetes and autoimmunity. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2015; 19: 3709-3722.

Cole TJ, Bellizzi MC, Flegal KM, Dietz WH. Establishing a standard definition for child overweight and obesity worldwide: international survey. *BMJ* 2000; 320 (7244):1240–1243.

Conn VS, Hafdahl AR, Lemaster JW, Ruppert TM, Cochran JE, Nielsen PJ. Meta-analysis of health behavior change interventions in type 1 diabetes. *Am J Health Behav* 2008; 32(3):315-329.

Corretti MC, Anderson TJ, Benjamin EJ, Celermajer D, Charbonneau F, Creager MA, Deanfield J, Drexler H, Gerhard-Herman M, Herrington D, Vallance P, Vita J, Vogel R. Guidelines for the ultrasound assessment of endothelial-dependent flow-mediated vasodilation of the brachial artery: a report of the International Brachial Artery Reactivity Task Force. *J Am Coll Cardiol* 2002; 39 (2):257–265.

- D** → **Daniele G, Guardado-Mendoza R, Winnier D, Fiorentino TV, Pengou Z, Cornell J, Andreozzi F, Jenkinson C, Cerosimo E, Federici M, Tripathy D, Folli F.** The inflammatory status score including IL-6, TNF- α , osteopontin, fractalkine, MCP-1 and adiponectin underlies whole-body insulin resistance and hyperglycemia in type 2 diabetes mellitus. *Acta Diabetol* 2014; 51: 123-131.
- Dauriz M, Trombetta M, Boselli L, Santi L, Brangani C, Pichiri I, Bonora E, Bonadonna RC.** Interleukin-6 as a potential positive modulator of human beta-cell function: an exploratory analysis-the Verona Newly Diagnosed Type 2 Diabetes Study (VNDS) 6. *Acta Diabetol* 2015; 53: 393-402.
- Davis JR, Johnson R, Stepanek J, Fogarty JA.** *Fundamentals of Aerospace Medicine* (4th ed). Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 2008.
- De Fronzo RA.** Pharmacologic therapy for type 2 diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 1999; 17; 131(4):281-303.
- Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Research Group, Nathan DM, Zinman B, Cleary PA, Backlund JY, Genuth S, Miller R, Orchard TJ.** Modern-day clinical course of type 1 diabetes mellitus after 30 years' duration: the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications and Pittsburgh epidemiology of diabetes complications experience (1983-2005). *Arch Intern Med* 2009; 169(14):1307-16.
- Dirice E, Kahraman S, Jiang W, El Ouaamari A, De Jesus DF, Teo AK, Hu J, Kawamori D, Gaglia JL, Mathis D, Kulkarni RN.** Soluble factors secreted by T-cells promote β -cell proliferation. *Diabetes* 2013; 63: 188-202.
- Dorrell C, Schug J, Canaday PS, Russ HA, Tarlow BD, Grompe MT, Horton T, Hebrok M, Streeter PR, Kaestner KH, Grompe M.** Human islets contain four distinct subtypes of β cells. *Nat Commun* 2016; doi: 10.1038/ncomms11756.

- Droog EJ, Henricson J, Nilsson GE, Sjöberg F.** A protocol for iontophoresis of acetylcholine and sodium nitroprusside that minimizes nonspecific vasodilatory effects. *Microvasc Res* 2004; 67 (2):197–202.
- Dwyer CJ, Ward NC, Pugliese A, Malek TR.** Promoting immune regulation in type 1 diabetes using low-dose interleukin-2. *Curr Diab Rep* 2016; 16: 46.
- E** → **Eguchi K, Nagai R.** Islet inflammation in type 2 diabetes and physiology. *J Clin Invest* 2017; 3;127(1):14-23.
- El-Assaad W, Joly E, Barbeau A, Sladek R, Buteau J, Maestre I, Pepin E, Zhao S, Iglesias J, Roche E, Prentki M.** Glucolipotoxicity alters lipid partitioning and causes mitochondrial dysfunction, cholesterol, and ceramide deposition and reactive oxygen species production in INS832/13 β -cells. *Endocrinology* 2010; 151: 3061-3073.
- Erbağci AB, Tarakçıoğlu M, Coşkun Y, Sivaslı E, Sibel Namiduru E.** Mediators of inflammation in children with type 1 diabetes mellitus: cytokines in type 1 diabetic children. *Clin Biochem* 2001; 34(8): 645-50.
- Eringsmark Regnéll S, Lemmark A.** The environment and the origins of islet autoimmunity and type 1 diabetes. *Diabet Med* 2012; 30: 155-160.
- F** → **Febbraio MA, Steensberg A, Keller C, Starkie RL, Nielsen HB, Krstrup P, Ott P, Secher NH, Pedersen BK.** Glucose ingestion attenuates interleukin-6 release from contracting skeletal muscle in humans. *J Physiol* 2003; 549 (Pt 2): 607-612.
- Fredheim S, Johannesen J, Johansen A, Lyngsøe L, Rida H, Andersen ML, Lauridsen MH, Hertz B, Birkebæk NH, Olsen B, Mortensen HB, Svensson J, Danish Society for Diabetes in Childhood and Adolescence.** Diabetic ketoacidosis at the onset of type 1 diabetes is associated with future HbA1c levels. *Diabetologia* 2013; 56(5):995-1003.

- G** → **Galassetti P, Riddell MC.** Exercise and type 1 diabetes (T1DM). *Compr Physiol* 2013; 3: 1309-1336.
- Gallagher MP, Goland RS, Greenbaum CJ.** Making progress: preserving beta cells in type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1243:119-134.
- Gillett MJ.** International Expert Committee report on the role of the A1c assay in the diagnosis of diabetes: *Diabetes Care* 2009; 32(7): 1327-1334. *Clin Biochem Rev* 2009; 30(4):197-200.
- Giralt P, Urrea JM, Sanabria C, Giralt J, Pérez MJ, Benito P.** Diferencias biológicas en la presentación de la diabetes tipo 1A en relación con los marcadores genéticos HLA-DQ. *Med Clin (Barc)*. 2002; 120(1): 6-9.
- Golbidi S, Badran M, Laher I.** Antioxidant and anti-inflammatory effects of exercise in diabetic patients. *Exp Diabetes Res* 2012; 2012:941868.
- Gómez-Banoy N, Mockus I.** MicroRNAs: circulating biomarkers in type 2 Diabetes Mellitus and physical exercise. *Rev Med Chil* 2016; 144 (3): 355-363.
- Gomís R.** Tratado S.E.D. de Diabetes Mellitus, bases moleculares, clínicas y tratamiento. Editorial Panamericana. *Ars Pharm* 2007; 48 (1): 107-113.
- Goudy KS, Burkhardt BR, Wasserfall C, Song S, Campbell-Thompson ML, Brusko T, Powers MA, Clare-Salzler MJ, Sobel ES, Ellis TM, Flotte TR, Atkinson MA.** Systemic overexpression of IL-10 induces CD4+CD25+ cell populations in vivo and ameliorates type 1 diabetes in nonobese diabetic mice in a dose-dependent fashion. *J Immunol* 2003; 171 (5):2270-2278.
- Grant RW, Dixit VD.** Mechanisms of disease: inflammasome activation and the development of type 2 diabetes. *Front Immunol* 2013; 4: 50.
- Grinberg-Bleyer Y, Baeyens A, You S, Elhage R, Fourcade G, Gregoire S, Cagnard N, Carpentier W, Tang Q, Bluestone J, Chatenoud L, Klatzmann D, Salomon BL, Piaggio E.** IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. *J Exp Med* 2010a;207 (9):1871-1878.

Grinberg-Bleyer Y, Saadoun D, Baeyens A, Billiard F, Goldstein JD, Gregoire S, Martin GH, Elhage R, Derian N, Carpentier W, Marodon G, Klatzmann D, Piaggio E, Salomon BL. Pathogenic T cells have a paradoxical protective effect in murine autoimmune diabetes by boosting Tregs. *J Clin Invest* 2010b; 120 (12):4558- 4568.

Groussard C, Rannou-Bekono F, Machefer G, Chevanne M, Vincent S, Sergent O, Cillard J, Gratas-Delamarche, A. Changes in blood lipid peroxidation markers and antioxidants after a single sprint anaerobic exercise. *Eur J Appl Physiol* 89 (1): 14-20.

H → **Hameed I, Masoodi SR, Mir SA, Nabi M, Ghazanfar K, Ganai BA.** Type 2 diabetes mellitus: From a metabolic disorder to an inflammatory condition. *World J Diabetes* 2015; 6: 598-612.

Hansen D, Dendale P, Jonkers RA, Beelen M, Manders RJ, Corluy L, Mullens A, Berger J, Meeusen R, van Loon LJ. Continuous low- to moderate-intensity exercise training is as effective and moderate- to high-intensity exercise training at lowering blood Hba(1c) in obese type 2 diabetes patients. *Diabetologia* 2009; 52: 1789-1797.

Harding R. Survival in space: Medical problems of manned spaceflight. Routledge, London, 1989.

Hillhouse EE, Beauchamp C, Chabot-Roy G, Dugas V, Lesage S. Interleukin-10 limits the expansion of immunoregulatory CD4-CD8- T cells in autoimmune-prone non-obese diabetic mice. *Immunol Cell Biol* 2010; 88 (8):771-780.

Hirose L, Nosaka K, Newton M, Laveder A, Kano M, Peake J, Suzuki K. Changes in inflammatory mediators following eccentric exercise of the elbow flexors. *Exerc Immunol Rev* 2004;10: 75-90.

Howson JM, Walker NM, Clayton D, Todd JA. Confirmation of HLA class II independent type 1 diabetes associations in the major histocompatibility complex including HLA-B and HLA-A. *Diabetes Obes Metab* 2009; 11 (Suppl. 1): 31-45.

Huang HH, Farmer K, Windscheffel J, Yost K, Power M, Wright DE, Stehno-Bittel L. Exercise increases insulin content and basal secretion in pancreatic islets in type 1 diabetic mice. *Exp Diabetes Res* 2011; doi: 10.1155/2011/481427.

I Ibfelt T, Fischer CP, Plomgaard P, van Hall G, Pedersen BK. The acute effects of low-dose TNF- α on glucose metabolism and β -cell function in humans. *Mediators Inflamm* 2014; doi: 10.1155/2014/295478.

J Jaber-Douraki M, Pietropaolo M, Khadra M. Continuum Model of T-cell Avidity: Understanding Autoreactive and Regulatory T-Cell Responses in Type 1 Diabetes. *J Theor Biol* 2015; 383: 93–105.

Jakicic JM, Clark K, Coleman E, Donnelly JE, Foreyt J, Melanson E, Volek J, Volpe SL. Appropriate intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33(12):2145-56.

Jensen CC, Cnop M, Hull RL, Fujimoto WY, Kahn SE. Beta-cell function is the major determinant of oral glucose tolerance in four ethnic groups in the United States. *Diabetes* 2002; 51 (7):2170–78.

Jeppsson JO, Kobold U, Barr J, Finke A, Hoelzel W, Hoshino T, Miedema K, Mosca A, Mauri P, Paroni R, Thienpont L, Umemoto M, Weykamp C; International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC). Approved IFCC reference method for the measurement of HbA1c in human blood. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40(1):78-89.

John WG, Edwards R, Price CP. Laboratory evaluation of the DCA 2000 clinic HbA1c immunoassay analyser. *Ann Clin Biochem* 1994; 31 (Pt 4): 367-370.

Johnson MC, Garland AL, Nicolson SC, Li C, Samulski RJ, Wang B, Tisch R. β cell-specific IL-2 therapy increases islet Foxp3⁺ Treg and suppresses type 1 diabetes in NOD mice. *Diabetes* 2013; 62: 3775-3784.

Johnston RS, Dietlein LF. Biomedical results from Skylab. National Aeronautics and Space Administration (NASA), Washington DC, 1977.

K ➔ **Kahn SE, Cooper ME, Del Prato.** Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present and future. *Lancet* 2014; 383(9922): 1068–83.

Kaplon-Cieslicka A, Postula M, Rosiak M, Peller M, Kondracka A, Serafin A, Trzepla E, Opolski G, Filipiak KJ. Younger age, higher body mass index and lower adiponectin concentration predict higher serum thromboxane B2 level in aspirin-treated patients with type 2 diabetes: an observational study. *Cardiovasc Diabetol* 2014; 15; 13: 112.

Karpoff L, Vinet A, Schuster I, Oudot C, Goret L, Dautzat M, Obert P, Perez-Martin A. Abnormal vascular reactivity at rest and exercise in obese boys. *Eur J Clin Invest* 2009; 39 (2):94–102.

Karstoft K, Pedersen BK. Exercise and type 2 diabetes: Focus on metabolism and inflammation. *Immunol Cell Biol* 2015; 94: 146-150.

Kim S1, Kim KA, Suk K, Kim YH, Oh SH, Lee MK, Kim KW, Lee MS. Apoptosis of human islet cells by cytokines. *Immune Netw* 2012; 12(3): 113-7.

Kukreja A, Costi G, Marker J, Zhang CH, Sinha S, Sun Z, Maclaren N. NKT cell defects in NOD mice suggest therapeutic opportunities. *J Autoimmun* 2002; 19(3): 117-28.

Kukreja A, Cost G, Marker J, Zhang C, Sun Z, Lin-Su K, Ten S, Sanz M, Exley M, Wilson B, Porcelli S, Maclaren N. Multiple immune regulatory defects in type-1 diabetes. *J Clin Invest* 2002; 109 (1): 131-140.

L ➔ **Lachance PA.** Nutrition in space. En: *Modern Nutrition in Health and Disease* (8th Edition) (Shils ME, Olson JA, Shike M, eds). Lea & Febiger, Philadelphia, 1994.

Leahy MJ, de Mul FF, Nilsson GE, Maniewski R. Principles and practice of the laser-Doppler perfusion technique. *Technol Health Care* 1999; 7 (2-3):143–162.

Lightfoot YL, Chen J, Mathews CE. Immune-mediated β -cell death in type 1 diabetes: lessons from human β -cell. *Eur J Clin Invest* 2012; 42(11): 1244–51.

- Li M, Song LJ, Qin XY.** Advances in the cellular immunological pathogenesis of type 1 diabetes. *J Cell Mol Med* 2014; 18: 749-758.
- Li Y, Xu W, Liao Z, Yao B, Chen X, Huang Z, Hu G, Weng J.** Induction of long-term glycemic control in newly diagnosed type 2 diabetic patients is associated with improvement of beta-cell function. *Diabetes Care* 2004; 27(11):2597-602.
- Ling Z, Van de Castele M, Eizirik DL, Pipeleers DG.** Interleukin-1beta-induced alteration in a beta cell phenotype can reduce cellular sensitivity to conditions that cause necrosis but not to cytokine-induced apoptosis. *Diabetes* 2000;49 (3) :340-5.
- Loria V, Dato I, Graziani F, Biasucci LM.** Myeloperoxidase: a new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. *Mediators Inflamm* 2008; 2008:135625.
- Ludvigsson J.** Novel therapies in the management of type I diabetes mellitus. *Panminerva Med* 2012; 54:257-270.
- Ludvigsson J.** Therapy with GAD in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2009; 25 (4):307-315.
- Luo C, Li B, Yin HP, Wang M Liu JL.** Transcriptional activation of Reg2 and Reg3 β genes by glucocorticoids and interleukin-6 in pancreatic acinar and islet cells. *Mol Cell Endocrinol* 2013; 365(2):187-96.
- M** → **Mallard AR, Hollekim-Strand SM, Coombes JS, Ingul CB.** Exercise intensity, redox homeostasis and inflammation in type 2 diabetes mellitus. *J Sci Med Sport* 2017, doi: 10.1016/j.jsams.2017.03.014.
- Malm C.** Exercise immunology: the current state of man and mouse. *Sports Med* 2004;34(9):555-566.

Marroqui L, Dos Santos RS, Op de Beeck A, Coomans de Brachène A, Marselli L, Marchetti P, Eizirik DL. Interferon- α mediates human beta cell HLA class I overexpression, endoplasmic reticulum stress and apoptosis, three hallmarks of early human type 1 diabetes. *Diabetologia* 2017; doi: 10.1007/s00125-016-4201-3.

Martínez-Ramonde T, Alonso N, Cordido F, Cervelló E, Cañizares A, Sempere JM, Roche E. Importance of exercise in the control of metabolic and inflammatory parameters at the moment of onset in type 1 diabetic subjects. *Exp clin endocrinol diabetes* 2014; 122 (6) : 334-40.

Matsuzaki G, Umemura M. Interleukin-17 as an effector molecule of innate and acquired immunity against infections. *Microbiol Immunol* 2007; 51(12):1139-47.

McGeachy MJ, Bak-Jensen KS, Chen Y. TGF- β and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain Th-17 cell-mediated pathology. *Nat Immunol* 2007; 8(12):1390-7.

Mitranun W, Deerochanawong C, Tanaka H, Suksom D. Continuous vs interval training on glycemic control and macro- and microvascular reactivity in type 2 diabetic patients. *Scand J Med Sci Sports* 2014; 24: e69-e76.

Montane J, Cadavez L, Novials A. Stress and the inflammatory process: a major cause of pancreatic cell death in type 2 diabetes. *Diabetes Metab Syndr Obes* 2014; 7: 25-34.

Montanya-Mías E, Tellez-Besolí. Control y mecanismos implicados en la secreción de insulina. En: *Tratado SED de diabetes mellitus. Bases moleculares, clínicas y tratamiento* (Gomis R, Rovira A, Feliu JE, Oyarzábal M, eds). Editorial Médica Panamericana, Madrid, 2007, pp: 111-122.

Montero D, Walther G, Perez-Martin A, Santamaria C, Roche E, Mercier C, Vinet A. Decreased microvascular myogenic response to insulin in severely obese adolescents. *Clin Hemorheol Microcirc* 2014a; 57: 23-32.

Montero D, Walther G, Perez-Martin A, Mercier CS, Gayrard S, Vicente-Salar N, Sempere JM, Martinez-Peinado P, Roche E, Vinet A. Effects of a lifestyle program on vascular reactivity in macro and microcirculation in severely obese adolescents. *J ClinEndocrinolMetab* 2014b; 99: 1019-1026.

Moole H, Moole V, Mamidipalli A, Dharmapuri S, Boddireddy R, Taneja D, Sfeir H, Gajula S. Spontaneous complete remission of type 1 diabetes mellitus in an adult - review and case report. *J Community Hosp Intern Med Perspect* 2015; 19;5(5):28709.

Morris AP, Voight BF, Teslovich TM... McCarthy MI. Large-scale association analysis provides insights into the genetic architecture and pathophysiology of type 2 diabetes. *Nat Genet.* 2012; 44 (9): 981-90. Esta referencia tiene mas de 50 autores.

Mortensen HB, Hougaard P, Swift P, Hansen L, Holl RW, Hoey H, Bjoerndalen H, de Beaufort C, Chiarelli F, Danne T, Schoenle EJ, Aman J. New definition for the partial remission period in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32(8):1384-90.

Muñoz-Barragán L, Gómez-Esteban MB, Carbajo S. Aspectos fisiopatológicos de la citoarquitectura de los islotes de Langerhans. En: Tratado SED de diabetes mellitus. Bases moleculares, clínicas y tratamiento (Gomis R, Rovira A, Feliu JE, Oyarzábal M, eds). Editorial Médica Panamericana, Madrid, 2007, pp: 81-92.

N → **Nadeau KJ, Anderson BJ, Berg EG, Chiang JL, Chou H, Copeland KC, Hannon TS, Huang TT, Lynch JL, Powell J, Sellers E, Tamborlane WV, Zeitler P.** Youth-Onset Type 2 Diabetes Consensus Report: Current Status, Challenges, and Priorities. *Diabetes Care* 2016; 39(9):1635-42.

Nejentsev S, Howson JM, Walker NM, Szeszko J, Field SF, Stevens HE, Reynolds P, Hardy M, King E, Masters J, Hulme J, Maier LM, Smyth D, Bailey R, Cooper JD, Ribas G, Campbell RD, Clayton DG, Todd JA. Localization of type 1 diabetes susceptibility to the MHC class I genes HLA-B and HLA-A. *Nature* 2007; 450: 887-892.

Nielsen PJ, Hafdahl AR, Conn VS, Lemaster JW, Brown SA. Meta-analysis of the effect of exercise interventions on fitness outcomes among adults with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2006;74 (2):111-120.

Niess AM, Simon P. Response and adaptation of skeletal muscle to exercise the role of reactive oxygen species. *Front Biosci* 2007; 12:4826-4838.

Nieuwoudt S, Fealy CF, Foucher JA, Scelsi AR, Malin SK, Pagadala MR, Rocco M, Burguera B, Kirwan JP. *Am J PhysiolEndocrinolMetab* 2017, doi: 10.1152/ajpendo.00407.2016

Notkins AL. Immunologic and genetic factors in type 1 diabetes. *J Biol Chem* 2002; 277: 43545- 43548.

O → **Olza J, Aguilera CM, Gil-Campos M, Leis R, Bueno G, MartínezJimenez MD, Valle M, Canete R, Tojo R, Moreno LA, Gil A.** Myeloperoxidase is an early biomarker of inflammation and cardiovascular risk in prepubertal obese children. *Diabetes Care* 2012; 35:2373–2376.

Oram RA, Jones AG, Besser RE, Knight BA, Shields BM, Brown RJ, Hattersley AT, McDonald TJ. The majority of patients with long-duration type 1 diabetes are insulin microsecretors and have functioning beta cells. *Diabetologia* 2014; 57: 187-191.

P → **Padberg I, Peter E, González-Maldonado S, Witt H, Mueller M, Weis T, Bethan B, Liebenberg V, Wiemer J, Katus HA, Rein D, Schatz P.** A new metabolomic signature in type 2 diabetes mellitus and its pathophysiology. *PLoS One* 2014; 17; 9 (1): e85082.

Paula FM, Leite NC, Vanzela EC, Kurauti MA, Freitas-Dias R, Carneiro EM, Boschero AC, Zoppi CC. Exercise increases pancreatic β -cell viability in a model of type 1 diabetes through IL-6 signaling. *FASEB J* 2015; 29: 1805-1816.

Park YJ, Warnock GL, Ao Z, Safikhani N, Meloche M, Asadi A, Kieffer TJ, Marzban L. Dual role of IL-1 β in islet amyloid formation and its β -cell toxicity: Implications in type 2 diabetes and islets transplantation. *Diabetes Obes Metab* 2017; doi: 10.1111/dom.12873.

- Pérez-Díaz.** Diabetes mellitus. *Gac Med Mex* 2016; 152 (1):50-5.
- Pociot F, Akolkar B, Concannon P, Erlich H, Julier C, Morahan G, Nierras C, Todd J, Rich S, Nerup J.** Genetics of Type 1 Diabetes: What's Next? *Diabetes* 2010; 59 (7): 1561-1571.
- Q** → **Qin HY, Chaturvedi P, Singh B.** In vivo apoptosis of diabetogenic T cells in NOD mice by IFN-gamma/TNF-alpha. *Int Immunol* 2004;16 (12):1723-1732.
- Quílez P, Reig M.** Glycemic control through physical exercise in type 2 diabetes systematic review. *Nutr Hosp* 2015; 31(4):1465-72.
- R** → **Rapoport MJ, Jaramillo A, Zipris D, Lazarus AH, Serreze DV, Leiter EH, Cyopick P, Danska JS, Delovitch TL.** Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 1993;178 (1):87-99.
- Robertson RP.** Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem* 2004;279 (41):42351- 42354.
- Rocha VZ, Folco EJ.** Inflammatory concepts of obesity. *Int J Inflamm* 2011; 2011:529061.
- Rolland-Cachera MF, Cole TJ, Sempe M, Tichet J, Rossignol C, Charraud A.** Body Mass Index variations: centiles from birth to 87 years. *Eur J Clin Nutr* 1991; 45 (1):13-21.
- Rosa JS, Oliver SR, Mitsuhashi M, Flores RL, Pontello AM, Zaldivar FP, Galassetti PR.** Altered kinetics of interleukin-6 and other inflammatory mediators during exercise in children with type 1 diabetes. *J Investig Med* 2008; 56 (4):701-13.
- Rossi G,** American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Recent Prog Med* 2010; 101 (7-8):274-6.
- Rützi S, Howald C, Arous C, Dermitzakis E, Halban PA, Bouzakri K.** IL-13 improves beta-cell survival and protects against IL-1beta-induced beta-cell death. *Mol Metab* 2015; 5: 122-131.

- S** ➔ **Saltiel AR, Kahn CR.** Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature*. 2001; 414 (6865): 799-806.
- Santin I, Eizirik DL.** Candidate genes for type 1 diabetes modulate pancreatic islet inflammation and β -cell apoptosis. *Diabetes Obes Metab* 2013; 15: 71-81.
- Serreze DV, Chapman HD, Post CM, Johnson EA, Suarez-Pinzon WL, Rabinovitch A.** Th1 to Th2 cytokine shifts in nonobese diabetic mice: sometimes an outcome, rather than the cause, of diabetes resistance elicited by immunostimulation. *J Immunol* 2001;166 (2):1352-1359.
- Scheele C, Nielsen S, Pedersen BK.** ROS and myokines promote muscle adaptation to exercise. *Trends Endocrinol Metab* 2009; 20(3) 95-99.
- Shioya M, Andoh A, Kakinoki S, Nishida A, Fujiyama Y.** Interleukin 22 receptor 1 expression in pancreas islets. *Pancreas* 2008;36:197-199.
- Sgouroudis E, Albanese A, Piccirillo CA.** Impact of protective IL-2 allelic variants on CD4+ Foxp3+ regulatory T cell function in situ and resistance to autoimmune diabetes in NOD mice. *J Immunol* 2008;181(9):6283-6292.
- Shioya M, Andoh A, Kakinoki S, Nishida A, Fujiyama Y.** Interleukin 22 receptor 1 expression in pancreas islets. *Pancreas* 2008; 36 (2):197-199.
- Singh B, Nikoopour E, Huszarik K, Elliott JF, Jevnikar AM.** Immunomodulation and regeneration of islet beta cells by cytokines and autoimmune type 1 diabetes. *J Interf Cytok Res* 2011;31 (10):711-719.
- Smith SM, Davis-Street J, Neasbitt L, Zwart SR.** Space Nutrition. NASA, Washington DC, 2012.
- Stamper IJ, Jackson E, Wang X.** Phase transitions in pancreatic islet cellular networks and implications for type-1 diabetes. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys* 2014; 89 (1): 012719.
- Steinberg JG, Ba A, Bregeon F, Delliaux S, Jammes Y.** Cytokine and oxidative responses to maximal cycling exercise in sedentary subjects. *Med Sci Sports Exerc* 2007; 39(6):964-8.

- Szablewski L.** Role of immune system in type 1 diabetes mellitus pathogenesis. *Int Immunopharmacol* 2014; 22: 182-191.
- T** ➔ **Takasawa S.** Regenerating gene (REG) product and its potential clinical usage. *Expert Opin Ther Targets* 2015; 20: 541-550.
- Tang Q, Adams JY, Penaranda C, Melli K, Piaggio E, Sgouroudis E, Piccirillo CA, Salomon BL, Bluestone JA.** Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction. *Immunity* 2008;28 (5):687-697.
- Taylor-Fishwick DA, Weaver JR, Grzesik W, Chakrabarti S, Green-Mitchell S, Imai Y, Kuhn N, Nadler JL.** Production and function of Il-12 in islets and beta cells. *Diabetologia* 2013; 56: 126-135.
- Ting C, Bansal V, Batal I, Mounayar M, Chabtini L, El Akiki G, Azzi J.** Impairment of immune systems in diabetes. *Adv Exp Med Biol* 2012; 771: 62-75.
- Toft AD, Jensen LB, Bruunsgaard H, Ibfelt T, Halkjaer-Kristensen J, Febbraio M, Pedersen BK.** Cytokine response to eccentric exercise in young and elderly humans. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;283 (1):C289-295.
- Thorel F, Népote V, Avril I, Kohno K, Desgraz R, Chera S, Herrera PL.** Conversion of adult pancreatic alpha-cells to beta-cells after extreme beta-cell loss. *Nature* 2010; 464: 1149-1154.
- Torres IV, Donlo IC.** Control of type 2 diabetes mellitus in Spain today: identification of the main obstacles in daily clinical practice. *Med Clin* 2013; 141 Suppl 2:3-6.
- U** ➔ **Unger RH, Grundy S.** Hyperglycaemia as an inducer as well as a consequence of impaired islet cell function and insulin resistance: implications for the management of diabetes. *Diabetologia* 1985; 28(3):119-21.
- V** ➔ **Vega-Anaya GC, Hernández-Lomelí A, Hernández-Montiel HL.** Mechanism of immunological injury in type 1 diabetes. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc* 2009; 47(5): 515-22.

- van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG.** Type 1 diabetes: etiology, immunology and therapeutic strategies. *Physiol Rev* 2011; 91(1): 79–118.
- Vanbuecken DE, Greenbaum CJ.** Residual C-peptide in type 1 diabetes: what do we really know? *Pediatr Diabetes* 2014; 15: 84-90.
- Vicente-Salar N, Santana A, Reig J, Roche E.** Differentiation of embryonic stem cells using pancreatic bud-conditioned medium gives rise to neuroectoderm derived insulin-secreting cells. *Cell Reprogram* 2011; 13 (1):77-84.
- von Herrath M, Homann D.** Introducing baselines for therapeutic use of regulatory t cells and cytokines in autoimmunity. *Trends immunol* 2003; 24 (10): 540-5.
- W** → **Wachlin G, Augstein P, Schröder D, Kuttler B, Klötting I, Heinke P, Schmidt S.** IL-1beta, IFN gamma and TNF-alpha increase vulnerability of pancreatic beta cell to autoimmune destruction. *J Autoimmun* 2003; 20 (4): 303-12.
- Wadley AJ, Chen YW, Lip GY, Fisher JP, Aldred S.** Low volume-high intensity interval exercise elicits antioxidant and anti-inflammatory effects in humans. *J Sports Sci* 2016; 34(1):1-9.
- Wenzlau JM¹, Juhl K, Yu L, Moua O, Sarkar SA, Gottlieb P, Rewers M, Eisenbarth GS, Jensen J, Davidson HW, Hutton JC.** The cation efflux transporter ZnT8 (Slc30A8) is a major autoantigen in human type 1 diabetes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104(43): 17040-45.
- Wilson DH, Bogacz JP, Forsythe CM, Turk PJ, Lane TL, Gates RC, Brandt DR.** Fully automated assay of glycohemoglobin with the Abbott IMx analyzer: novel approaches for separation and detection. *Clin Chem* 1993; 39 (10): 2090-2097.
- X** → **Xia F, Cao H, Du J, Liu X, Liu Y, Xiang M.** Reg3g overexpression promotes β cell regeneration and induces immune tolerance in nonobese-diabetic mouse model. *J LeukocBiol* 2016; 99: 1131-1140.

- Xiong X, Wang X, Li B, Chowdhury S, Lu Y, Srikant CB, Ning G, Liu JL.** Pancreatic islet-specific overexpression of Reg3 β protein induced the expression of pro-islet genes and protected the mice against streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011;300 (4):E669-680.
- Y** ➔ **Yamanouchi J, Rainbow D, Serra P, Howlett S, Hunter K, Garner VE, Gonzalez-Munoz A, Clark J, Veijola R, Cubbon R, Chen SL, Rosa R, Cumiskey AM, Serreze DV, Gregory S, Rogers J, Lyons PA, Healy B, Smink LJ, Todd JA, Peterson LB, Wicker LS, Santamaria P.** Interleukin-2 gene variation impairs regulatory T cell function and causes autoimmunity. *Nat Genet* 2007;39 (3):329-337.
- Z** ➔ **Zimmet P, Alberti KG, Magliano DJ, Bennett PH.** Diabetes mellitus statistics on prevalence and mortality: facts and fallacies. *Nat Rev Endocrinol* 2016; 12(10):616-22.





ANEXOS

Personal pdf file for
T. Martínez-Ramonde, N. Alonso, F. Cordido, E. Cervelló,
A. Cañizares, P. Martínez-Peinado, J. M. Sempere,
E. Roche

With compliments of Georg Thieme Verlag

www.thieme.de

Importance of Exercise in the Control of Metabolic and Inflammatory Parameters at the Moment of Onset in Type 1 Diabetic Subjects

DOI 10.1055/s-0034-1372581

Exp Clin Endocrinol Diabetes 2014; 122: 334–340

For personal use only.
No commercial use, no depositing in repositories.

Publisher and Copyright
© 2014 by
Georg Thieme Verlag KG
Rüdigerstraße 14
70469 Stuttgart
ISSN 0947-7349

Reprint with the
permission by
the publisher only

 **Thieme**

Importance of Exercise in the Control of Metabolic and Inflammatory Parameters at the Moment of Onset in Type 1 Diabetic Subjects

Authors **T. Martínez-Ramonde¹, N. Alonso², F. Cordido¹, E. Cervelló³, A. Cañizares¹, P. Martínez-Peinado⁵, J. M. Sempere⁵, E. Roche^{2,6}**

Affiliations Affiliation addresses are listed at the end of the article

Key words

- C-peptide
- β -cell mass
- glycated haemoglobin
- inflammation

Abstract

The onset of type 1 diabetes coincides with the final phase of β -cell destruction. In some cases, this period is characterized by the presence of a functional reserve of β -cells, favouring an adequate metabolic control (honeymoon phase). Therefore, the extension of this situation could have evident benefits in subsequent diabetes management. We aimed to study the influence of regular physical activity before and after the onset of the disease. We did an observational study of 2 groups of type 1 diabetic patients from onset to a 2-year period. One group ($n=8$) exercised regularly (5 or more hours/week) before onset and continued doing so with the same regularity. The second group ($n=11$) either did not perform physical activity or did so sporadically.

Circulating glycated haemoglobin (HbA_{1c}), C-peptide, protein carbonyls and basal cytokine levels were determined at the beginning and at the end of the 1st and 2nd year. The more active group debuted with and maintained significantly lower HbA_{1c} levels and insulin requirements compared to the more sedentary group. C-peptide levels were only significantly higher in the active group at the moment of onset compared to the sedentary group. In addition, determination of basal circulating cytokines revealed a large variability between individuals but no significant differences when comparing the groups. Altogether, the obtained results seem to indicate that physical activity allows a better control at the moment of onset regarding glycaemic control, residual endocrine pancreatic mass and subsequent insulin requirements.

received 16.01.2014
first decision 04.03.2014
accepted 19.03.2014

Bibliography

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0034-1372581>
Published online:
May 5, 2014
Exp Clin Endocrinol Diabetes
2014; 122: 334–340
© J. A. Barth Verlag in
Georg Thieme Verlag KG
Stuttgart · New York
ISSN 0947-7349

Correspondence

E. Roche
Institute of Bioengineering
University Miguel Hernandez
Avda de la Universidad sn.
03202-Elche
Alicante (Spain)
Tel.: + 34/965/222 029
Fax: + 34/965/222 033
eroche@umh.es

Introduction

The clinical symptoms of type 1 diabetes coincide with the final phase of β -cell destruction. This stage presents islet inflammation or insulinitis, enhanced HLA (human leukocyte antigens) expression, presence of β -cell autoantibodies (antiGAD, antiIA-2, antiICA or anti-insulin among others) and β -cell dysfunction. Mononuclear cells infiltrate into the islet tissue, including CD4⁺ and CD8⁺ T-lymphocytes, macrophages and components of the complement system [1]. The high expression of HLA molecules and antigen transporter proteins indicates an enhanced antigen-presenting activity in the islet tissue, where the β -cell plays an instrumental role. Once the autoimmune process is activated by auto-reactive T-cells, the stimulation continues due to the presence of auto-antigens, leading to the expansion of effector cells and increasing the attack against β -cells [2].

Activated T-lymphocytes exist in circulation and in islet infiltrate. Under normal conditions, they are generally controlled by auto-tolerance mechanisms, however under diabetic conditions such control fails, leading to a cascade of inflammatory processes that culminate in insulinitis. The pathogenic immune response is mediated by Th1 lymphocytes and the protection by the Th2 subset. These populations are characterized by the production of different types of cytokines. Th1 subset secretes pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IFN- γ , IL-1 β and IL-12, while Th2 lymphocytes produce anti-inflammatory IL-4, IL-6 and IL-10 cytokines [3].

As previously mentioned, the destruction of pancreatic β -cells marks the initiation of the disease. However, in many cases a β -cell residual function exists at the moment of onset, allowing a good control of hyperglycaemia during a variable period of time. This transient phase is known as the honeymoon period. In this sense, several cohort studies and a retrospective analysis of the DCC

(Diabetes Control and Complication Trial) demonstrated the benefits of preserving over years a residual β -cell function, monitored by C-peptide detection in circulation. These benefits are circumscribed to improved glycated haemoglobin (HbA_{1c}) levels and reduction of severe hypoglycaemia crisis. Initial studies seem to indicate that this metabolic stability correlates with a preserved β -cell function [4]. This is of particular interest in certain moments of the patient's life, such as during adolescence, where the metabolic control of the disease is complicated due to the acquisition of new responsibilities and the lack of interest for certain topics, such as disease management. In addition, the DCCT indicates a low frequency to develop long-term complications, a reduced risk of ketoacidosis and better response to immunotherapy [4].

Therefore, the question is which strategies could help to debut with a significant residual β -cell mass at the moment of onset. Several pharmacological agents such as cyclosporine, azathioprine and prednisone were initially used to this end, but quickly discarded due to their secondary effects [5]. More recently, phase III trials using monoclonal antibodies against CD3 failed to retard the destruction of β -cells, although a single-dose regime yielded interesting results in young patients [6]. Other pharmacological compounds are still in the experimental phase. These include rituximab that acts by suppressing anti-insulin antibodies with no effect in other islet auto-antibodies [7]. The same rationale can be applied to anti-GAD antibodies, which act exclusively upon the GAD-expressing specific populations of β -cells [6]. Other experimental therapies include antibodies against CTLA4/CD152 which is a stimulatory molecule similar to CD28 that is expressed in T-helper cells [7]. Finally etanercept, a blocking agent of the TNF- α receptor, may affect other cellular responses in other organs where this cytokine is playing a signalling role [8]. Therefore, more research is necessary concerning the use of pharmacological agents.

On the other hand, several studies underline the metabolic and psychological advantages of physical exercise in the management of type 1 diabetes once the disease has been established and the onset period passed [9,10]. However, there are no studies focused on the influence of physical activity at the moment of onset. With this objective, we have conducted an observational study in a group of patients at the moment of onset and during the subsequent 2 years. The group that regularly performed physical activity before, during and after the onset of diabetes presented low levels of HbA_{1c} as well as less exogenous insulin requirement. In addition, the more active group presented significant high circulating C-peptide levels only at the moment of onset. Values of protein carbonyl and circulating cytokines were not significantly different comparing both groups.

Materials and Methods



Subjects and study design

The key element of the pilot study design took in account that in the moment of onset, patients were asked about their habits on physical activity, being included in either Group A (for active) or Group S (for sedentary) (see Fig. 1). 19 subjects from 26 with recent onset of type 1 diabetes completed the 2 years study in the Endocrinology Service of the University Hospital Complex of A Coruña (Spain). The pilot study was registered in ClinicalTrials.gov (ID#: NCT 01789190) and approved by the Autonomic Ethics Committee and met both local requirements as well as those stated in the Helsinki Declaration for research on human beings.

The inclusion criteria for group distribution took in account the principles of the American College of Sports Medicine, considering as active physical activity to practice a moderate-vigorous exercise during 1 h, 5 days or more/week. In this context, a sedentary or less active person should be a person that practices any or less than 5 h weekly [11]. Since this is an observational pilot study, we could not prescribe exercise nor intervene in the exercise routine of the volunteers. The information concerning the physical activity programmes was provided by each participant and recorded in the clinical story. Briefly, information concerning the type of exercise, training periods (hours/day), competition time (days/week), resting (days/week) and incidences (lesions, holidays, stages, trips, etc.) were recorded. Although we could not directly measure the intensity of exercise, nevertheless, each participant indicated its own perception about the intensity of work and this information was also included in the story. Therefore, group A (n=8) included patients that used to perform regular physical activity before onset and continued practicing afterwards with the same regularity. Group S (n=11) included patients that did not perform any physical activity at the moment of onset, continuing with the same habits during the subsequent observational period. 4 individuals of this group started to practice moderate exercise for a maximum of 3 days a week during sporadic moments of the observational period (less than 1 h each session). All individuals were informed at the beginning, in the presence of tutors in the case of minors, about the objective and justification of the study and signed a written consent. The informed consent included the following items in a total of 7 pages: Introduction (indicating the main idea of the study), Description (study design), Risks (concerning routine blood sample collection), Confidentiality (samples were codified to preserve anonymity), Benefits (there is no economic compensation to participate), Results (they will be submitted to scientific publication), Voluntary participation (participants can leave the study at any moment), Additional information (Spanish laws that regulate the study), Remaining samples (they will be custodied in the Hospital's Bank) and Letter of Consent (including data of each individual and signatures). The mean age of group A was 21.9 \pm 4.2 years and included 8 individuals, 5 men and 3 women diagnosed at the moment of onset by hyperglycaemia (n=2), hyperglycaemia+ketoacidosis (n=4) or ketoacidosis (n=2). The mean age of group S was 23.3 \pm 2.2 years and included 11 individuals, 7 men and 4 women diagnosed at the moment of onset by hyperglycaemia (n=1), hyperglycaemia+ketoacidosis (n=3) or ketoacidosis (n=7). A clinical story and physical exploration was also performed in the first consultation. Fasting blood samples were taken from the antecubital vein to determine HbA_{1c}, C-peptide, antiGAD, cytokines and protein carbonyls. Patients and tutors entered the hospital educational program in order to learn about diet management, glycaemia monitoring and insulin injections. Consultations were initially performed on a weekly basis for the first month, then once a month for the remaining period. In each consultation, patients were asked about diet accomplishment, glycaemia monitoring, insulin injections and exercise performance. All individuals from group A declared to practice regularly intervallic routines, playing team sports (basketball for n=1 and soccer for n=6). Only one individual declared to perform aerobic exercise (long distance running and swimming). At the end of the first year a second blood sample was extracted in the same conditions from each individual to determine the same parameters. Exercise routine accomplishment and follow-up of diet

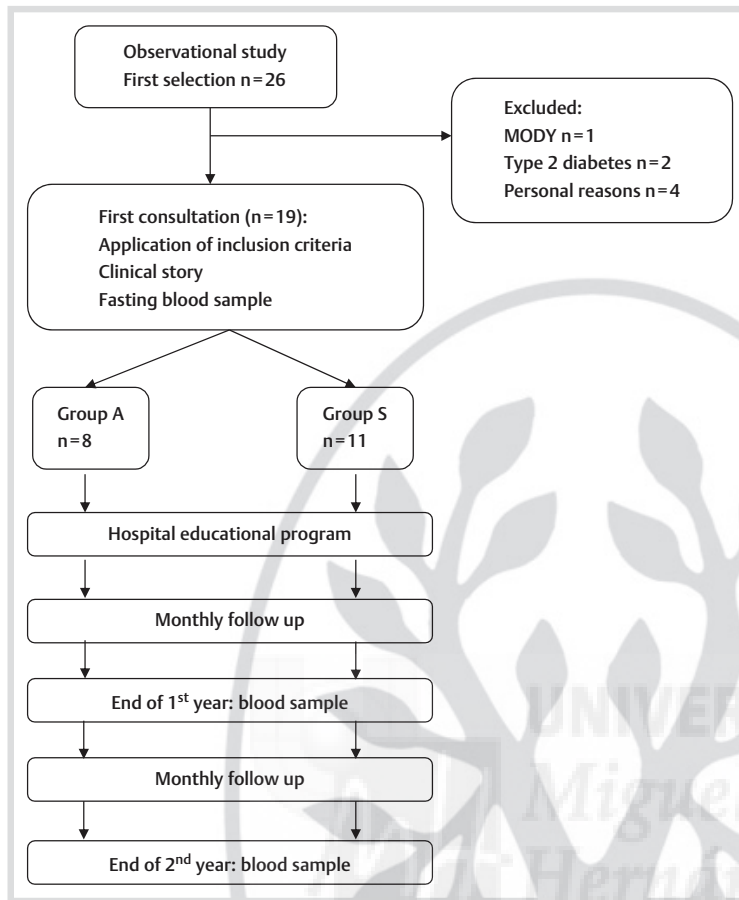


Fig. 1 Flow diagram for study design.

and insulin injections was followed monthly during one more year. At the end of this period, the pilot study was considered finished and the last blood extraction was performed in order to measure the same parameters. Other subjects were excluded because they were not capable to provide data required for study follow-up.

Circulating HbA_{1c}, C-peptide and protein carbonyl determinations

HbA_{1c} was determined by immunoanalysis. C-peptide was determined by radioimmunoassay using the Coat-a-Count kit (Diagnosis Products Corporation, LA). Protein carbonyl derivatives were calculated by adapting the method developed by Levine (1994) [12].

Circulating cytokine determinations

Cytokines were measured in plasma by Flow Cytometry (FACS-Calibur, BD Bioscience) through the Flowcytomix™ Multiplex Test (eBioscience) (n=3). The following cytokines were analysed for each patient: IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-17a, IL-22, TNF-α and INF-γ.

Statistical analysis

Statistical analysis was performed using the SPSS-20 software for Windows. Normality testing was performed according to the Kolmogorov-Smirnov test (K-S test). Results in **Table 1** were

expressed as the mean ± sem and the values with a p < 0.05 were considered statistically significant. The effect of physical activity on the changes induced in the different circulating parameters (HbA_{1c}, C-peptide, protein carbonyls and cytokines) and injected insulin at each particular time was tested by Student t-test for independent samples. The evolution of the different cytokines into each particular group of individuals throughout time was analysed by Student t-test for paired samples. Although there is a limitation in the sample size (n=8 for group A and n=11 for group S), we have performed additional analyses such as a general lineal model (GLM) of repeated measures considering time as an intragroup factor and physical activity as an intergroup factor, and a GLM of repeated measures considering only the intragroup factor (time) and no intergroup factor. Correlation between different parameters was performed according to Pearson's correlation coefficient. We considered arbitrarily a low correlation at r=±0–0.30, moderate at r=±0.31–0.60 and good at r=±0.61–1.

Results



Table 1 shows the determinations at the moment of onset and after 1 and 2 years of the circulating parameters (HbA_{1c}, C-peptide and protein carbonyls), insulin requirements and body mass index (BMI) of patients from both groups that completed the

Table 1 Circulating values for HbA_{1c}, insulin requirements, C-peptide, IDAA1C, protein carbonyls and BMI in the active (A) (n=8) and sedentary group (S) (n=11).

	Group A	Group S
Time 0		
HbA _{1c} (%)	9.57 ± 3.47*	12.68 ± 2.83
injected insulin (IU/kg of weight)	0.48 ± 0.38	0.72 ± 0.27
total insulin injected (IU)	31.71 ± 9.74	44.67 ± 5.25
C-peptide (pmol/L)	1.09 ± 0.76*	0.37 ± 0.13
IDAA1C	11.50 ± 4.95	15.02 ± 3.03
protein carbonyls (μmol/L)	76.19 ± 40.62	75.64 ± 12.43
BMI (kg/m ²)	20.80 ± 1.42	22.37 ± 0.71
1st year		
HbA _{1c} (%)	6.12 ± 0.64*	7.96 ± 1.80
injected insulin (IU/kg of weight)	0.07 ± 0.04*	0.54 ± 0.25
total insulin injected (IU)	5.43 ± 1.29*	35.83 ± 5.15
C-peptide (pmol/L)	1.07 ± 0.68	0.67 ± 0.39
IDAA1C	6.18 ± 0.61*	10.23 ± 1.90
protein carbonyls (μmol/L)	80.73 ± 10.28	87.49 ± 19.25
BMI (kg/m ²)	21.40 ± 1.33	24.41 ± 1.08
2nd year		
HbA _{1c} (%)	6.20 ± 0.75*	8.50 ± 1.96
injected insulin (IU/kg of weight)	0.14 ± 0.07*	0.61 ± 0.29
total insulin injected (IU)	7.67 ± 1.94*	37.50 ± 6.53
C-peptide (pmol/L)	1.87 ± 1.58	0.67 ± 0.37
IDAA1C	6.72 ± 0.92*	10.96 ± 2.28
protein carbonyls (μmol/L)	88.48 ± 19.67	91.87 ± 12.56
BMI (kg/m ²)	21.57 ± 1.25	24.06 ± 1.12

(*) Significant values (p<0.05) with respect to group S

study (n=19). Subjects that did not provide the necessary follow-up data were excluded from the study. HbA_{1c} served as a marker for average glycaemia levels over long periods of time [13]. As it can be observed in **Table 1**, group A presented at the time of onset significantly lower values of HbA_{1c} than group S. Interestingly, after the first year, group A presented HbA_{1c} values similar to those recommended by the American Diabetes Association (ADA) (6.5%) for the reduction of vascular complications [14]. At the end of the first and second year, group S presented acceptable HbA_{1c} values, but were significantly higher than those found in group A. However, the change observed in HbA_{1c} levels in both groups was similar (around 4%).

Circulating C-peptide levels were determined in this study as an indicator of the existence of a residual pancreatic β-cell mass [15]. At the moment of onset, individuals from group A presented 3 times significantly higher values of circulating C-peptide than patients from group S (**Table 1**). Differences between both groups were not significant at the end of the first and second year, although the values of C-peptide were always higher in group A compared to group S. The concentration of C-peptide determined at the end of the study in both groups was approximately twice the ones determined at the moment of onset. However, C-peptide levels are insufficient for detecting functionality in residual β-cells. The IDAA1C (insulin dose-adjusted HbA_{1c}) index has been proposed to define the partial remission period (honeymoon phase) and values of IDAA1C ≤ 9 strongly correlate with the existence of residual functional β-cells [16]. According to this, group A compared to group S displays IDAA1C values at the end of the first and second year that indicate the presence of functional endocrine pancreas (**Table 1**).

In the clinical practice, the insulin administered to each patient is strongly related, among other factors, to glycaemic control and to the presence of a residual pancreatic endocrine function.

According to data recorded in the clinical story of participants, we observed that individuals of group A required less insulin administration than subjects from group S, being significantly different at the end of the first and second year (**Table 1**). This is also reflected in the amount of total insulin units injected (**Table 1**). In addition, Pearson's correlation analysis revealed that the average amount of insulin injected measured in units/kg of body weight moderately correlated with HbA_{1c} levels at the end of the first year (r=0.545) and very positively at the end of the second year (r=0.768) in group A. However, there was less correlation between insulin requirements and C-peptide levels, being r=-0.423 at the end of the first year and r=-0.334 at the end of the second year. Therefore, the adequate glycaemic control as reflected by low HbA_{1c} levels seems to be the main determinant for reduced insulin requirements. Regular exercise could be instrumental to achieve this goal.

To verify this assumption, we applied the correlation analysis between exercise frequency and HbA_{1c} levels, resulting in a moderate correlation at the moment of onset (r=-0.528) and at the end of the first year (r=-0.680), but good at the end of the second year (r=-0.798). As expected, correlation between exercise frequency and insulin requirements evolved positively, being r=-0.502 at the moment of onset, r=-0.810 at the end of the first year and r=-0.884 at the end of the second year. Nevertheless, correlation was moderate or low when comparing exercise frequency and C-peptide levels, being r=0.579 at the moment of onset, r=0.242 at the end of the first year and r=0.507 at the end of the second year.

In an attempt to better understand the evolution of the disease in both groups of patients, we determined the levels of plasmatic protein carbonyls. This election was based on the observation that diabetes is a disease that presents oxidative stress events, with sustained hyperglycaemia being one of the main pro-oxidant disruptors [17]. This provokes the glycation of haemoglobin and possibly of other body proteins, developing over time oxidative adducts, including protein carbonyls. **Table 1** shows that there were no significant differences in the protein carbonyls of both groups, although group A tended to have slightly lower protein carbonyl values than group S. Finally, BMI did not present significant changes in both groups, although group A presented optimal values.

Altogether, these results seem to indicate that practicing regular physical activity before and after the onset gives rise to a positive evolution of different parameters, in particular HbA_{1c} levels. The question that arises is if there are other parameters that could be modulated by regular exercise. To this end, we focused on the immunological and inflammatory response, since they play an instrumental role in the progression and severity of disease [18]. In particular, we determined the levels of GAD antibodies, one of the most frequent autoantibodies in type 1 diabetes [19]. Interestingly, not all individuals presented positive antiGAD in circulation. In group A, 3 of the 8 individuals presented antiGAD values lower than 1 U/mL, while in group S only one individual did not present antiGAD. For the rest of the individuals with positive antibody values, the antiGAD values varied greatly, ranging 2–34 U/mL in group A and 1.2–30 U/mL in group S. Individually, we observed that antiGAD values remained unchanged throughout the whole period studied. Only one individual of group A presented a decrease in circulating antiGAD ranging from 3.9 U/mL at the moment of onset to 2 U/mL at the end of the second year. In group S, 2 individuals presented a decrease, with 30 U/mL at the moment of onset and 6.4 U/mL at

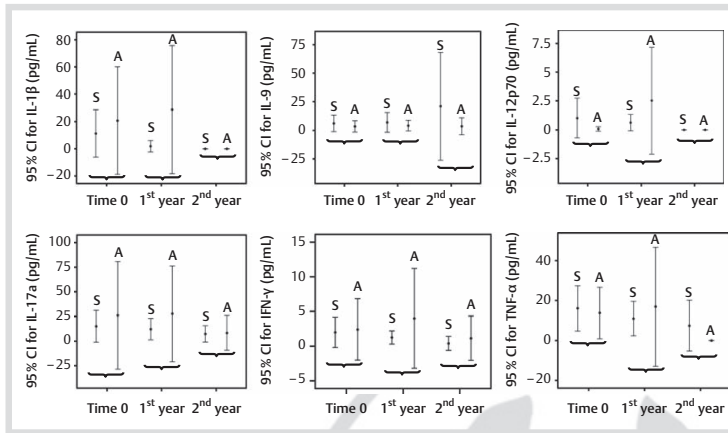


Fig. 2 Circulating cytokine ranges for sedentary (S) and active (A) individuals. Results are represented by error bars indicating 95% confidence interval (CI) based on Student t-test for paired data.

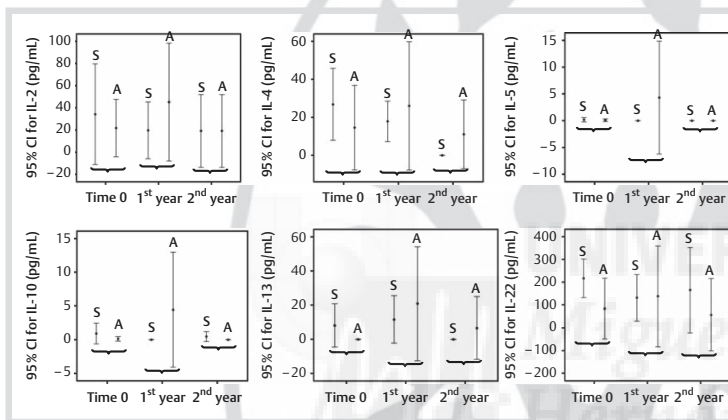


Fig. 3 Circulating cytokine ranges for sedentary (S) and active (A) individuals. Results are represented by error bars indicating 95% confidence interval (CI) based on Student t-test for paired data.

the end of the second year and from 4.7 to 1.9U/mL for the second individual in the same period of time. Altogether, the obtained results do not allow us to establish a correlation between the frequency of exercise practice and the circulating levels of antiGAD. On the other hand, cytokines are involved in β -cell lesions in human and animal models of type 1 diabetes [3]. In this context, the second question that arises is if physical activity could modulate certain circulating cytokine levels. We measured a number of cytokines that have shown to be instrumental in the development of type 1 diabetes playing pro- as well anti-inflammatory roles [3,20]. When analyzed individually, we discovered that there was great variability among individuals, in other words, each individual presented their own cytokine profile. In addition, this profile changed in the same individual in response to a variety of external and internal stressors, being diabetes one of them. Nevertheless, the analysis of the error bar representations revealed interesting tendencies (► Fig. 2, 3). At the moment of the onset of disease (Time 0), IL-4, IL-5, IL-9 and TNF- α presented a similar range of variability in individuals of group A and group S. At time 0, IL-1 β , IL-17a, IL-22 and IFN- γ levels were more varied in individuals of group A than group S. The opposite was observed with IL-2, IL-10, IL-13 and IL-12p70, which displayed wider variability in individuals of group S than group A. These patterns were maintained with more or less differences at the end of the first year for IL-1 β , IL-9, IL-17a, IL-22 and IFN- γ . However, at the end of the first year IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-13,

IL-12p70 and TNF- α levels were more varied in individuals of group A than group S. Finally at the end of the second year, IL-4, IL-13, IL-17a and IFN- γ presented the same pattern observed at the end of the first year. At the end of the second year, IL-9, IL-10 and TNF- α presented a higher range of variability in individuals of group S compared with group A. A similar range of variability at the end of the second year was observed for IL-2 and IL-22, while IL-1 β , IL-5 and IL-12p70 were not detected in either group. Basal IL-6 presented values under the detection limit of the technique in both groups during the study.

The analysis of evolution from time 0 to the first year revealed almost significant differences for specific cytokines, such as IL-4 in group A ($p < 0.08$) and IL-22 in group S ($p < 0.06$).

Discussion

▼ The presented results seem to indicate that individuals who practice regular physical activity before the onset of type 1 diabetes initiate with a better metabolic profile than sedentary individuals, presenting significantly lower levels of HbA_{1c} and higher C-peptide levels. In addition, individuals of group A present less ketoacidosis cases (2 from $n = 8$) than individuals of group S (7 from $n = 11$). We can speculate that exercise before onset helps to a better prognosis of the disease. In this context, it has been described that ketoacidosis seems to be associated

with a poor long-term metabolic regulation and residual β -cell mass [21]. In any case, additional experiments are necessary to verify this hypothesis.

The results also emphasize that the Hospital's educational program (which includes diet management and insulin injection monitoring) improved in a similar manner the management of the disease in both groups. In other words, during the 2 year period both groups presented a 4% decrease in HbA_{1c} values and doubled circulating C-peptide levels. Since active individuals began the experimental period with a better circulating profile, this influenced at long term the functionality of residual β -cells as indicated by the values obtained for the IDAA1C index. These values indicate that active patients displayed an excellent metabolic control than sedentary, and that this event could be described as an extended honeymoon phase [16].

In this context, group A presented IDAA1C scores of 9 or less at the end of the first and second year. IDAA1C was used to define the honeymoon period, a moment that strongly correlates with the existence of residual functional β -cell mass [16]. Therefore we can hypothesize that the regular practice of physical activity before and after the onset of the disease allows individuals to enter in an optimal metabolic control period, similar in many aspects to the honeymoon phase mentioned before. This phase is characterised by presenting low levels of HbA_{1c}, an indicator of correct glycaemia control, and therefore low requirements of exogenous insulin. The results of our study also emphasize that a sedentary lifestyle is not the best way to obtain certain metabolic advantages before the onset of the disease (compare groups A and S at time 0 in [Table 1](#)). In addition, diet and insulin injections are not sufficient to maintain an optimal metabolic control (i.e., individuals of group S) once the disease has been established, being the practice of regular physical activity the candidate factor to achieve both goals. Since this has been an observational study, we cannot provide data concerning frequency, intensity or type of activity that could be the most appropriate to prescribe to patients with type 1 diabetes. More studies are necessary to answer this particular point.

Since active individuals possessed better metabolic circulating parameters than the sedentary counterparts at the moment of onset, we could speculate that individuals of group A might be diagnosed later than sedentary ones. However, the average age of admission at the Endocrinology Unit was very similar in both groups. Concerning this point, it is important to mention that the active individuals of this study were practicing sports in a semi-professional level and for this reason submitted more often to routine blood and medical analysis, which was how the disease was detected. In any case, the severity of the disease seems to be a particular feature of each individual, as reflected by the large variability in values for antiGAD and the cytokines analysed. In other words, for a similar severity of the disease included in a similar environmental and genetic background, individuals with an active lifestyle would develop the disease later than sedentary ones. Unfortunately this did not occur neither in our study nor in the majority of the studies conducted at present. For this reason, this remains as a speculative point that needs very precise experimental designs for its study.

Several intervention and observational studies have analysed the impact of physical activity in diabetes control, but always once the pathology was established. In this respect, the changes in HbA_{1c}, used as a marker of glycaemia management, observed in these studies were modest or not significant [9, 10]. In addition, we cannot compare these studies with ours due to several

key differences. First, in this study active individuals were performing exercise before the onset of the disease. Second, the exercise frequency to be considered active for an individual in our protocol was at least of 5 days/week and 1 h/day [11]. Regarding insulin requirements, both points seem to be instrumental in the subsequent management of the disease for individuals of group A (lower requirements) compared with those of group S, at least in a period of 2 years.

A similar tendency in individuals of group A was observed for protein carbonyls, however the differences with group S were not significant. We can hypothesize that hyperglycaemia in type 1 diabetes favoured the development of oxidative stress [17]. In this context, an adequate glycaemic control could minimize oxidative damage. Furthermore, it is known that physical activity allows the activation of genes coding for antioxidant enzymes, leading to a better antioxidant defence [22]. Therefore, the modulation of oxidative stress in diabetic patients that perform regular exercise remains to be studied in more detail.

On the other hand, exercise is capable of modulating cytokine production. However, these changes depend on intensity, type and duration of the exercise [23,24]. In this context, several studies have shown that specific routines can increase circulating levels of anti-inflammatory cytokines that can control the muscle inflammatory damage inherent to exercise [25]. However, this does not seem to be as simple in a chronic disorder such as type 1 diabetes ([Fig. 2, 3](#)). Furthermore, the complexity to interpret the results increases if we take in account that the majority of the cytokines are produced in response to a variety of environmental stressors, explaining the inter-individual variability. Otherwise said, it seems that each patient has its own particular cytokine circulating profile. Moreover, the majority of the data concerning the role of cytokines in the development of type 1 diabetes are from animal studies, where islet tissue can be directly analysed [26]. Therefore, our results must be interpreted with extreme caution.

Nevertheless and regarding this issue, some particular observations deserve further discussion. First of all, certain cytokines considered as pro-inflammatory in type 1 diabetes development were clearly detected in individuals of group A at the moment of onset, i.e., IL-1 β , IL-17a, IFN- γ and TNF- α , and even at the end of the first year ([Fig. 2](#)). These results could suggest that exercise has some influence in controlling the inflammatory response. However, at the end of the first year, when in addition to exercise the individuals control diet and insulin administration, we have observed that anti-inflammatory cytokines such as IL-2, IL-4, IL-5, IL-10 and IL-13 are largely detectable in individuals of group A compared with group S ([Fig. 3](#)). The pattern observed was not maintained at the end of the second year ([Fig. 2, 3](#)). This could be tentatively interpreted that over time the anti-inflammatory effects attributed to exercise practice is not sufficient to stall the pro-inflammatory progression of the disease. IL-2 together with IL-21 is under the control of *Idd3*, a susceptible gene locus in diabetes development. Reduced levels of IL-2 in islets of NOD mice correlate with reduced function of Treg cells [27,28]. In this context, IL-2 helps to keep the ratio in favour of CD4⁺-Treg cells in swollen islets [29,30] and IL-4 avoids diabetes development by inducing Th2 cells in islet tissue [31]. In addition, IL-10 also plays a protective role in diabetes development [32], although some findings are discrepant [33].

On the other hand, IL-22, which is included in IL-10 family, is an interesting cytokine that deserves some attention. IL-22 upregulates the expression of *Reg* genes in islets. These genes code for

proteins such as Reg2 or Reg3 β that are involved in β -cell regeneration [34] and are abundant in mouse pancreatic buds [35]. In addition, IL-22 receptor is expressed in pancreatic β and α -cells, but not in exocrine acinar or ductal epithelium [36]. Moreover, IL-6, which is acutely secreted after exercise performance in diabetes patients and has a shorter half-life than IL-22 [37] is capable of also activating Reg proteins [38]. We can hypothesize that IL-22 is secreted when the endocrine pancreatic mass is reduced to a critical level in order to restore β -cell mass by activating Reg proteins. However, we can speculate that this objective is not reached due to the high presence of pro-inflammatory cytokines in islet tissue. Although, some anti-inflammatory cytokines are present to counteract the effect of the pro-inflammatory factors, at least during the first year, they cannot establish an optimal situation to restore β -cell mass. In any case, new experiments need to be designed in order to confirm these hypotheses. Finally, one limitation of our study concerns the low number of individuals studied. Nevertheless, the majority of the published studies present similar figures [9, 10]. In conclusion, this report suggests that adequate circulating parameters could be reached when physical activity is performed before the onset of type 1 diabetes, resulting in an optimal insulin administration in subsequent periods.

Conflict of interest: None.

Affiliations

¹ Endocrinology Service, University Hospital A Coruña (Spain)

² Applied Biology Department and Institute of Bioengineering, University Miguel Hernandez, Elche (Alicante) Spain

³ Sport Research Centre, University Miguel Hernandez, Elche (Alicante) Spain

⁴ Microbiology Department, University Hospital Complex, A Coruña (Spain)

⁵ Biotechnology Department, University of Alicante (Spain)

⁶ CIBERobn (Fisiopatología de la Obesidad y la Nutrición CB12/03/30038), Instituto de Salud Carlos III, Spain

References

- Boitard C. Pancreatic islet autoimmunity. *Presse Med* 2012; 41: e636–e650
- Notkins AL. Immunologic and genetic factors in type 1 diabetes. *J Biol Chem* 2002; 277: 43545–43548
- Rabinovitch A, Suarez-Pinzon WL. Role of cytokines in the pathogenesis of autoimmune diabetes mellitus. *Rev Endocr Metab Disord* 2003; 4: 291–299
- Nathan DM, Zinman B, Cleary PA et al. DCCT/EDIC Groups. Modern-day clinical course of type 1 diabetes mellitus after 30 years' duration: the diabetes control and complications trial/epidemiology of diabetes interventions and complications and Pittsburgh epidemiology of diabetes complications experience (1983–2005). *Arch Intern Med* 2009; 169: 1307–1316
- Gupta S. Immunotherapies in diabetes mellitus type 1. *Med Clin North Am* 2012; 96: 621–634
- Ludvigsson J. Novel therapies in the management of type 1 diabetes mellitus. *Panminerva Med* 2012; 54: 257–270
- Gallagher MP, Goland RS, Greenbaum CJ. Making progress: preserving beta cells in type 1 diabetes. *Ann N Y Acad Sci* 2011; 1243: 119–134
- Sethi G, Sung B, Kunnumakara AB et al. Treatment of Cancer and Autoimmunity. *Adv Exp Med Biol* 2009; 647: 37–51
- Nielsen PJ, Hafdahl AR, Conn VS et al. Meta-analysis of the effect of exercise interventions on fitness outcomes among adults with type 1 and type 2 diabetes. *Diabetes Res Clin Pract* 2006; 74: 111–120
- Conn VS, Hafdahl AR, Lemaster JW et al. Meta-analysis of health behavior change interventions in type 1 diabetes. *Am J Health Behav* 2008; 32: 315–329
- Kjalic JM, Clark K, Coleman E et al. American College of Sports Medicine position stand. Appropriate intervention strategies for weight loss and prevention of weight regain for adults. *Med Sci Sports Exerc* 2001; 33: 2145–2156
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER et al. Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* 1994; 233: 346–357
- International Expert Committee report on the role of the A1C assay in the diagnosis of diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32: 1327–1334
- American Diabetes Association. Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care* 2010; 33 (Suppl 1): S62–S69
- Ali MA, Dayan CM. The importance of residual endogenous beta-cell preservation in type 1 diabetes. *Br J Diab Vasc Dis* 2009; 9: 248–253
- Mortensen HB, Hougaard P, Swift P et al. Hvidoere Study Group on Childhood Diabetes. New definition for the partial remission period in children and adolescents with type 1 diabetes. *Diabetes Care* 2009; 32: 1384–1390
- Robertson RP. Chronic oxidative stress as a central mechanism for glucose toxicity in pancreatic islet beta cells in diabetes. *J Biol Chem* 2004; 279: 42351–42354
- van Belle TL, Coppieters KT, von Herrath MG. Type 1 diabetes: etiology, immunology, and therapeutic strategies. *Physiol Rev* 2011; 91: 79–118
- Ludvigsson J. Therapy with GAD in diabetes. *Diabetes Metab Res Rev* 2009; 25: 307–315
- Baumann B, Salem HH, Boehm BO. Anti-inflammatory therapy in type 1 diabetes. *Curr Diab Rep* 2012; 12: 499–509
- Fredheim S, Johansen J, Johansen A et al. Danish Society for Diabetes in Childhood and Adolescence. Diabetic ketoacidosis at the onset of type 1 diabetes is associated with future HbA1c levels. *Diabetologia* 2013; 56: 995–1003
- Niess AM, Simon P. Response and adaptation of skeletal muscle to exercise – the role of reactive oxygen species. *Front Biosci* 2007; 12: 4826–4838
- Hirose L, Nosaka K, Newton M et al. Changes in inflammatory mediators following eccentric exercise of the elbow flexors. *Exerc Immunol Rev* 2004; 10: 75–90
- Malm C. Exercise immunology: the current state of man and mouse. *Sports Med* 2004; 34: 555–566
- Toft AD, Jensen LB, Bruunsgaard H et al. Cytokine response to eccentric exercise in young and elderly humans. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002; 283: C289–C295
- Singh B, Nikoopour E, Huszarik K et al. Immunomodulation and regeneration of islet beta cells by cytokines and autoimmune type 1 diabetes. *J Interf Cytok Res* 2011; 31: 711–719
- Yamanouchi J, Rainbow D, Serra P et al. Interleukin-2 gene variation impairs regulatory T cell function and causes autoimmunity. *Nat Genet* 2007; 39: 329–337
- Sgouroudis E, Albanese A, Piccirillo CA. Impact of protective IL-2 allelic variants on CD4+Foxp3+regulatory T cell function in situ and resistance to autoimmune diabetes in NOD mice. *J Immunol* 2008; 181: 6283–6292
- Grinberg-Bleyer Y, Baeyens A, You S et al. IL-2 reverses established type 1 diabetes in NOD mice by a local effect on pancreatic regulatory T cells. *J Exp Med* 2010; 207: 1871–1878
- Tang Q, Adams JY, Penaranda C et al. Central role of defective interleukin-2 production in the triggering of islet autoimmune destruction. *Immunity* 2008; 28: 687–697
- Rapoport MJ, Jaramillo A, Zipris D et al. Interleukin 4 reverses T cell proliferative unresponsiveness and prevents the onset of diabetes in nonobese diabetic mice. *J Exp Med* 1993; 178: 87–99
- Goudy KS, Burkhardt BR, Wasserfall C et al. Systemic overexpression of IL-10 induces CD4+CD25+ cell populations in vivo and ameliorates type 1 diabetes in nonobese diabetic mice in a dose-dependent fashion. *J Immunol* 2003; 171: 2270–2278
- Hillhouse EE, Beauchamp C, Chabot-Roy G et al. Interleukin-10 limits the expansion of immunoregulatory CD4-CD8- T cells in autoimmune-prone non-obese diabetic mice. *Immunol Cell Biol* 2010; 88: 771–780
- Xiong X, Wang X, Li B et al. Pancreatic islet-specific overexpression of Reg3 β protein induced the expression of pro-islet genes and protected the mice against streptozotocin-induced diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2011; 300: E669–E680
- Vicente-Salar N, Santana A, Reig J et al. Differentiation of embryonic stem cells using pancreatic bud-conditioned medium gives rise to neuroendocrine-derived insulin-secreting cells. *Cell Reprogram* 2011; 13: 77–84
- Shiyo M, Andoh A, Kakinoki S et al. Interleukin 22 receptor 1 expression in pancreas islets. *Pancreas* 2008; 36: 197–199
- Rosa JS, Oliver SR, Mitsuhashi M et al. Altered kinetics of interleukin-6 and other inflammatory mediators during exercise in children with type 1 diabetes. *J Investig Med* 2008; 56: 701–713
- Luo C, Li B, Yin HP et al. Transcriptional activation of Reg2 and Reg3 β genes by glucocorticoids and interleukin-6 in pancreatic acinar and islet cells. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 365: 187–196