

# Modificación de los mediadores inflamatorios en isquemia-reperfusión intestinal en un modelo de diabetes tipo 2

J.C. García, J. Arias, C. García, E. Vara y J.L. Balibrea

Servicio de Cirugía General y Torácica II. Hospital Clínico Universitario San Carlos. Madrid.

## Resumen

**Introducción.** Se ha demostrado que los polimorfocitos aislados de pacientes diabéticos presentan un mayor grado de activación que los de los pacientes no diabéticos. Además, la diabetes, tanto de tipo 1 como de tipo 2, se asocia con un incremento de la peroxidación lipídica y valores elevados de moléculas de adhesión circulantes. La administración de estreptozotocina (STZ) en ratas neonatales conduce en las ratas adultas a una ligera deficiencia de insulina, con valores de glucemia normales, y son aceptadas como modelo de diabetes tipo 2.

**Objetivo.** En este estudio hemos investigado posibles diferencias en plasma y tejidos de algunos mediadores de la inflamación entre ratas normales y ratas con diabetes tipo 2, después de isquemia-reperfusión (I-R) intestinal.

**Material y métodos.** Se utilizaron ratas Wistar a las que se les administró STZ (0 o 30 mg/kg) el día de su nacimiento. Dos meses después, tanto las ratas control como las que tenían diabetes tipo 2 (normoglicémicas) fueron asignadas aleatoriamente a dos grupos. El grupo I fue sometido a un período de 60 min de isquemia intestinal por pinzamiento de la arteria mesentérica superior. Cinco minutos después de la reperfusion, las ratas fueron sacrificadas y se obtuvieron muestras de vena porta (VP), cava infrahepática (CIH), cava suprahepática (CSH), páncreas e intestino. En el grupo control los animales se manipularon de igual forma, pero sin ser sometidos a I-R. El óxido nítrico (NO) se midió como  $\text{NO}_2^- + \text{NO}_3^-$ , por la reacción de Griess. Los hidroperóxidos lipídicos (LPO) fueron determinados espectrofotométricamente usando un kit comercial. Los receptores para

factor de necrosis tumoral (TNF) de 60 kDa (TNF-R1) y 75 kDa (TNF-R2), y el ICAM-1 se determinaron por el método Elisa.

**Resultados.** Tras la I-R, las ratas diabéticas evidenciaron un aumento de las concentraciones plasmáticas de LPO, NO, ICAM-1 ( $0,514 + 0,083$  frente a  $0,046 + 0,011$  CIH;  $0,574 + 0,075$  frente a  $0,037 + 0,009$  CSH, y  $0,528 + 0,067$  frente a  $0,033 + 0,009$  VP; ng/ml; n = 10; p < 0,01), TNF ( $42,4 + 5,7$  CIH,  $248,4 + 28,2$  CSH y  $33,6 + 4,0$  VP, pg/ml, en ratas diabéticas frente a no detectable en ratas control; n = 10), TNF-R<sub>1</sub> ( $0,179 + 0,024$  frente a  $0,023 + 0,011$  CIH;  $0,233 + 0,032$  frente a  $0,033 + 0,005$  CSH;  $0,206 + 0,034$  frente a  $0,039 + 0,023$  VP; ng/ml; n = 10; p < 0,001; p < 0,05 todas) mientras que no se encontraron diferencias en los valores de TNF-R<sub>2</sub> entre ambos grupos. Tras I-R, los valores plasmáticos de TNF y NO fueron más elevados en CSH que en CIH y VP, lo que sugiere que el hígado es una importante fuente de ambos mediadores. Hemos observado que tras I-R en ratas diabéticas en el tejido intestinal se produce un aumento en los valores de TNF- $\alpha$ , interleucina (IL) 1, IL-6 (no significativo) e IL-10, mientras que en el tejido pancreático hay una disminución de TNF- $\alpha$  e IL-10 y un aumento de IL-1 e IL-6.

**Conclusión.** La diabetes tipo 2 intensifica la respuesta inflamatoria a la I-R intestinal.

**Palabras clave:** Diabetes tipo 2. Isquemia-reperfusión intestinal.

## MODIFICATION OF INFLAMMATORY MEDIATORS IN INTESTINAL ISCHEMIA-REPERFUSION IN A MODEL OF TYPE II DIABETES

**Background.** Granulocytes isolated from diabetic patients have been shown to display a greater degree of activation than those from non-diabetics. In addition, both type I and type II diabetes are associated with increased lipid peroxidation and higher levels of circulating adhesion molecules. Streptozotocin admi-

Correspondencia: Dr. J.C. García Pérez.  
Rafaela Aparicio, 10 D, 2.º A. 28050 Madrid.  
Correo electrónico: jcsurgery@eresmas.com

Aceptado para su publicación en marzo de 2002.

nistración in new-born rats leads to mild insulin deficiency with normal blood glucose levels when these rats become adult, and is accepted as a model of type II diabetes. In this study possible plasmatic and tissular differences in some inflammatory mediators after intestinal ischemia-reperusión between control and type II diabetic rats were investigated.

**Methods.** Streptozotocin (0 or 30 mg kg<sup>-1</sup>) was injected into Wistar rats on the day of birth. Two-month-old control and type II diabetic (normoglycemic) rats were randomly separated into two groups. Group I rats underwent 60-minutes of gut ischaemia by clamping the superior mesenteric artery. Five minutes after reperusión, the rats were killed and plasma samples were obtained from the portal vein (PV), infrahepatic (IHC) and suprahepatic (SHC) cava, pancreas and intestine. Group II rats underwent sham operation. Nitric oxide was measured as NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and NO<sub>3</sub><sup>-</sup> by the Griess reaction. Lipid hydroperóxidos (LPO) were determined spectrophotometrically using a commercially available kit. Tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , 75-kDa receptor (TNF-R2), 60-kDa receptor (TNF-R1) and intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 were measured by enzyme-linked immunosorbent assay.

**Results.** After ischemia-reperusión, diabetic rats showed increased plasma concentrations of LPO, nitric oxide, ICAM-1 [mean (SD): 0.514 (0.083)] versus 0.046 (0.011) ng/ml<sup>-1</sup> (IHC); 0.574 (0.075) versus 0.037 (0.009) ng/ml<sup>-1</sup> (SHC), and 0.528 (0.067) versus 0.033 (0.009) ng/ml<sup>-1</sup> (PV); n = 10, all p < 0.01], TNF [42.4 (5.7) IHC, 248.4 (28.2) SHC, and 33.6 (4.0) pg/ml<sup>-1</sup> PV, in diabetic rats versus undetectable in control rats; n = 10], TNF-R<sub>1</sub> (0.179 (0.024) versus 0.023 (0.011) IHC; 0.233 (0.032) versus 0.033 (0.005) SHC; 0.206 (0.034) versus 0.039 (0.023) PV, ng/ml<sup>-1</sup>; n = 10, all p < 0.001, p < 0.05] whereas no difference between groups was found in TNF-R<sub>2</sub>. Both TNF- $\alpha$  and nitric oxide plasma levels were higher in SHC than in IHC and PV after ischemia-reperusión, pointing to the liver as an important source of both mediators. After ischemia-reperusión, the intestinal tissue of diabetic rats showed an increase in TNF- $\alpha$ , interleukin (IL)-1, IL-6 (nonsignificant) and IL-10 levels, while in pancreatic tissue levels of TNF- $\alpha$  and IL-10 decreased and those of IL-1 and IL-6 increased.

**Conclusion.** Pre-existing type II diabetes intensifies inflammatory response after intestinal ischemia-reperusión.

**Key words:** Type II diabetes. Intestinal ischemia-reperusión.

## Introducción

Se ha postulado que en los pacientes con diabetes el estrés oxidativo está aumentado. El estrés oxidativo puede ser de origen multifactorial, está relacionado con las anomalías metabólicas y podría contribuir al desarrollo

de las complicaciones secundarias de la diabetes. Apoyando esta hipótesis, se ha encontrado que la disminución de la eficacia de las defensas antioxidantes (enzimáticas y no enzimáticas) se correlaciona con la gravedad de las manifestaciones patológicas observadas en tejidos de diabéticos<sup>44</sup>.

Además, se sabe que los polimorfonucleares (PMN) circulantes de pacientes diabéticos presentan un mayor porcentaje de activación que los de adultos sanos<sup>33,57</sup> y generan mayores cantidades de radicales libres (RLO)<sup>23</sup>, lo que sugiere una posible mayor predisposición de los pacientes diabéticos al daño tisular secundario a procesos inflamatorios. Este mayor grado de activación que se observa en los PMN durante la diabetes podría traducirse en una respuesta alterada de mediadores ante estímulos inflamatorios.

Por ello hemos investigado posibles diferencias en la producción de mediadores de la inflamación (citocinas como el factor de necrosis tumoral alfa [TNF- $\alpha$ ], interleucina [IL] 1, IL-6 e IL-10, receptores solubles para TNF- $\alpha$ , moléculas de adhesión, como ICAM-1, hidroperóxidos lipídicos [LPO], óxido nítrico [NO] y monóxido de carbono [CO]), entre ratas normales y ratas diabéticas tipo 2 después de I-R intestinal.

## Material y métodos

Hemos utilizado ratas Wistar macho, de 250-350 g de peso, alimentadas con una dieta estándar suministrada por Panlab (Barcelona, España), y agua *ad libitum*, y sometidas a un control automático de los ciclos de luz-oscuridad (12 h de luz, de 8 a 20 h, y 12 h de oscuridad), y de temperatura (22  $\pm$  2 °C). Los animales fueron tratados siguiendo las normas éticas en investigación con animales dictadas por la Unión Europea (86/609/CEE).

### Inducción de diabetes tipo 2

Para la inducción de diabetes tipo 2 se les administró STZ (0 o 30 mg/kg en búfer citrato) el día de su nacimiento, mediante punción por vía abdominal con aguja de insulina 24G. Dos meses después, las ratas macho fueron sometidas a determinaciones basales de glucosa durante 3 días consecutivos y, después de determinar la media, fueron excluidas las ratas con diabetes tipo 1 (15%). El 85% restante fue sometido a una sobrecarga oral de glucosa, mediante la administración de glucosa al 33% (Glucosmón®) a través de una sonda orogástrica (Drucafif® 14G) colocada bajo anestesia. Las ratas que presentaron una curva patológica fueron consideradas diabéticas tipo 2 (el 65% del total); el resto se desecharon por considerarlas sanas. Como controles sanos se utilizaron ratas Wistar macho, a las que se les había administrado neonatalmente una solución de búfer citrato.

### Isquemia-reperusión intestinal

Tras mantener a los animales en ayuno una noche, éstos fueron anestesiados con éter y, tanto las ratas controles sanos como las diabéticas del modelo de diabetes tipo 2 se dividieron de forma aleatoria en dos grupos:

- Grupo I: constituyó el grupo control y fue sometido a laparotomía, manejo visceral y cierre, segunda laparotomía a los 60 min, y cierre.
- Grupo II: constituyó el grupo de I-R, y fue sometido a laparotomía, evisceración del intestino delgado y del colon, ligadura de los vasos colaterales entre la arteria ileocólica y las ramas ileales-yeyunales de forma proximal y distal, según el modelo de Megison et al<sup>30</sup>; pinzamiento de la arteria mesentérica superior y cierre; segunda laparotomía a los

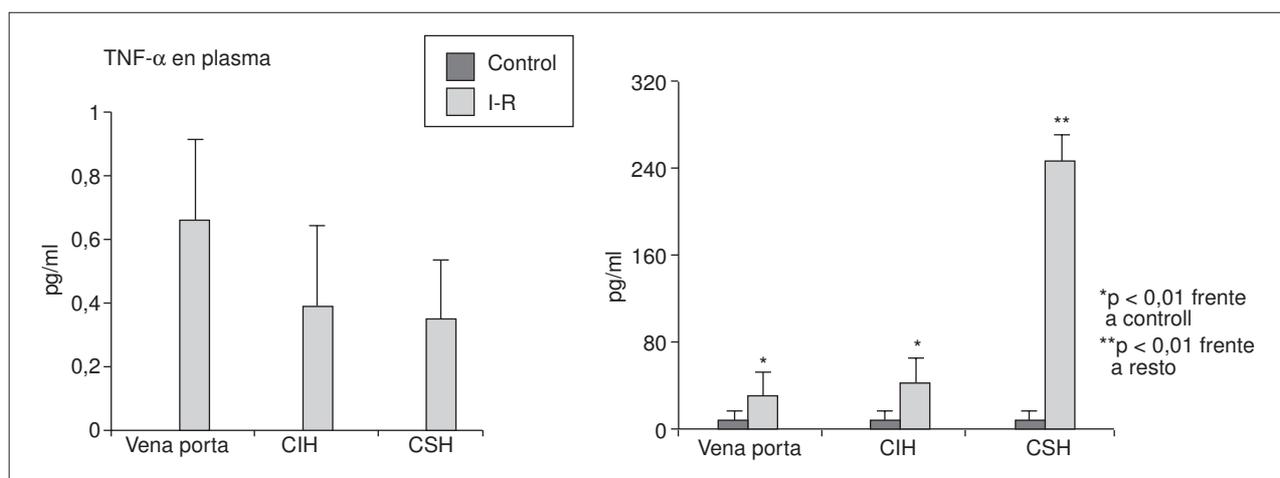


Fig. 1. Valores de factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) en plasma de vena porta, cava infrahepática (CIH) y cava suprahepática (CSH), en el grupo control y tras isquemia-reperfusión (I-R), en ratas normales (derecha) y ratas diabéticas (izquierda).

60 min, retirada del pinzamiento y, tras 5 min de reperfusion se obtuvieron muestras plasmáticas de sangre de la vena porta (VP), la vena cava infrahepática (CIH) y la vena cava suprahepática (CSH). La sangre se recogió en tubos libres de endotoxina (Nunc®) e inmediatamente fue centrifugada en frío a 2.000 × g. El plasma sobrenadante se congeló a -80 °C hasta el momento de las determinaciones. De forma simultánea, se obtuvieron muestras de yeyuno y páncreas que fueron congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido y posteriormente conservadas a -80 °C hasta el momento de las determinaciones.

### Determinaciones bioquímicas

Se determinaron valores plasmáticos y tisulares de TNF-α, IL-1, IL-6 e IL-10 mediante kits específicos de ELISA (Biosource International). Del mismo modo, también se utilizaron kits específicos de ELISA (Bender) para la determinación plasmática de receptores de TNF-α (sTNF-r 60 y sTNF-r 80) y moléculas de adhesión (ICAM-1). Los peróxidos de lípidos se cuantificaron espectrofotométricamente midiendo la formación de azul de metileno a partir de 10-N-metil-carbamoil-3,7-dimetilamino-10 H-fenotiacina (MCDP), utilizando un kit espectrofotométrico específico (Kamiya). El ON se determinó como contenido de nitrito más nitrato mediante la reacción de Griess, y el CO se cuantificó como carboxihemoglobina (COHb), añadiendo hemoglobina previamente a la muestra.

El análisis se realizó mediante la comparación de medias por métodos no paramétricos, y se utilizó el test de la U de Mann-Whitney. Se consideraron significativas y muy significativas unas confianzas iguales o superiores al 95% (p < 0,05) y el 99% (p < 0,01), respectivamente. Los resultados se expresan como media ± error estándar, siendo "n" el número de muestras de ratas diferentes empleadas en cada determinación.

### Resultados

Hemos encontrado tras I-R un aumento en los valores plasmáticos de TNF-α, IL-1, IL-6 e IL-10, tanto en ratas normales como en ratas diabéticas, con respecto a sus controles (figs. 1-4). Sin embargo, los valores plasmáticos de TNF-α fueron significativamente más elevados en las ratas diabéticas tras I-R que en las normales, al contrario de lo que sucede con los valores de IL-10 (figs. 1 y 4). Los valores de IL-6 variaron en la VP y los de IL-1 en la CIH comparando ratas normales y diabéticas tras I-R (figs. 2 y 3).

Tras I-R, las ratas diabéticas tienen una mayor concentración plasmática de rTNF60 que las ratas normales, mientras que no hemos encontrado diferencias en los valores de rTNF80 entre ambos grupos (figs. 5 y 6). Tras I-R, tanto las ratas diabéticas como las ratas normales demostraron un aumento de los valores plasmáticos de ICAM-1 con respecto a sus controles; además, estas concentraciones fueron mayores en ratas diabéticas sometidas a I-R que en las normales con I-R (fig. 7).

La I-R aumentó la concentración plasmática de LPO, NO y CO tanto en ratas diabéticas como en normales, con respecto a sus controles, aunque no hubo significación en la VP para el NO y en la CIH para los LPO (figs. 8-10). La concentración plasmática de LPO y NO en ratas diabéticas fue mayor en la CSH con respecto a sus controles, tal como sucede con los valores de TNF-α, lo que sugiere un papel importante del hígado como fuente primaria de estos mediadores (figs. 1, 8 y 9).

Las ratas diabéticas controles presentaron valores más elevados de TNF-α en el tejido pancreático que las normales (p < 0,05). Los valores basales de IL-1 e IL-6 en el tejido pancreático fueron iguales tanto en ratas normales como en diabéticas. La I-R aumentó la concentración de TNF-α, IL-1 e IL-10 en el tejido pancreático de ratas normales y de IL-1 e IL-6 en las diabéticas. La I-R disminuyó la concentración de TNF-α e IL-10 en el tejido pancreático de ratas diabéticas (tabla 1). Los valores basales de IL-1 e IL-10 en tejido intestinal fueron menores en ratas diabéticas. La I-R aumentó la concentración de TNF-α, IL-1, IL-10 e IL-6, aunque en esta última no alcanzó significación, en intestino de ratas diabéticas (tabla 2).

### Discusión

Se emplearon ratas diabéticas tipo 2 mediante la inyección neonatal de estreptozotocina. Este modelo de diabetes ha sido elegido por ser el tipo de diabetes más

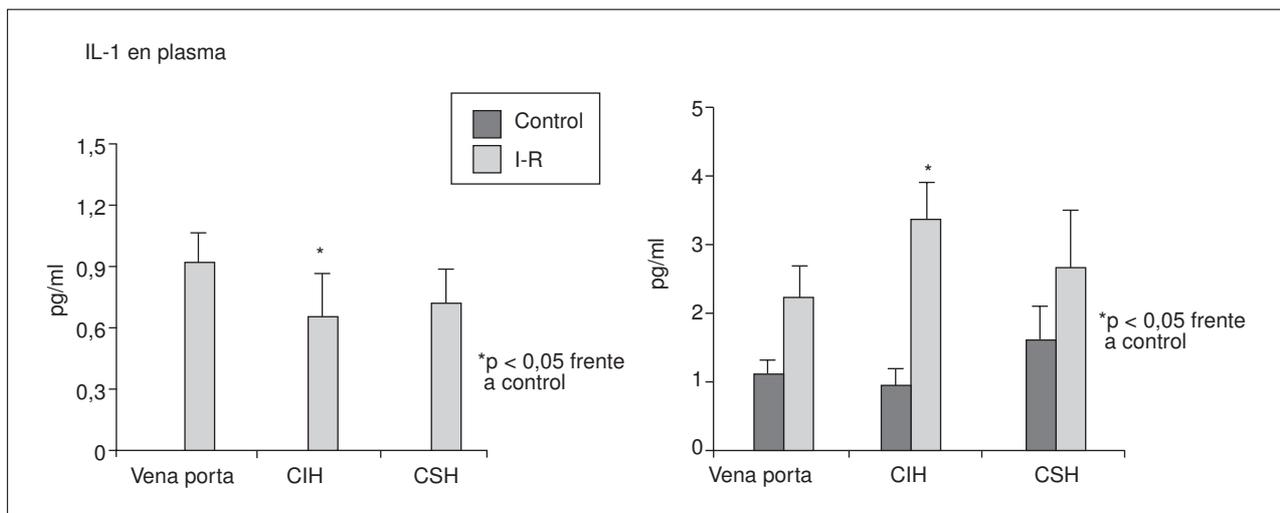


Fig. 2. Valores de interleucina (IL) 1 en plasma de vena porta, cava infrahepática (CIH) y cava suprahepática (CSH), en el grupo control y tras isquemia-reperfusión (I-R), en ratas normales (derecha) y ratas diabéticas (izquierda).

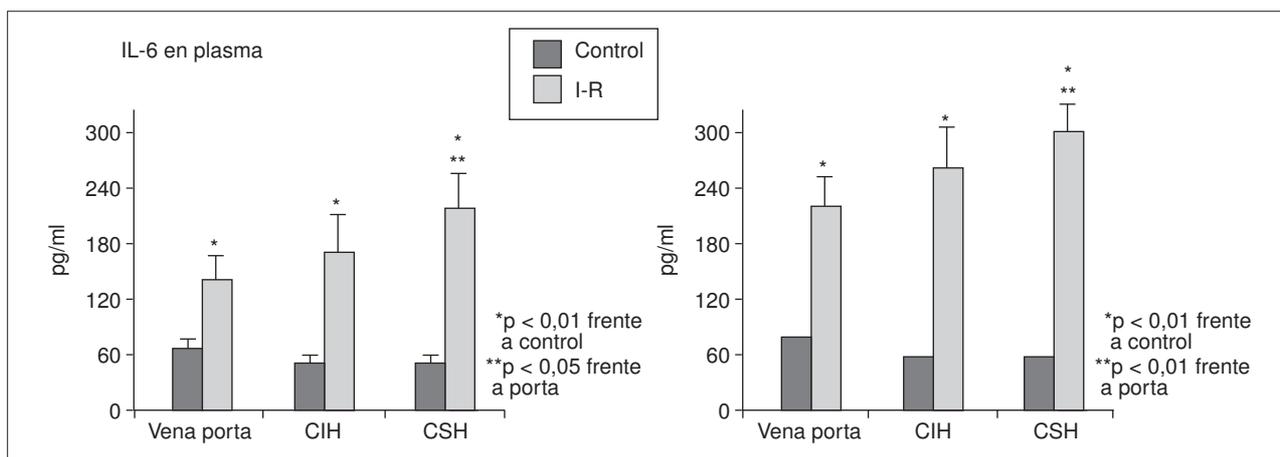


Fig. 3. Valores de interleucina (IL) 6 en plasma de vena porta, cava infrahepática (CIH) y cava suprahepática (CSH), en el grupo control y tras isquemia-reperfusión (I-R), en ratas normales (derecha) y ratas diabéticas (izquierda).

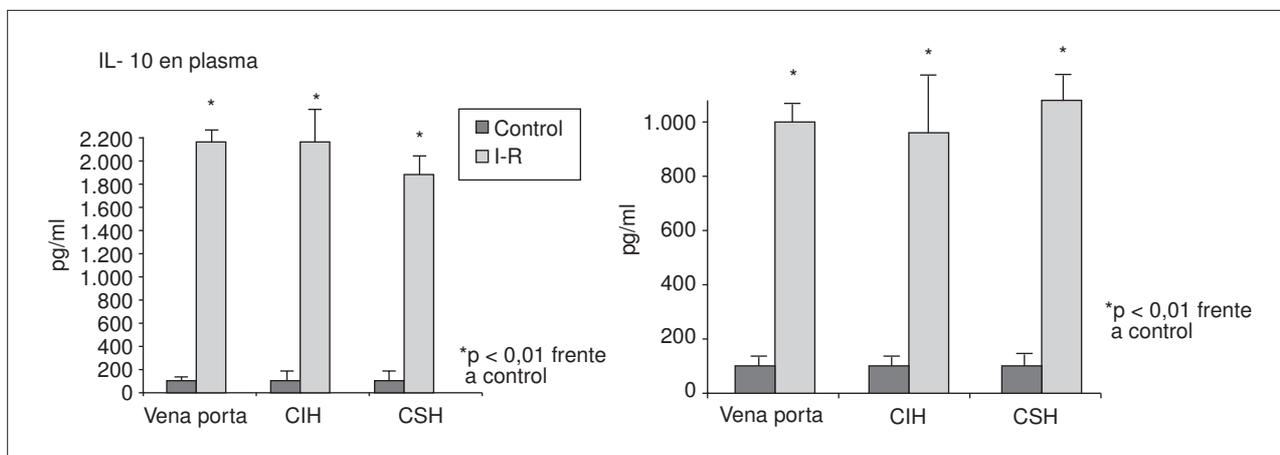


Fig. 4. Valores de interleucina (IL) 10 en plasma de vena porta, cava infrahepática (CIH) y cava suprahepática (CSH), en el grupo control y tras isquemia-reperfusión (I-R), en ratas normales (derecha) y ratas diabéticas (izquierda).

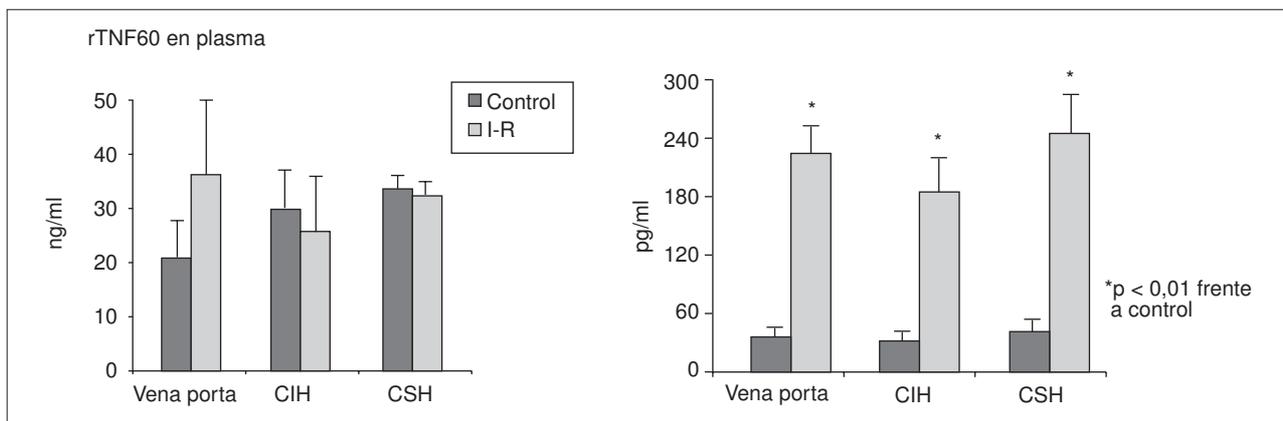


Fig. 5. Valores de rTNF60 en plasma de vena porta, cava infrahepática (CIH) y cava suprahepática (CSH), en el grupo control y tras isquemia-reperfusión (I-R), en ratas normales (derecha) y ratas diabéticas (izquierda).

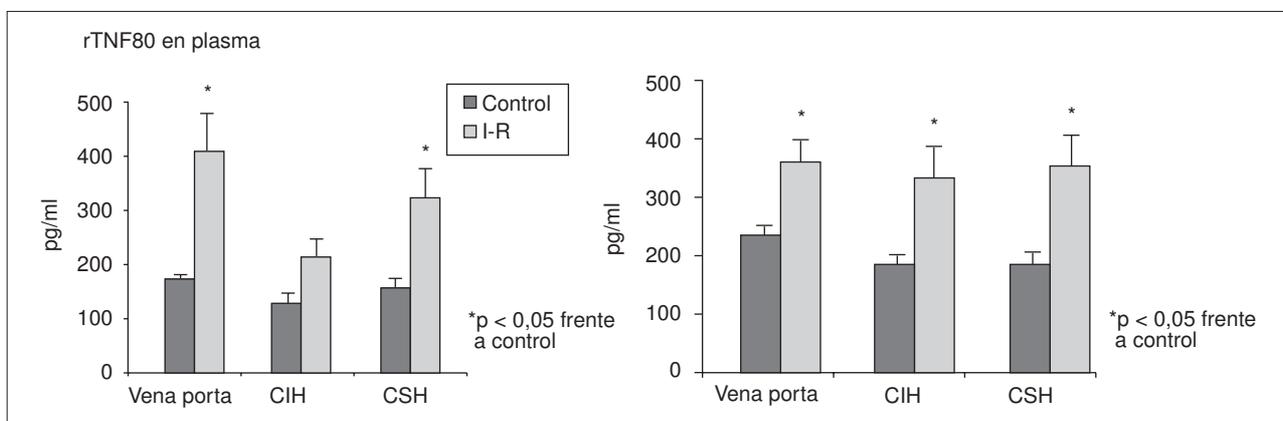


Fig. 6. Valores de rTNF80 en plasma de vena porta, cava infrahepática (CIH) y cava suprahepática (CSH), en el grupo control y tras isquemia-reperfusión (I-R), en ratas normales (derecha) y ratas diabéticas (izquierda).

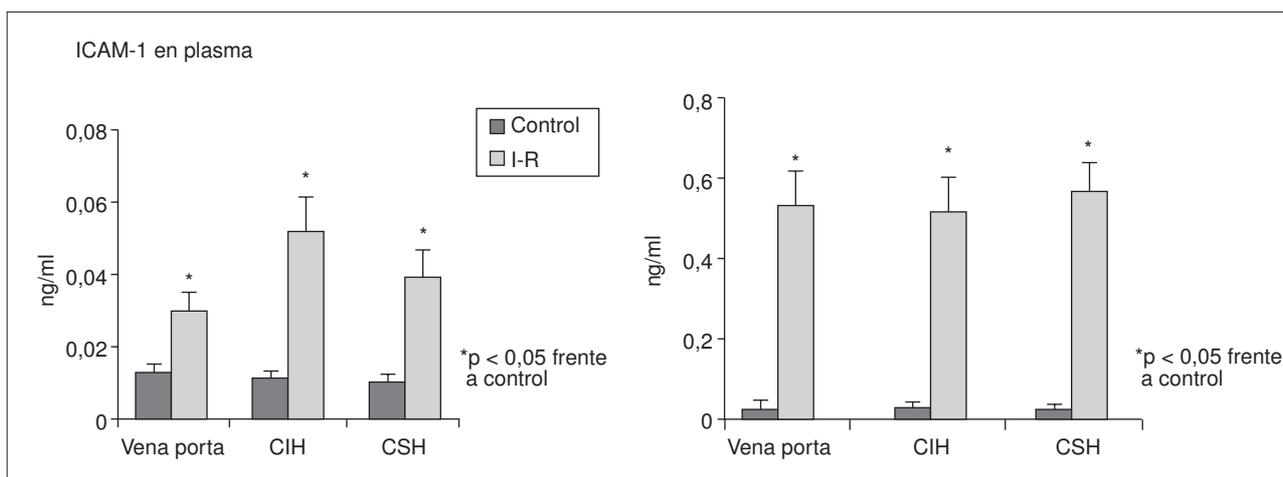


Fig. 7. Valores de ICAM-1 en plasma de vena porta, cava infrahepática (CIH) y cava suprahepática (CSH), en el grupo control y tras isquemia-reperfusión (I-R), en ratas normales (derecha) y ratas diabéticas (izquierda).

frecuente, potencialmente más importante y el menos estudiado. Además, este modelo posee la ventaja de descartar un efecto perturbador de la estreptozotocina sobre el fenómeno inflamatorio agudo, y las ratas, al ser

diabéticas desde el nacimiento, lo son durante más tiempo.

La inflamación puede inducir cambios en la concentración plasmática de los receptores solubles para

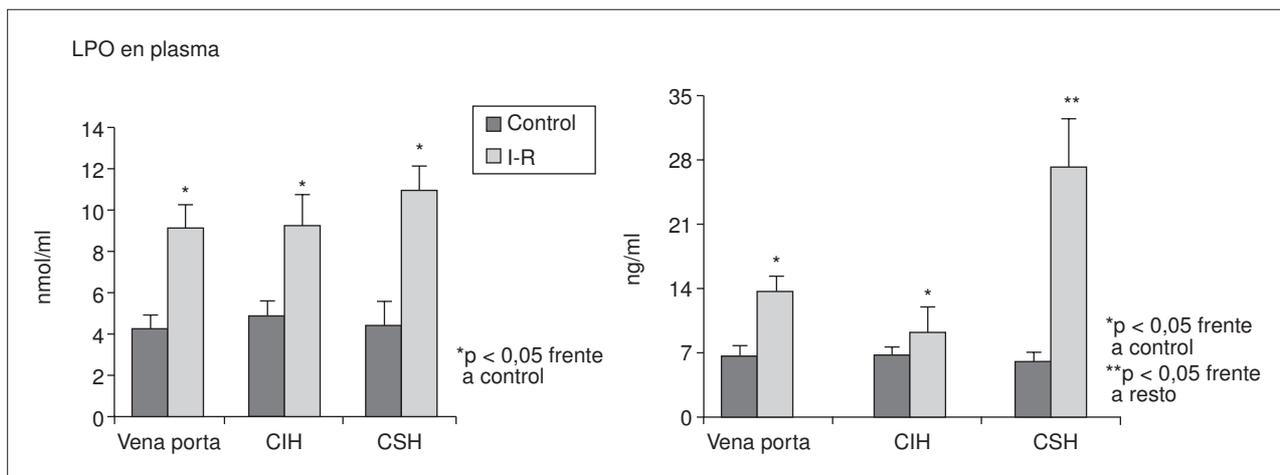


Fig. 8. Valores de LPO en plasma de vena porta, cava infrahepática (CIH) y cava suprahepática (CSH), en el grupo control y tras isquemia-reperfusión (I-R), en ratas normales (derecha) y ratas diabéticas (izquierda).

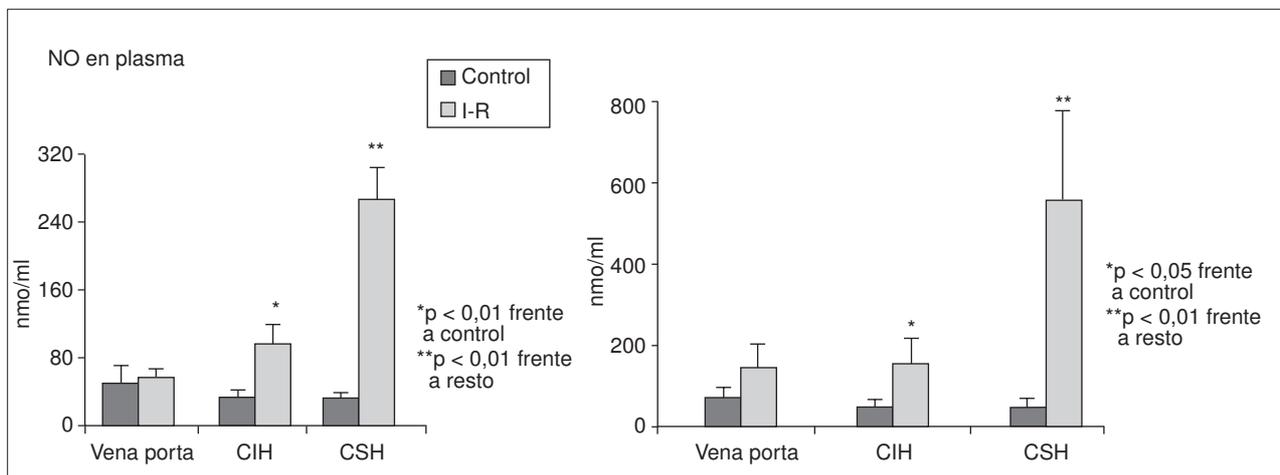


Fig. 9. Valores de NO en plasma de vena porta, cava infrahepática (CIH) y cava suprahepática (CSH), en el grupo control y tras isquemia-reperfusión (I-R), en ratas normales (derecha) y ratas diabéticas (izquierda).

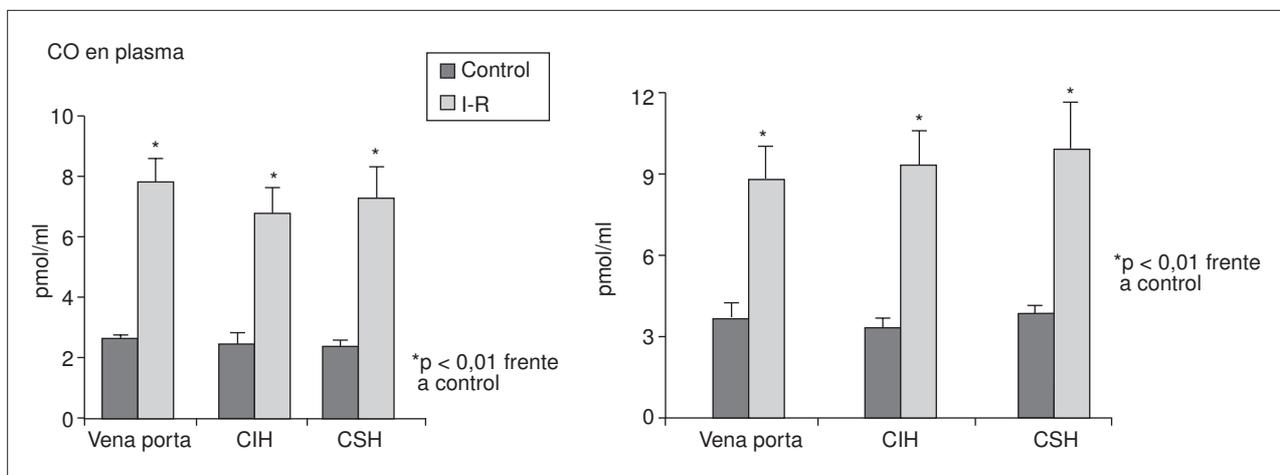


Fig. 10. Valores de CO en plasma de vena porta, cava infrahepática (CIH) y cava suprahepática (CSH), en el grupo control y tras isquemia-reperfusión (I-R), en ratas normales (derecha) y ratas diabéticas (izquierda).

TABLA 1. Valores pancreáticos de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-10

Grupo	TNF- $\alpha$ (pg/ml)	IL-1(pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml))
Control				
Normales (n = 6)	0,90 $\pm$ 0,37	1,74 $\pm$ 0,23	10,47 $\pm$ 1,55	0,91 $\pm$ 0,36
Diabéticas (n=10)	1,57 $\pm$ 0,18*	2,77 $\pm$ 0,34	12,31 $\pm$ 1,22	1,51 $\pm$ 0,19
Isquemia-reperfusión				
Normales (n = 7)	2,06 $\pm$ 0,23**	22,03 $\pm$ 2,61*	9,60 $\pm$ 0,92	1,90 $\pm$ 0,33*
Diabéticas (n = 10)	0,12 $\pm$ 0,02***	24,38 $\pm$ 1,63*	21,30 $\pm$ 1,85*	0,76 $\pm$ 0,21**

\*p < 0,05 frente a normales (1.ª columna); p < 0,01 frente al resto (2.ª columna); p < 0,01 frente al resto (3.ª columna); p < 0,05 frente a normales control (4.ª columna); \*\*p < 0,05 frente a diabéticas control; p < 0,01 frente a normales; p < 0,01 frente a normales I-R. \*\*\*p < 0,05 frente a normales; p < 0,01 frente al resto.  
TNF: factor de necrosis tumoral; IL: interleucina.

TABLA 2. Niveles en intestino de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-10

Grupo	TNF- $\alpha$ (pg/ml)	IL-1(pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	IL-10 (pg/ml))
Control				
Normales (n = 6)	0,313 $\pm$ 0,056	4,82 $\pm$ 1,04	3,51 $\pm$ 0,36	1,74 $\pm$ 0,41
Diabéticas (n=10)	0,2867 $\pm$ 0,134	1,75 $\pm$ 0,56*	3,54 $\pm$ 0,58	0,43 $\pm$ 0,04*
Isquemia-reperfusión				
Normales (n = 7)	0,655 $\pm$ 0,114*	4,52 $\pm$ 1,37	6,61 $\pm$ 0,95*	2,13 $\pm$ 0,38
Diabéticas (n = 10)	1,478 $\pm$ 0,115**	4,55 $\pm$ 1,06	4,56 $\pm$ 0,86	2,09 $\pm$ 0,22

\*p < 0,05 frente a diabéticas; p < 0,05 frente a diabéticas; p < 0,05 frente a normales; p < 0,01 frente al resto; control I-R y normales control: \*\*p < 0,01 frente al resto; p < 0,01 frente a normales I-R.

TNF- $\alpha$ . Tras I-R, las ratas diabéticas tienen una mayor concentración plasmática de sTNF-R<sub>1</sub> (60 kDa) que las ratas normales, mientras que no hay diferencias en los valores de sTNF-R<sub>2</sub> (80 kDa) entre ambos grupos. Algunos estudios en animales resaltan el papel primordial del TNF- $\alpha$  en la resistencia a la insulina asociada a la obesidad, y además implican como receptor dominante del TNF- $\alpha$  al TNF-R<sub>1</sub><sup>36,53,19</sup>. Luego, si este receptor es el más importante cuando hablamos de resistencia a la insulina (diabetes tipo 2), no es de extrañar que nosotros hayamos encontrado un aumento en la concentración plasmática de sTNF-R<sub>1</sub> en las ratas diabéticas sometidas a I-R, con respecto a las ratas normales, ya que la concentración plasmática de TNF $\alpha$  aumenta en esta situación. Sin embargo, en otros estudios se asegura que los receptores de TNF no desempeñan un papel en la resistencia a la insulina asociada a la obesidad<sup>43</sup>. De hecho, sus datos sugieren que los dos receptores trabajan conjuntamente para proteger contra la diabetes, y no hay diferencias entre ambos.

En el presente estudio hallamos una elevación de los valores plasmáticos de citocinas en ratas diabéticas. Estudios previos ya habían encontrado un aumento en la concentración plasmática de TNF- $\alpha$  e interleucinas en pacientes con diabetes tipo 2<sup>2,49,31,21</sup>. Sin embargo, otros trabajos no encuentran diferencias significativas en los valores plasmáticos de TNF- $\alpha$ , IL1 e IL6 en pacientes con diabetes tipo 1 respecto a sujetos normales<sup>8</sup>, lo que sugiere que podría haber diferencias entre la diabetes tipo 1 y tipo 2.

Cuando analizamos los resultados en ratas normales tras I-R, encontramos un aumento en los valores plasmáticos de TNF- $\alpha$ , IL1, IL-6 e IL-10. Sin embargo, Simpson et al<sup>50</sup>, en un modelo similar al nuestro de I-R pero sin diabetes asociada, no encuentran una elevación de cito-

cinas. Otros investigadores, en estudios en humanos, tampoco han podido detectar TNF- $\alpha$  en el suero después de cirugía electiva, donde se supone que hay múltiples procesos de I-R, pero sí encontraron una elevación temprana de IL-1 después de este tipo de intervenciones<sup>3</sup>. Además, diversos autores sostienen que los valores plasmáticos de IL-1 e IL-6 están elevados después de operaciones de cirugía abdominal mayor, y se incrementa la extensión de la respuesta con la magnitud del traumatismo operatorio<sup>4</sup>.

Los resultados en ratas diabéticas tras I-R, demuestran también un aumento en los valores plasmáticos de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e IL-10. Esto es compatible con hallazgos en humanos que encuentran una mayor producción de TNF- $\alpha$  por los monocitos de pacientes con diabetes tipo 2, estimulados por LPS<sup>55</sup>. La IL-10 es una interleucina antiinflamatoria, y en nuestros resultados su concentración plasmática tras I-R es mayor en ratas normales que en ratas diabéticas, al contrario de lo que cabría esperar. Algunos autores<sup>39</sup> observan valores plasmáticos tempranos disminuidos de IL-4 e IL-10 cuando, en lugar de usar directamente isquemia, utilizan los mediadores derivados de la misma para estimular en sangre periférica a las células del sistema fagocítico mononuclear de pacientes con diabetes tipo 1.

En ratas diabéticas tras I-R aparecen unos valores elevados de TNF- $\alpha$  en la CSH cuando los comparamos con los valores en la CIH y la VP; lo mismo sucede con las concentraciones de NO y LPO. Por otra parte, los valores plasmáticos de TNF- $\alpha$  en ratas normales tras I-R fueron mayores en la VP, en comparación con CSH y CIH. Aunque en la mayoría de los trabajos realizados, incluido el nuestro, no se ha hecho un estudio cinético de liberación de citocinas, estos hallazgos hacen pensar que, mientras el intestino podría ser una fuente primaria en la producción de TNF- $\alpha$  en ratas normales, el

hígado podría ser una fuente primaria en las ratas diabéticas. Los valores plasmáticos de TNF- $\alpha$  e IL-1 en la CIH tras I-R fueron mayores en ratas diabéticas que en las normales, lo que apoya la hipótesis de que la diabetes tipo 2 exacerba la respuesta inflamatoria tras I-R, aunque no se han encontrado estas diferencias para los valores de IL-6, salvo en la porta, probablemente debido a un aumento en la producción de IL-6 por el tejido pancreático. Numerosos tejidos del organismo, incluyendo el intestino y el páncreas, son capaces de producir citocinas ante diversos estímulos inflamatorios. Asimismo, se ha descrito que las citocinas tendrían una acción predominantemente local, de modo que su efecto máximo se llevaría a cabo en las células y tejidos próximos a su lugar de producción<sup>12</sup>, con lo que el aumento de sus valores plasmáticos sería un indicio de producción masiva.

Tras I-R en ratas diabéticas en el tejido intestinal se produce un aumento en los valores de TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 (no significativo) e IL-10, mientras que en el tejido pancreático hay una disminución de TNF- $\alpha$  e IL-10 y un aumento de IL-1 e IL-6. Como la IL-1, IL-6 y el TNF- $\alpha$  están producidos fundamentalmente por macrófagos, deberíamos encontrar un aumento de su concentración en el páncreas. Incluso existe evidencia de que también las células de los islotes pancreáticos producen citocinas y NO<sup>56</sup>. Se ha encontrado producción de TNF- $\alpha$  por células  $\beta$  pancreáticas en respuesta a IL-1<sup>60</sup> e IL-6<sup>7</sup>. La disminución de los valores de TNF- $\alpha$  e IL-10 que hemos observado en el páncreas podría ser debido a una disminución en la síntesis o a un aumento en su liberación al plasma.

El endotelio de las pequeñas venas de áreas pancreáticas inflamadas expresa moléculas de adhesión vascular que permitirán la extravasación de leucocitos y macrófagos hacia el tejido pancreático. Esta expresión podría ocurrir tras I-R, posiblemente por acción del TNF- $\alpha$ <sup>57</sup>. Panés et al<sup>33</sup>, en un modelo similar al nuestro de ratas diabéticas con I-R, han logrado relacionar el papel de las moléculas de adhesión con la modulación del rodamiento leucocitario. Sin embargo, otros autores no lo han conseguido<sup>62,29</sup>.

Tras I-R se produce un aumento significativo en la concentración plasmática de ICAM-1 en ratas normales y diabéticas, en la porta y ambas cavas. Otros estudios en animales también han demostrado unos valores circulantes elevados de ICAM-1 durante la inflamación que sigue al daño tisular tras I-R<sup>41</sup>. Utilizando animales diabéticos se ha observado que una posible causa del estímulo endotelial podrían ser los radicales libres de oxígeno (RLO), cuyo incremento en su producción podría dar lugar a un aumento en la expresión de ICAM-1<sup>26</sup>. Dicho aumento del estrés oxidativo podría contribuir al daño endotelial en la diabetes.

Otra posible causa de disfunción endotelial es el aumento en la glucosilación no enzimática de proteínas debido a la hiperglucemia crónica. Esto viene apoyado por trabajos en células endoteliales de vena umbilical humana cultivados en medios con una alta concentración de glucosa, que sí apoyan esta hipótesis<sup>5</sup>. Sin embargo, no está tan claro que la hiperglucemia *per se* pueda contribuir al daño de la función endotelial en la

diabetes<sup>42</sup>, ya que los resultados obtenidos por Panés et al en ratas diabéticas no apoyan esta hipótesis y no hay que olvidar que nuestras ratas no tienen hiperglucemia basal, aunque hay otros mecanismos a través de los cuales la hiperglucemia sostenida podría causar disfunción endotelial, que también son objeto de controversia e incluyen diferentes vías metabólicas y bioquímicas, como la vía del sorbitol, las alteraciones selectivas de la sintasa de NO y el déficit relativo de L-arginina<sup>54,37</sup>.

Dado que no está claro el posible beneficio del bloqueo de ICAM-1 en una situación de I-R, mucho menos podríamos aventurar las implicaciones que tiene para la rata diabética el aumento de ICAM-1. En cualquier caso, de tener algún efecto, éste sería probablemente perjudicial, al favorecer la adhesión/rodamiento de un mayor número de leucocitos y la consiguiente amplificación de la respuesta inflamatoria.

Durante la I-R hay un aumento de la concentración plasmática de LPO tanto en ratas normales como en diabéticas, en la porta y ambas cavas. Aunque existen diferentes técnicas para la cuantificación de la peroxidación lipídica (determinación de malondialdehído, conjugados dienos, etc.), ninguna es tan precisa como la determinación de los propios LPO<sup>18,52</sup>, que es la que nosotros hemos utilizado.

La I-R conduce a un aumento de RLO, y por tanto a un aumento en los valores plasmáticos de LPO, como así lo han puesto de manifiesto en trabajos con animales<sup>11,47,35</sup>. Por otra parte, Nilsson et al<sup>32</sup> no pudieron detectar la presencia de LPO tras 2 h de isquemia y 30 min de reperusión, aunque sí demostraron que había daño intestinal.

La diabetes puede ser producida en animales mediante la administración de tóxicos (aloxano y estreptozotocina), y aunque el mecanismo de acción de estos dos fármacos es diferente, el resultado final parece ser la producción de RLO en ambos casos según Oberley. Esto explicaría el aumento de RLO encontrado en ratas diabéticas mediante la administración de estreptozotocina. En la bibliografía hay trabajos que apoyan el aumento del estrés oxidativo en pacientes diabéticos al encontrar un aumento en los niveles de LPO en plasma en pacientes con diabetes tipo 2<sup>2,45,22</sup>.

Existen diversas fuentes potenciales para explicar el aumento de RLO. Por un lado, está bien establecido que los polimorfonucleares (PMN) activados son una fuente importante de los mismos en situaciones de inflamación inespecífica<sup>17</sup>. Existe amplia evidencia de que la acumulación de PMN desempeña un papel central en la fisiopatología de la I-R. Dicha evidencia se apoya en estudios que demuestran que: a) los neutrófilos son activados y se acumulan en los tejidos afectados; b) la reducción en el número de neutrófilos circulantes se acompaña de una disfunción celular microvascular y parenquimal, y c) la extensión del tejido dañado y la disfunción del órgano se reducen por agentes que previenen la activación o acumulación de neutrófilos<sup>25</sup>. La función y algunas propiedades mecánicas de los granulocitos están alteradas en la diabetes. Los granulocitos aislados de animales y humanos diabéticos son menos deformables<sup>23</sup> y generan una mayor cantidad de RLO<sup>13</sup> que los

granulocitos de no diabéticos. Además, un gran porcentaje de neutrófilos circulantes están activados en humanos diabéticos en comparación con la población no diabética<sup>58</sup>. Estas observaciones sugieren que la diabetes podría predisponer al daño tisular en situaciones de inflamación<sup>27</sup>.

Por otro lado, es ya clásica la importancia del sistema de la xantinoxidasa como fuente de RLO en situaciones de I-R. Dicho sistema es especialmente abundante en células endoteliales y, además de por la isquemia, podría ser activado por la diabetes a través de mediadores inflamatorios como las citocinas<sup>14</sup>. Además, éstas *per se* son capaces de desacoplar la fosforilación oxidativa en algunos tipos celulares, estimulando la producción de RLO, lo que podría constituir su principal mecanismo de toxicidad en dichas células<sup>48</sup>. También se ha observado una disminución de los sistemas barredores de estos RLO en tejidos diabéticos, incluyendo la pared vascular<sup>15</sup>.

La I-R produce también un aumento en la concentración plasmática de NO en ratas normales y diabéticas, en la porta y ambas cavas. Estos resultados concuerdan con los encontrados por otros autores, tanto en animales<sup>20,61</sup> como en humanos<sup>10,6</sup>.

Aunque las ratas diabéticas tienen una mayor tendencia a la inflamación, no hemos encontrado diferencias en la producción basal de NO con respecto a las ratas normales, y esto podría estar motivado por una menor producción de NO en las diabéticas, aunque también podría influir el aumento en la producción de RLO que hemos observado en ratas diabéticas estudiadas por nosotros, que actuarían como *scavenger* del NO. Con respecto a la disminución en la producción basal hay estudios en ratas diabéticas mediante la administración de estreptozotocina, que han demostrado que durante la isquemia los valores plasmáticos de NO aumentan en las ratas no diabéticas, mientras que permanecen sin cambios en las diabéticas<sup>16</sup>. Este incremento en ratas no diabéticas, se ha sugerido que puede ser un mecanismo compensador contra la isquemia, que estaría ausente en las diabéticas, explicando su mayor vulnerabilidad a la isquemia<sup>9</sup>. Por otra parte, la reducción de la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa constitutiva en plaquetas de pacientes diabéticos sugiere un deterioro en la bioactividad y producción basal del NO en la diabetes<sup>46</sup>.

Aunque un gran aumento en la producción de NO, dependiente de la actuación de la NO sintasa inducible, podría resultar lesivo<sup>28</sup>, el hecho de que los diabéticos tengan unos valores basales disminuidos<sup>24</sup>, podría resultar perjudicial en los estadios tempranos del fenómeno. Esta disminución en la biodisponibilidad del NO podría hacer más propenso al endotelio vascular a los efectos deletéreos de la I-R<sup>16</sup>. Con respecto al aumento en la producción de RLO, existen diferentes trabajos que sugieren que los aniones superóxido tienen un papel relevante en la disminución de la relajación dependiente del endotelio observado en la diabetes. Algunos autores creen que la oxihemoglobina glucosilada (producto de Amadori), obtenida por la glucosilación no enzimática de proteínas como consecuencia de la hiperglucemia crónica podría generar aniones superóxido. Estos aniones superóxido

destruyen el NO liberado por el endotelio e impiden que éste actúe en el músculo liso vascular subyacente<sup>15</sup>. En consonancia con este mecanismo, la enzima superóxido dismutasa, un *scavenger* o barredor de aniones superóxido, es capaz de revertir de forma sustancial la disfunción endotelial<sup>40</sup>, y además sería capaz de anular la inactivación del NO exógeno por la oxihemoglobina glucosilada<sup>1</sup>.

Tras I-R también se produce un aumento en la concentración plasmática de CO en ratas normales y diabéticas, y este aumento fue mayor en ratas diabéticas que en normales en ambas cavas. Algunos estudios en animales diabéticos mediante aloxano han observado un aumento en los valores plasmáticos y expirados de CO<sup>51</sup>. Estos hallazgos son también compatibles con los resultados obtenidos por Ragnar et al<sup>38</sup>, que observan que los valores elevados de glucosa estimulan la hemooxigenasa de los islotes de Langerhans y, por tanto, la producción de CO.

Las fuentes endógenas de CO serían, por un lado, el metabolismo del grupo hemo y, por otro, la peroxidación lipídica<sup>59</sup>. No sabemos cuál es la vía predominante en el aumento del CO plasmático en ratas diabéticas tras I-R. Considerando que hay un aumento en la producción de RLO en las ratas diabéticas, pensamos que la vía predominante es la peroxidación lipídica, de hecho, hay trabajos que demuestran que los niveles aumentados de CO exhalado en pacientes con diabetes tipo 1 y tipo 2, se correlacionan positivamente con el estrés oxidativo<sup>34</sup>. Sin embargo, no podemos descartar un aumento en su producción por la vía de la hemooxigenasa, que se encontraría estimulada por un aumento de la glucemia<sup>38</sup>, y por el propio estímulo inflamatorio.

Resumiendo, se sabe que hay una mayor predisposición de los pacientes diabéticos al daño tisular secundario a I-R.

Esto puede ser debido a:

1. Un aumento en el *estrés oxidativo*. El estrés oxidativo puede ser de origen multifactorial, está relacionado con las anomalías metabólicas y podría contribuir al desarrollo de las complicaciones secundarias de la diabetes.

2. Una disminución en la *producción basal del NO*. Esta disminución puede estar causada por un deterioro en la enzima óxido nítrico sintasa constitutiva, o bien, por un aumento de RLO que actuarían como *scavenger* del NO. A su vez, las principales fuentes que originan un aumento de RLO, serían: neutrófilos activados, sistema de la xantinoxidasa y disminución de los sistemas barredores de estos RLO en tejidos diabéticos.

Tanto el aumento del estrés oxidativo como la disminución basal del NO conducen a incrementar el daño celular producido por la isquemia, y por tanto, aumentan la inflamación.

## Bibliografía

- 1 Angulo J, Sánchez-Ferrer CF, Peiro C, Marín J, Rodríguez-Mañas L. Impairment of endothelium-dependent relaxation by increasing percentages of glycosylated human hemoglobin. Possible mechanisms involved. *Hypertension* 1996;28:583-92.

2. Anne-Cécile D, Serri O, Genevieve R. Normalization of plasma lipid peroxides, monocyte adhesion, and tumor necrosis factor- $\alpha$  production in NIDDM patients after gliclazide treatment. *Diabetes Care* 1998;21:487-93.
3. Baigrie RJ, Lamont PM, Dallman M, Morris PJ. The release of interleukin-1 $\beta$  (IL-1) precedes that of interleukin 6 (IL-6) in patients undergoing major surgery. *Lymphokine Res* 1991;10:253-6.
4. Baigrie RJ, Lamont PM, Kwiatkoeski D, Dallman MJ, Morris PJ. Systemic cytokine response after major surgery. *Br J Surg* 1992;79:757-60.
5. Baumgartner SM, Wagner L, Pettermann M, Gessl A, Waldhausl W. Modulation by high glucose of adhesion molecule expression in cultured endothelial cells. *Diabetologia* 1995;38:1367-70.
6. Billiar TR, Curran RD, Stuehr DJ, West MA, Bentz BG. An L-arginine-dependent mechanism mediates Kupffer cell inhibition of hepatocyte protein synthesis in vitro. *J Exp Med* 1989;169:1467-72.
7. Campbell IL, Cutri A, Wilson A, Harrison LC. Evidence for IL-6 production by and effects on the pancreatic beta cell. *J Immunol* 1989;143:1188-91.
8. Cavallo MG, Pozzilli P, Bird C, Wadwa M, Meager A, Visalli N, et al. Cytokines in sera from insulin-dependent diabetic patients at diagnosis. *Clin Exp Immunol* 1991;86:256-9.
9. Conjer J, Robinette J, Villar A, Raji L, Shultz P. Increased nitric oxide synthase activity despite lack of response to endothelium-dependent vasodilators in postischemic acute renal failure in rats. *J Clin Invest* 1995;96:631-8.
10. Curran RD, Billiar TR, Stuehr DJ, Hofmann K, Simmons RL. Hepatocytes produce nitric oxide from L-arginine in response to inflammatory products of Kupffer cells. *J Exp Med* 1989;170:1769-74.
11. Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen and reactive intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol* 1988;141:2407-12.
12. Fong Y, Moldawen LL, Shires T, Lowry SF. The biologic characteristics of cytokines and their implication in surgical surgery injury. *Surg Gynecol Obstet* 1990;170:363-78.
13. Freedman SF, Hatchell DL. Enhanced superoxide radical production by stimulated polymorphonuclear leukocytes in a cat model of diabetes. *Exp Eye Res* 1992;55:767-73.
14. Friedl HP, Till GO, Ryan US. Mediator-induced activation of xanthine-oxidase in endothelial cells. *FASEB J* 1989;3:25112-8.
15. Giugliano D, Ceriello A, Paolisso G. Oxidative stress and diabetic vascular complications. *Diabetes Care* 1996;19:257-67.
16. Goor Y, Peer G, Iaina A, Blum M, Wollman Y, Chernihovsky T, et al. Nitric oxide in ischemia acute renal failure of streptozotocin diabetic rats. *Diabetologia* 1996;39:1036-40.
17. Grisham MB, Hernández LA, Granger DN. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *Am J Physiol* 1986;251:G567-74.
18. Holley AE, Chessemann KH. Measuring free radical reactions in vivo. *Br Med Bull* 1993;49:494-505.
19. Hotamisligil GS. The role of TNF $\alpha$  and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J Int Med* 1999;245:621-5.
20. Huk I, Nanobash J, Neumayer CH, Partyka L, Malinski T. Bioflavonoid quercetin scavenges superoxide and increases nitric oxide concentration in ischaemia-reperfusion injury: an experimental study. *Br J Surgery* 1998;85:1080-5.
21. Hussain MJ, Peakman M, Gallati H, Lo SSS, Hawa M, Viberti GC, et al. Elevated serum levels of macrophage-derived cytokines precede and accompany the onset of IDDM. *Diabetologia* 1996;39:60-9.
22. Jennings PE, Scott NA, Saniabadi AR, Belch JJJ. Effects of gliclazide on platelet reactivity and free radicals in type II diabetic patients. Clinical assessment. *Metabolism* 1992;41:36-9.
23. Kelly LW, Barden CA, Tiedeman JS, Hatchell DDL. Alterations in viscosity and filterability of whole blood and blood cell subpopulation in diabetic cats. *Exp Eye Res* 1993;56:341-7.
24. Kobayashi H, Nonami T, Kurokawa T, Takeuchi Y, Harada A, Nakao A, et al. Role of endogenous nitric oxide in ischemia-reperfusion injury in rat liver. *J Surg Res* 1995;59:772-9.
25. Korthuis RJ, Smith JK, Carden DL. Hypoxic reperfusion attenuates postischemic microvascular injury. *Am J Physiol* 1989;256:H315-21.
26. Lo SK, Janakidevi K, Malik AB. Hydrogen peroxide-induced increase in endothelial adhesiveness is dependent on ICAM-1 activation. *Am J Physiol* 1993;264:L406-12.
27. Marzi I, Zhong Z, Zimmermann FA, Lemaster JJ, Thurman RG. Xanthine and hypoxanthine accumulation during storage injury may contribute to reperfusion injury following liver transplantation in the rat. *Transplant Proc* 1989;21:1319-20.
28. Matheis G, Sherman MP, Buckberg GD, Hybron DM, Young HH, Ignarro LJ. Role of L-arginine nitric oxide pathway in myocardial reoxygenation injury. *Am J Physiol* 1992;262:H616-20.
29. McEver RP. GMP-140: a receptor for neutrophils and monocytes on activated platelets and endothelium. *J Cell Biochem* 1991;45:156-61.
30. Megison SM, Horton JW, Chao H, Walker P. A new model for intestinal ischemia in the rat. *J Surg Res* 1990;49:168-73.
31. Nguyen P, Durlach V, Leutenegger M, Guenounou M, Potron G. Explosion respiratoire des polynucléaires neutrophiles et profil des cytokines chez le diabétique non insulinodépendant. *J Mal Vasc* 1995;20:102-5.
32. Nilsson UA, Lundgren O, Haglind E, et al. ESR-measurement of radical production during in vivo intestinal ischemia and reperfusion in the cat. *Am J Physiol* 1989;257:G409-14.
33. Panés J, Kurose I, Rodríguez-Vaca MD, Anderson C, Miyasaka M, Tso P, et al. Diabetes exacerbates inflammatory responses to ischemia-reperfusion. *Circulation* 1996;93:161-7.
34. Paredi P, Biernacki W, Invernizzi G, Kharitonov SA, Barnes PJ. Exhaled carbon monoxide levels elevated in diabetes and correlated with glucose concentration in blood: a new test for monitoring the disease? *Chest* 1999;116:1007-11.
35. Parks DA, Granger DN. Contributions of ischemia and reperfusion to mucosal lesion formation. *Am J Physiol* 1986;250:G749-53.
36. Peraldi P, Hotamisligil GS, Buurman WA, White MF, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor (TNF $\alpha$ ) inhibits insulin signaling through stimulation of the p55 TNF receptor and activation of sphingomyelinase. *J Biol Chem* 1996;271:13018-22.
37. Pieper GM. Review of alterations in endothelial nitric oxide production in diabetes. Protective role of arginine on endothelial dysfunction. *Hypertension* 1998;31:1047-60.
38. Ragnar H, Alm P, Ekström P, Lundquist I. Hemo oxygenase and carbon monoxide: Regulatory roles in islet hormone release. *Diabetes* 1999;48:66-76.
39. Rapoport MJ, Mor A, Vardi P, Ramot Y, Winker R, Hindi A, et al. Decreased secretion of Th2 cytokines precedes up-regulated and delayed secretion of Th1 cytokines in activated peripheral blood mononuclear cells from patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Autoimmun* 1998;11:635-42.
40. Rodríguez-Mañas L, Angulo J, Peiro C, Llergo JL, Sánchez-Ferrer A, López-Doriga P, et al. Endothelial dysfunction and metabolic control in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Pharmacol* 1998;123:1495-502.
41. Rothlein R, Mainolgi EA, Czajkowski M, Marlin SD. A form of circulating ICAM-1 in human serum. *J Immunol* 1991;147:3788-93.
42. Ruderman NB, Williamson JR, Brownlee M. Glucose and diabetic vascular disease. *FASEB J* 1992;6:2905-14.
43. Sandra A, Streamson C, Renée C. Obesity and diabetes in TNF $\alpha$  receptor-deficient mice. *J Clin Invest* 1998;102:402-11.
44. Santini SA, Marra G, Giardino B, Cotroneo P, Mordente A, Martorana GE, et al. Defective plasma antioxidant defenses and enhanced susceptibility to lipid peroxidation in uncomplicated IDDM. *Diabetes* 1997;46:1853-8.
45. Sato Y, Hotta N, Sakamoto N, Matsuoka S, Ohishi N, Yagi K. Lipid peroxide level in plasma of diabetic patients. *Biochem Med* 1979;21:104-7.
46. Schaeffer G, Wascher TC, Kostner GM, Graier WF. Alterations in platelet Ca<sup>2+</sup> signalling in diabetic patients is due to increased formation of superoxide anions and reduced nitric oxide production. *Diabetologia* 1999;42:167-76.
47. Schoenberg MH, Fredholm BB, Haglund U, Jung H, Sellin D, Younes M, et al. Studies on the oxygen radical mechanism involved in the small intestinal reperfusion damage. *Acta Physiol Scand* 1985;124:581-9.
48. Schulze-Osthoff K, Bakker AC, Vanhaesebroeck B, Beyaert R, Jacob WA, Fiers W. Cytotoxicity activity of tumor necrosis factor is mediated by early damage of mitochondrial functions. Evidence for the involvement of mitochondrial radical generation. *J Biol Chem* 1992;267:5317-23.
49. Sekizuka K, Tomino Y, Sei C, Kurusu A, Tashiro K, Yamaguchi Y, et al. Detection of serum IL-6 in patients with diabetic nephropathy. *Nephron* 1994;68:284-5.
50. Simpson R, Alon R, Kobzik L, Valeri R, Shepro D, Hechtman HB. Neutrophil and non-neutrophil-mediated injury in intestinal ischemia-reperfusion. *Ann Surg* 1993;218:444-54.

51. Takano T, Honma K, Maeda H. Endogenous carbon monoxide production in alloxanized rats. *Bull Tokyo Med Dent Univ* 1977;24:1.
52. Tatsishi T, Yoshimine N, Kuzuya F. Serum lipid peroxide assayed by a new colorimetric method. *Exp Gerontol* 1987;22:103-11.
53. Teoman K, Sarah M, Hotamisligil GS. Functional analysis of tumor necrosis factor (TNF) receptors in TNF $\alpha$  mediated insulin resistance in genetic obesity. *Endocrinology* 1998;139:4832-8.
54. Tesfamariam B. Free radicals in diabetic endothelial cell dysfunction. *Free Radic Biol Med* 1994;16:383-91.
55. Vaisman N, Schattner A, Hahn T. Tumor necrosis factor production during starvation. *Am J Med* 1989;87:115.
56. Vara E, Arias-Díaz J, García C, Hernández J, García-Carreras C, Cuadrado A, et al. Production of TNF $\alpha$ , IL-1, IL-6 and nitric oxide by isolated human islets. *Transplant Proc* 1995;26:3367-71.
57. Welbourn CRB, Young Y. Endotoxin, septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators. *Br J Surg* 1992;79:998-1003.
58. Wierusz-Wysocka B, Wysochi H, Siekierba H, Wykretowicz A, Sczepanic A, Klimas R. Evidence of polymorphonuclear neutrophils (PMN) activation in patients with insulin-dependent diabetes mellitus. *J Leukoc Boil* 1987;42:519-23.
59. Wolff DG, Bidlack WR. The formation of carbon monoxide during peroxidation of microsomal lipids. *Biochem Biophys Res Commun* 1976;73:850-7.
60. Yamada K, Takane N, Otabe S, Inada C, Inoue M, Nonaka K. Pancreatic  $\beta$ -cell-selective production of tumor necrosis factor  $\alpha$  induced by interleukin-1. *Diabetes* 1993;42:1026-31.
61. Yu L, Genaro PE, Niederberger M, Burke TJ, Schrier RW. Nitric oxide: a mediator in the rat tubular hypoxia/reoxygenation injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1691-5.
62. Zimmerman BJ, Holt JW, Paulson JC, Anderson DC, Miyasaka M, Tamatani T, et al. Molecular determinants of lipid mediator-induced leukocyte adherence and emigration in rat mesenteric venules. *Am J Physiol* 1994;246:H847-53.