



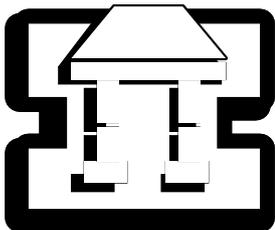
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

Estudio del papel del **Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF)** en la Diabetes mellitus tipo 2 (un modelo murino).

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A :
EMMANUEL LEAL RODRÍGUEZ

DIRECTORA DE TESIS:
DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi país (MÉXICO) y a mi patria querida, en la que nací y fui criado como un buen y orgulloso mexicano; a la UNAM por haberme dado esa oportunidad de conocer mi país, cultivarme y desarrollarme como un buen profesionalista.

Se la dedico a ROSALÍA RODRÍGUEZ, por su gran amor que me tiene, su confianza que me brinda y su incondicional apoyo que me hace seguir adelante...

A M. EMMANUEL LEAL, por su amor y por tratar de guiarme en el camino...

A DAVID LEAL por desempeñar el mejor rol de hermano que hay...

A la Drs. MIRIAM RODRÍGUEZ, por haberme invitado a participar en este maravilloso trabajo y en especial por ser una asesora de mucha confianza y por el trabajo que realizó conmigo.

Se la dedico también a M. del COSNUELO SOLÍS, por ser mi amiga y confidente durante el tiempo que nos hemos conocido.

A mis mascotas TARKUS y CHAC MOOL, por haber estado conmigo siempre leales y fieles.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Rosalía Rodríguez por todo el apoyo que me ha brindado igual que M. Emmanuel Leal ya que sin ellos no hubiese podido llegar hasta aquí.

A la Dra. Miriam Rodríguez por su asesoría.

A mi comité de sinodales por sus importantes sugerencias para la culminación de este trabajo

Agradezco a la UNAM, FES-Iztacala.

Agradezco a mis amigos y compañeros de laboratorio y de la escuela.

¡GRACIAS!

ÍNDICE

1. ABREVIATURAS.....	8
2. RESUMEN.....	11
3. INTRODUCCIÓN.....	12
3.1. DIABETES.....	13
3.1.1. Diabetes Mellitus tipo 1.....	13
3.1.2. Diabetes Mellitus tipo 2.....	14
3.2. GENERALIDADES DEL PÁNCREAS.....	14
3.2.1. Fisiología de las células β pancreáticas.....	14
3.2.2. Síntesis de Insulina.....	11
3.2.3. Papel de la concentración de glucosa en la liberación de insulina.....	16
3.3. TRANSPORTE DE GLUCOSA Y EFECTOS FISIOLÓGICOS DE LA INSULINA.....	18
3.3.1. Transportadores de glucosa.....	18
3.3.2. Procesos desencadenados durante la activación del receptor de insulina.....	20
3.3.3. En ningún caso la ausencia de los SRI causa problemas tan graves como cuando está alterado el mismo receptor de la insulina.....	21
3.3.4. Relación entre la expresión de GLUT-4 y la insulina.....	21
3.4 CAUSAS DE RESISTENCIA A LA INSULINA.....	22
3.4.1 Defectos en la translocación del GLUT-4.....	23
3.5. FACTORES PARÁCRINOS QUE DETERIORAN EL TRANSPORTE DE LA GLUCOSA INDUCIDO POR INSULINA.....	23
3.5.1. Ácidos grasos libres.....	23
3.5.2. Factor de necrosis tumoral α (TNF- α).....	23
3.5.3. Resistina.....	24
3.6. FACTOR INHIBIDOR DE LA MIGRACIÓN DE MACRÓFAGOS (MIF)	25
3.6.1. Contexto histórico.....	25
3.6.2. MIF en la inmunidad.....	26
3.6.3. Mecanismos inmunopatológicos relevantes a enfermedades.....	27
3.6.4. Mecanismos de MIF en la regulación de enfermedades inmunes mediadas por células T.....	27

3.6.5. MIF como mediador de la respuesta inmune innata.....	28
3.6.6. Participación de MIF en patologías inmunoinflamatorias.....	28
4. Justificación.....	30
5. Hipótesis.....	30
6. Objetivos.....	30
7. Material y Método.....	30
7.1. Animales.....	32
7.2. Genotipificación de los ratones experimentales (PCR).....	32
7.2.1.. Extracción de ADN.....	32
7.2.2.. Amplificación del gen (PCR).....	32
7.2.3.Electroforesis.....	33
7.3. Inducción de la diabetes.....	33
7.4. Glucosa, insulina y otras citocinas (TNF- α y Resistina).....	34
7.5. Evaluación clínica.....	34
7.6. Histología.....	34
7.7. Prueba de tolerancia a la glucosa.....	35
7.8. Determinación de citocinas por ELISA–Sándwich.....	35
7.8.1. Sensibilización de la placa.....	35
7.8.2. Muestras y curva.....	35
7.8.3. Revelado del ELISA.....	36
7.9. Análisis estadístico.....	36
7.10. Alcance de la investigación.....	36
7.11. Diseño experimental.....	36
7.12. Fórmula.....	36
7.13. Diagrama de flujo.....	37

8. Resultados.....	38
9. Discusión.....	49
10. Conclusiones.....	53
11. Apéndice.....	54
12. Referencias Bibliográficas.....	57

1.-ABREVIATURAS

\pm	más, menos (por encima/debajo del valor medio)
$^{\circ}\text{C}$	unidad de temperatura grados centígrados
\AA	amperes
a.a	aminoácido
acetil-CoA	acetil Coenzima A
A-Cys	aminoácido cisteína de la cadena A de la insulina
B-Cys	aminoácido cisteína de la cadena B de la insulina
ANOVA	análisis de varianza
ARDS	síndrome de diestrés respiratorio agudo
ATP	adenosín trifosfato
BALB/c MIF+/+	cepa de ratones con fondo genético BALB/c, silvestre
BALB/c MIF-/-	cepa de ratones con fondo genético BALB/c, con delección del gen que codifica para MIF
cDNA	ácido desoxiribonucleico codificador
CD74	receptor para MIF
COX	enzima ciclooxigenasa (hay dos tipos)
DM	diabetes mellitus tipo (puede ser 1 o 2 en este caso)
DNA	ácido desoxiribonucleico
DNAsa	enzima que corta la cadena de DNA
DTH	hipersensibilidad de tipo retardada
ELISA	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas)
ERK	Src-related tyrosine kinase-, Ras- (Ras- tirosincinasa relacionado al Src)
FFA	ácidos grasos libres (free fatty acids)
g	gramos
GLUT	transportador de glucosa
Gab	factor de crecimiento asociado
Grb	factor de crecimiento enlazado a receptor de proteína
HDL	high density lipoprotein (lipoproteinas de alta densidad)
HPA	pituitaria adrenal del hipotálamo

IDDM	diabetes mellitas insulino-dependiente
iNOS	óxido nítrico sintasa inducible
IL	interleucina
INF-γ	interferón γ
INS	gen de la insulina
JAB	Janus tyrosine kinases binding protein (Janus proteína de enlaces tirosin-cinasa)
kg	kilogramo
Km	cinética de Michaelis-Menten describe la velocidad de reacción de muchas reacciones enzimáticas
KO	knock out (ratón con delección en algún gen)
l	litros
LPS	lipopolisacárido
M	molaridad, molar
μ	unidad de medición micrométrica
μU/ml	micro unidades por mililitro
min	minutos
ml	mililitros
mmol	mili molal
MIF	Factor inhibidor de la migración de macrófagos
mRNA	ácido ribonucleico mensajero
n	unidad de medición nanométrica
NEO	gen de inserción (neomicina)
NF-κB	factor nuclear κ B
NIDDM	diabetes mellitus no insulino-dependiente, DM-2
NO	óxido nítrico
$p < 0.05$	valor de significancia menor de 0.05
p53	proteína, factor de transcripción codificada por el gen TP53
pb	pares de bases
PGE2	prostaglandina E 2
pH	potencial de hidrógeno
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PI-3K	fosfatidil-inositol 3-cinasa
PLC-γ	fosfolipasa C- γ

PP	polipéptido pancreático,
rpm	revoluciones por minuto
RA	artritis reumatoide
R1, R2	receptor1, receptor 2
RNA	ácido ribonucleico
RNAsa	enzima que corta la cadena de RNA
SEM	standard error of the mean (error estándar de la media)
SLGT	Sodium dependent glucose transporters (transportadores de sodio dependientes de glucosa)
SHC	Src proteínas homólogas a la colágena
SRI	Sustratos relacionados con el receptor de la insulina
STZ	estreptozotocina
Th	T colaboradoras (del inglés; T-helper)
TH	hidroxilasa de tirosina
TNF-α	factor de necrosis tumoral α
IGF	factor de crecimiento semejante a la insulina, hay varios tipos
VLDL	lipoproteínas de muy baja densidad (del inglés; very low density lipoproteins)

2.-RESUMEN

En México la primera causa de muerte es provocada por la diabetes. La obesidad y la vida sedentaria son las principales causantes para propiciar el desarrollo de la Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT-2 diabetes no insulino dependiente). Es ampliamente reconocido que la obesidad y la resistencia a la insulina están relacionadas con una inflamación sistemática crónica de bajo grado, la cual puede estar mediada por una citocina de la respuesta inmune llamada Factor inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF, por sus siglas en inglés). Para poder probar la participación de esta citocina (MIF) en la génesis y patofisiología de la DM-2 utilizamos un modelo de DM-2 de progresión lenta, de una sola dosis de 165 µg/kg de STZ en un buffer de citratos a un pH de 4.5, con el cual se logró que los ratones tuvieran niveles altos de glucosa, entre 200 mg/dl y 600 mg/dl en un lapso relativamente corto (7 días). Los efectos de la DMT-2 fueron evidentes en ambos grupos experimentales, dando incremento en el peso y el aumento de los niveles de glucosa en sangre sin embargo la ausencia de MIF redujo parcialmente el incremento de la glucosa en sangre, otras citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β y resistina), monocitos en sangre periférica, como la mortandad inducida por la diabetes.

ABSTRACT

The first dead cause in Mexico is the diabetes. The obesity and the sedentary lifestyle are the principal causes that promote the development of the Diabetes Mellitus Type 2 (DMT-2 non insulin-dependant diabetes). Previously, it has been recognized that obesity and insulin resistance are related with a low grade chronic systemic inflammation, which might be mediated by a cytokine of the immune response called Macrophage Inhibitory Migration Factor (MIF). In order to be able to prove the participation of this cytokine (MIF) inside DMT-2, it was used a low-progression DMT-2 model, of only one 165 µg/kg of STZ in a citrate buffer with a 4.5 pH, with which was obtained glucose high levels in mice, between 200mg/dl and 600mg/dl in a relatively short lapse (7 days). The DMT-2 effects were evident in both experimental groups, giving an increment in the weight and glucose levels, however the missing MIF cytokine, partially reduced the glucose increment, as other pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β and resistine), peripheral blood monocytes as the mortality of the MIF -/- mice group.

3.-INTRODUCCIÓN

La diabetes mellitus es una de las principales causas de muerte a nivel mundial, en México esta patología fue responsable de aproximadamente 62,243 muertes en el año 2005, y desde el año 2000 la diabetes pasó a ser la primera causa de muerte en mujeres y la segunda en hombres (después de la cardiopatía isquémica, enfermedad resultante muchas veces de la diabetes) [1].

México ocupa el lugar número nueve a nivel mundial en frecuencia de diabetes mellitus tipo 2 (DM-2), pues se estima que aproximadamente 10 millones de personas la padecen, lo que representa el 10.8% de los mexicanos. Actualmente, es ampliamente reconocido que el sobrepeso u obesidad son factores de riesgo para el desarrollo de la DM-2 debido a una acumulación excesiva de grasa en el abdomen, asociada a hipertensión arterial, altas concentraciones de colesterol, triglicéridos, colesterol HDL y ácido úrico, condición que antecede la aparición de la hiperglucemia y en consecuencia el desarrollo de la DM-2 .

En México el sobrepeso y obesidad son problemas que afectan a cerca de 70% de la población [71.9 % de mujeres, 66.7% de hombres, entre los 30 y 60 años; y cerca del 30% de jóvenes de ambos sexos entre 20-30 años] padecen obesidad [1,2] resultado del estilo de vida actual de las grandes ciudades. En las zonas rurales, la distribución de nutrientes en la dieta promedio es de 64% de carbohidratos, 12.1% de proteínas y 22.7% de grasas. Al migrar los individuos de una área rural a una urbana, el consumo de grasas aumenta (27.6 y 33% en zonas de bajos y medianos ingresos económicos, respectivamente) y disminuye el de carbohidratos complejos. Por el contrario, el consumo de azúcares se incrementa o se mantiene sin cambios. Por otra parte, la actividad física de un alto porcentaje de esta población se reduce al mínimo [3].

En la Figura 1 puede apreciarse la distribución de los países que mayor incidencia de DM-2. La (1) India lidera la lista de los diez países del mundo con el mayor número de personas con diabetes, con una cifra actual de 40,9 millones, seguida de (2) China con 39,8 millones. Por detrás están (3) EE.UU. 20.8 millones, (4) Rusia 9.7 millones, (5) Alemania, (6) Japón, (7) Pakistán, (8) Brasil, (9) México y (10) Egipto. Los países en desarrollo son siete de los diez primeros del mundo [2,4].

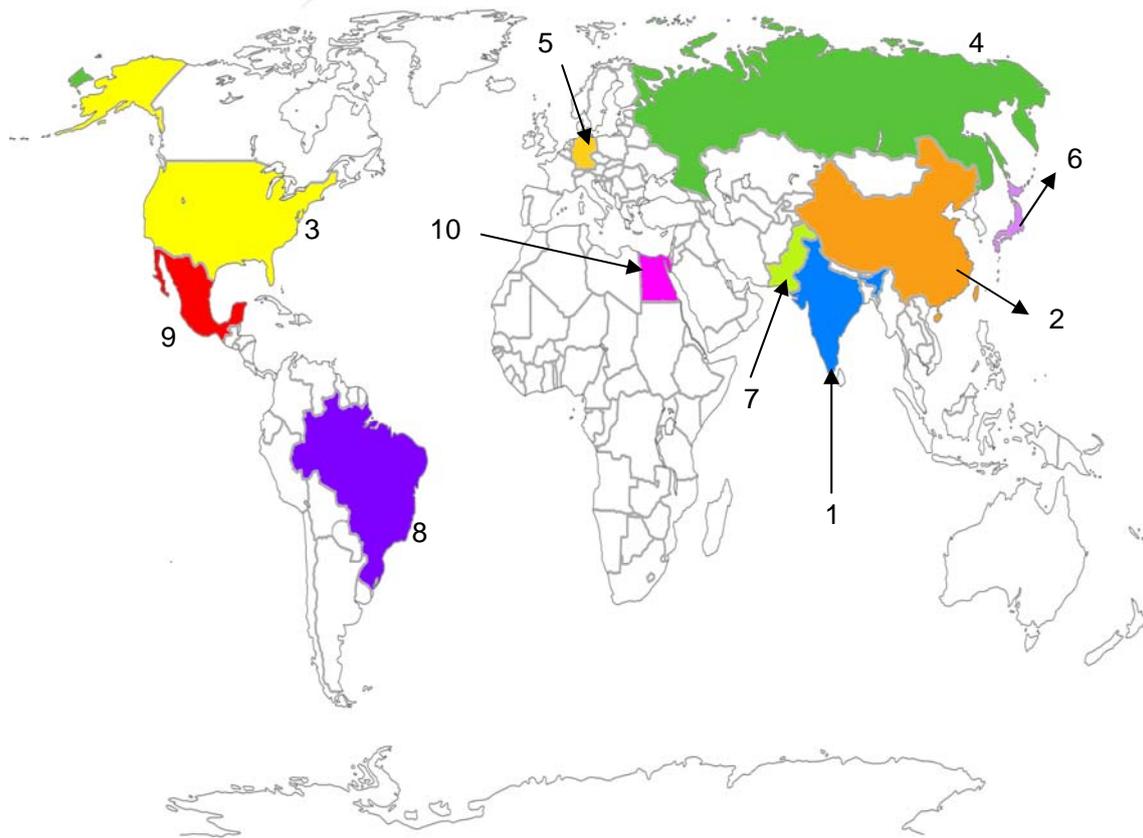


Fig. 1) México y la diabetes en el mundo: La diabetes, especialmente la de tipo 2, afecta ahora al 5,9% de la población adulta del mundo con casi un 80% del total en los países en desarrollo. Las regiones con las tasas más altas son el Mediterráneo oriental y el Oriente Medio, donde el 9,2% de la población adulta se ve afectada, y Norteamérica (8,4%). Las cifras más elevadas, sin embargo, se encuentran en el Pacífico occidental, donde unos 67 millones de personas tienen diabetes, seguido de Europa, con 53 millones [4].

3.1.-DIABETES: La diabetes es un desorden metabólico que ocurre cuando: 1) Se produce poca o nada de insulina en el páncreas, esto por la alteración de las células β que se encuentran en los islotes de Langerhans. 2) Cuando la insulina no es aceptada por las células debido a una alteración en los receptores celulares para esta molécula. Distinguiéndose así, dos tipos diferentes de diabetes, la diabetes mellitus tipo 1 y la diabetes mellitus tipo 2, respectivamente.

3.1.1.-Diabetes Mellitus tipo 1. También conocida como diabetes insulino dependiente o de comienzo juvenil, es una enfermedad crónica (permanente), que ocurre cuando el páncreas produce muy poca o nada de insulina, la cual se encarga de regular los niveles de azúcar en sangre y permite su ingreso, como fuente de energía a las células. En ausencia o niveles bajos de insulina, las células son incapaces de utilizar la

glucosa como energía y como consecuencia se generan altos niveles de glucosa en el torrente sanguíneo, incremento en el apetito, en la frecuencia de la micción y aumento en la sensación de sed [5]. En el mundo 1 de cada 7,000 niños padece esta enfermedad y es poco probable adquirirla después de los 20 años [2,5]. En la mayoría de los pacientes con diabetes tipo 1, las células β productoras de insulina han sido destruidas por el sistema inmune. Las causas por las que el sistema inmune reconoce a las células β como extrañas y las elimina es debido a una combinación de factores genéticos y ambientales [5].

3.1.2.-Diabetes Mellitus tipo 2. También conocida como diabetes no dependiente de insulina, en este caso no se presenta una destrucción específica autoinmune y los pacientes no tienen ninguna otra causa aparente de su desarrollo, se caracteriza por una resistencia periférica a la insulina y por defectos parciales en la secreción de insulina. Los pacientes con esta enfermedad pueden subdividirse en dos categorías, I) el tipo obeso con hiperinsulinemia plasmática [6] y II) el tipo no obeso con hipoinsulinemia plasmática. En el primer caso hay una correlación directa con el envejecimiento, el aumento de peso, la falta de realización de actividad física y la tendencia genética al desarrollo de la enfermedad. Esto debido a que las células se vuelven incapaces de usar la insulina fabricada por las células β del páncreas [7], presentándose con mayor incidencia en individuos padecientes de dislipidemia o hipertensión, además de una asociación a la predisposición en los genes, la cual no se ha definido claramente por su complejidad, pero es mayor el número de casos que sufren la diabetes tipo dos con caso de obesidad [8].

3.2.-GENERALIDADES DEL PÁNCREAS

3.2.1.-Fisiología de las células β pancreáticas. Cuando ingerimos alimento, después de todos los procesos de digestión, los carbohidratos se convierten en glucosa, los cuales se disuelven en la sangre de todo el cuerpo, y gracias a la ayuda de la insulina son aceptados por las células para utilizarlos como fuente de energía [2]. Este proceso es regulado a través de diversas moléculas producidas en el páncreas.

El páncreas es una glándula grande de secreción mixta que se encuentra detrás del estómago constituido por una parte exócrina y un parte endócrina. La exócrina se constituye por diversas enzimas digestivas elaboradas por las células de los acinos pancreáticos. Estas enzimas son vertidas al intestino delgado junto con una alta cantidad de bicarbonato al conducto pancreático principal que desemboca en la segunda porción del duodeno y son las responsables de la producción del jugo pancreático [9].

La parte endócrina corresponde a cuatro diferentes tipos celulares que se agrupan entre los acinos pancreáticos capaces de secretar diferentes hormonas al torrente sanguíneo. Estas agrupaciones son llamadas “islotos de Langerhans”. Se calcula que existen alrededor de dos millones de islotos en el páncreas. Dichos islotos son micro órganos compuestos por subunidades celulares: células α , β , Δ y PP. Las células α producen y liberan glucagón, una hormona que eleva el nivel de glucosa en la sangre. Representan del 10-20% de los islotos de Langerhans y se distribuyen periféricamente. Mientras que, las células β producen y liberan insulina, hormona que regula los niveles de glucosa en la sangre. Su función es retirar el exceso de glucosa, la cual se almacena en el hígado en forma de glucógeno. Las células Δ producen somatostatina, hormona que se cree regula la producción y liberación de la insulina por las células β , la producción y liberación del glucagón por las células α . Y las células PP, producen y liberan polipéptido pancreático (de ahí sus iniciales PP) [9]. Las células endócrinas que más abundan en el páncreas son las células β constituyendo alrededor de un 70%, mientras que las α les corresponde un 20%, a las δ entre 5 y 10%, siendo las células PP las menos abundantes con tan sólo alrededor de 2% del tejido pancreático [9].

Así, la alteración en el funcionamiento de las células α y/o β , el bajo o nulo aprovechamiento de los factores que generan estas células culmina en un desorden metabólico, que puede afectar órganos importantes como los ojos (ceguera), riñones (diálisis), piernas y pies (amputación), además de padecer daños causados por el sistema inmune en tiroides, alteraciones en las glándulas suprarrenales, alergia al gluten, anemia perniciosa, menopausia precoz y ciertas hepatitis entre otras [5].

3.2.2.-Síntesis de insulina. En el humano el gen de la insulina (*INS*) está situado en el cromosoma 11p15.5, entre los genes de la hidroxilasa de tirosina (*TH*) y el factor 2 de crecimiento semejante a la insulina (*IGF-2*). El gen contiene tres exones y dos intrones y el transcrito final de mRNA empalmado tiene 446 pares de bases de longitud y codifica la síntesis de preproinsulina [10], cuyo peso molecular es de 11,500 Daltons, esto ocurre en el retículo endoplásmico rugoso [9]. La preproinsulina es desdoblada por acción enzimática. La proinsulina con un peso molecular de 9,000 Daltons, es incorporada al aparato de Golgi. En la región trans del aparato de Golgi ocurre la formación de vesículas secretoras. La proinsulina queda empaquetada en las vesículas. Una vez que la vesícula es botada del aparato de Golgi, se ancla en el citoesqueleto mediante unas proteínas conocidas como sinapsinas. Endopeptidasas en la vesícula secretora efectúan el desdoblamiento de la

proinsulina en dos péptidos diferentes. Las dos moléculas resultantes son la insulina con sus cadena A y B correctamente alineadas y el péptido conector (péptido C) [10].

En condiciones normales las cantidades de insulina y péptido C liberadas deben ser iguales. Se desconoce la función del péptido C. La proinsulina tiene menos de 8% del efecto biológico de la insulina. Tres por ciento del total de la secreción de la célula β corresponde a la proinsulina [9].

La insulina biológicamente activa, es un péptido que se constituye por dos cadenas: una cadena A de 21 aminoácidos (a. a.) y una B de 30 a. a., las cadenas quedan unidas entre sí por dos puentes disulfuro intercatenarios en A-Cys7/B-Cys 19, también hay un puente disulfuro intercatenario en A-Cys 6/A-Cys 11 [10]. El peso molecular de la insulina es de 5,800 Daltons. La vida media de la insulina en plasma es de 5-6 minutos. Es degradada por insulinasas ubicadas en el hígado y riñón. En casos de insuficiencia hepática y/o renal los niveles de insulina tienden a aumentar. En condiciones normales la insulina recién producida que pasa por la vena porta tiene una concentración del doble de la encontrada normalmente en el plasma de cualquier otro vaso sanguíneo. Esto se debe al potente sistema de insulinasas hepáticas. Por tal motivo, se cuantifica el péptido C como parámetro para determinar la síntesis de insulina al no ser degradada como ocurre con la insulina [9].

La cantidad de insulina liberada por día en un sujeto sano con alimentación normal es de 40-50 unidades* (287-358 nano-Molas).

La concentración en ayuno es de 10 μ U/ml. Después de una comida se eleva alrededor de 100 μ U/ml [9].

3.2.3.-Papel de la concentración de glucosa en la liberación de insulina. La glucosa entra a las células β pancreáticas a través de un transportador GLUT 2 (Glucose Transporter). Sin embargo, la glucosa por sí misma no produce ningún efecto, ya que no hay interacciones directas de moléculas de glucosa con los canales de potasio dependientes de ATP [9].

La participación de la glucosa (1) sobre estos canales se da de manera indirecta, cuando entra a la célula β y es fosforilada mediante la enzima glucocinasa para formar glucosa-6-fosfato (2) e iniciar la glucólisis [9].

*(Una unidad de insulina equivale a la unidad de insulina necesaria para discriminar en un conejo en ayunas la glucosa).

Entonces, la fosforilación de la glucosa permite que se inicie la glucólisis (3) obteniéndose ácido pirúvico, el cuál entra a la cadena respiratoria en forma de acetyl-CoA por medio del complejo de la piruvato-deshidrogenasa (4) [9].

La activación de la cadena respiratoria produce una concentración de ATP (5) elevada en la célula y el cierre del canal de potasio dependiente de ATP, con la consecuente cascada de eventos que culmina en la liberación de insulina (6) [9], (Figura 2).

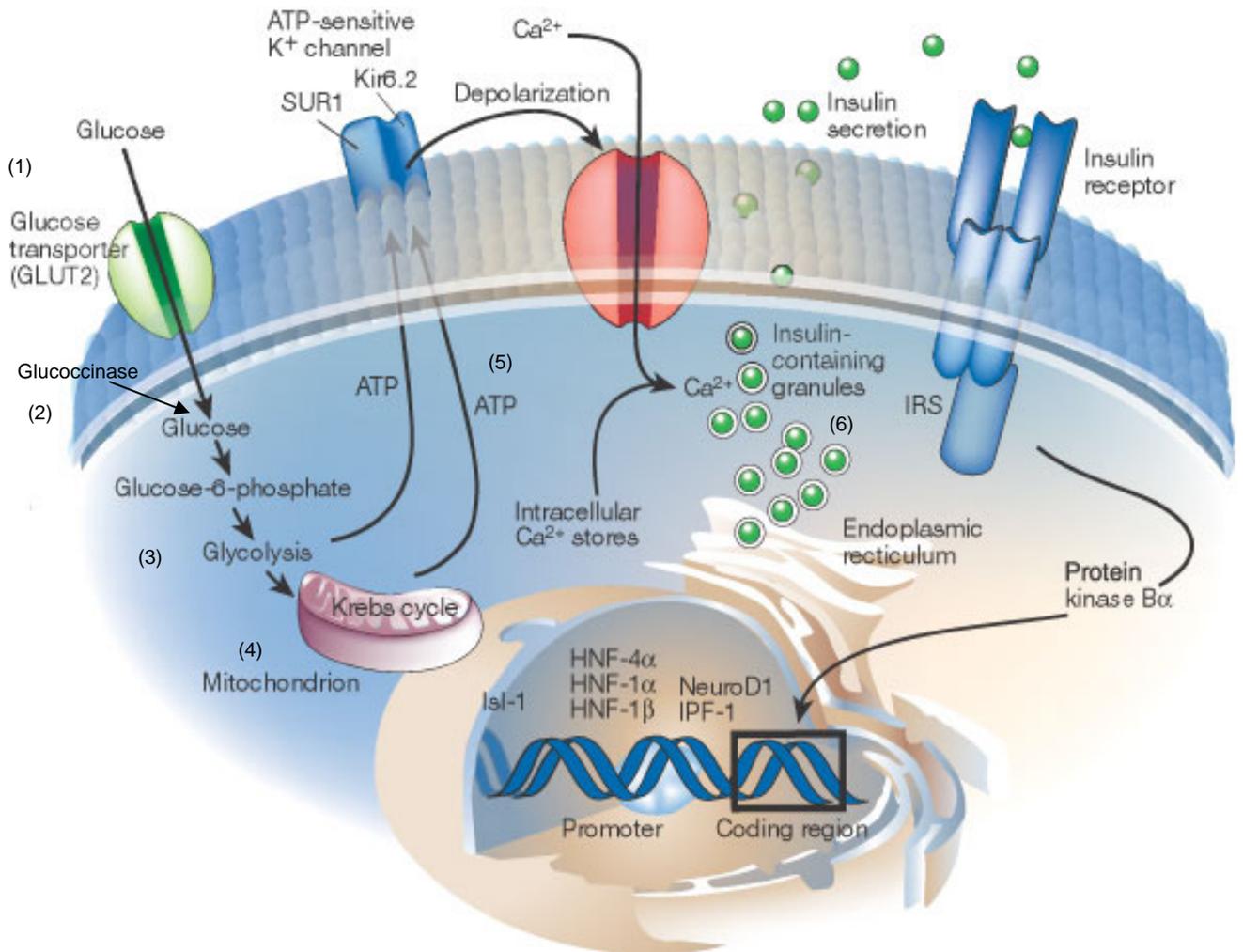


Fig. 2) Esquema de la célula β y el proceso de secreción de la insulina activada por la glucosa [11].

3.3 TRANSPORTE DE GLUCOSA Y EFECTOS FISIOLÓGICOS DE LA INSULINA

3.3. Transportadores de glucosa. Existen varias formas de transporte de la glucosa. Una manera por la cual la glucosa puede atravesar la membrana es por medio de un gradiente de concentración; es decir, la glucosa de la región en donde su concentración es mayor hacia donde es menor. Otra forma de transporte se lleva a cabo a la inversa (transporte contragradiante). El tipo de proteínas encargadas del transporte de glucosa es diferente en ambos casos.

Para el transporte en contragradiante se localizan en la región apical de células epiteliales ubicadas en el intestino delgado y sistema tubular del riñón. A estos transportadores se les conoce como SLGT (Sodium dependent glucosa transporters) de los cuales hay dos subtipos, SLGT-1 y SLGT-2. Ambos transportadores están íntimamente acoplados al ión sodio.

Los transportadores de glucosa independientes de Na^+ , a favor del gradiente de concentración constituyen una familia de genes que se les denomina GLUT-1 a GLUT-13 (tabla1) [9,10,12]. Existen 13 diferentes tipos (isoformas) funcionales, de las cuáles el GLUT 7 es el único que no se ha esclarecido su función y/o su ubicación [12]. La mayoría de los GLUT están ubicados de forma constitutiva en la membrana plasmática. A excepción del GLUT-4, la mayor parte de los GLUT no necesitan de hormonas, neurotransmisores o secreciones parácrinas para variar de manera considerable su cantidad en la membrana plasmática. Sin embargo, las células que dependen de la presencia del GLUT-4 para que entre la glucosa, como es el caso de las células de músculo esquelético y cardíaco y en los adipocitos, necesitan forzosamente de la activación de receptores de insulina en su membrana plasmática para que pueda expresarse el transportador [9].

GLUT-2 tiene mayor K_m para la glucosa y mayor capacidad de transporte de glucosa que otros miembros de la familia [10]. El GLUT-2 se localiza en células relacionadas con el mecanismo global de la glucosa, tal es el caso de las células β pancreáticas y hepatocitos. En las células β el metabolismo de la glucosa por sí mismo desarrolla la liberación de la insulina. Si la constante de afinidad para el transportador fuera bajo en dichas células –es decir que la glucosa a baja concentración tuviera la capacidad para pasar por el transportador-. Entonces se liberaría insulina constantemente y se provocarían hipoglucemias graves. Por otra parte, los transportadores GLUT-1, GLUT-3, GLUT-4 tienen baja afinidad por la glucosa. Su k_m tiene un valor de 2-5 mmol.

Considerando que la concentración plasmática de glucosa en ayunas es menor de 5 mmol, entonces la K_m de estos receptores garantiza la entrada de glucosa a las células que los expresan [9].

CARACTERÍSTICAS DE LOS TRANSPORTADORES DE GLUCOSA [12]

ISOFORMAS	NÚMERO DE AA	K_m^* (mM)	LOCALIZACIÓN EN LOS TEJIDOS	FUNCIÓN
GLUT1	664	1.6	Eritrocito, barreras hematoencefálicas, placentaria y de la retina, astrocito, nefrona	Ingreso basal de glucosa
GLUT2	522	17	Células B pancreáticas, hígado, intestino delgado, nefrona proximal	Censor de glucosa en páncreas, transporte de glucosa en la membrana baso lateral de intestino y riñón
GLUT3	596	2	Cerebro, placenta, hígado, riñón y corazón	Ingreso basal de glucosa
GLUT4	509	5	Músculo esquelético y cardiaco, tejido adiposo	Ingreso de glucosa estimulado por insulina
GLUT5	501	No aplica	Yeyuno, espermatozoides, riñón, células de la microglia	Transporte de fructosa
GLUT6	507		Cerebro bazo y leucocitos	Ingreso de glucosa estimulado por insulina
GLUT7			Sin determinar	

GLUT8	477		Testiculos y placenta	Ingreso de glucosa
GLUT9	540		Riñón e hígado	Ingreso de glucosa
GLUT10	541		Hígado y páncreas	Ingreso de glucosa
GLUT11	496		Músculo esquelético y corazón	Ingreso de glucosa
GLUT12	617		Músculo esquelético, tejido adiposo, intestino delgado	Ingreso de glucosa
GLUT13	629		Cerebro	Ingreso de glucosa y mioinositol

*El valor del Km está determinada para la glucosa

3.3.2. Procesos desencadenados durante la activación del receptor de insulina.

El receptor para la insulina es una proteína integral de la membrana plasmática en una gran variedad de células. Este se constituye por dos subunidades α y dos subunidades β . Las subunidades α tienen una región externa en relación con el líquido extracelular, además del sitio de reconocimiento de la insulina. Las subunidades β se relacionan con el líquido intracelular y tiene regiones catalíticas que permiten su autofosforilación y la fosforilación de proteínas, entre ellas la insulina[9].

Los receptores para la insulina pertenecen a un grupo de moléculas con actividad de tirosin-cinasa. La característica primordial de los receptores tirosin-cinasa radica en que cuando son activados se desencadenan una serie de cambios conformacionales dentro del mismo receptor, provocando una autofosforilación de los residuos de tirosina por medio de la hidrólisis de moléculas de ATP [9,10].

Una vez fosforilado el receptor, fosforila otras proteínas. La subunidad β fosforilada tiene capacidad para actuar como enzima uniendo grupos fosfato con proteínas específicas relacionadas al receptor de la insulina, las cuales son conocidas como “sustratos relacionados con el receptor de la insulina” (SRI), y existen 4 [9].

A pesar de la presencia del receptor de la insulina, alteraciones en los SRI causan defectos en el metabolismo intermedio. Se ha considerado que la función del SRI-4 es vital

en el metabolismo del músculo esquelético, mientras que el SRI-2 lo es en la función hepática [9].

3.3.3. En ningún caso la ausencia de los SRI causa problemas tan graves como cuando está alterado el mismo receptor de la insulina. Esto implica que probablemente los SRI no medien todas las respuestas de la insulina en las células blanco. La insulina actúa en el metabolismo como intermediario de las células musculares y adipocitos a través de la SRI, fosfolipasa C- γ (PLC- γ) y la fosfatidil-inositol 3-cinasa (PI-3K). En los adipocitos aumenta la captación de grasas por activación de la lipoproteína lipasa, disminuye la actividad de la “lipasa sensible a hormona”, por la cuál se abate la lipólisis.

En las células del músculo esquelético promueve la síntesis de proteínas para fomentar la captación de aminoácidos. Además, permite el almacenamiento de glucógeno y captación de glucosa.

La insulina tiene efectos en la expresión de genes. A través de los SRI se producen cambios en la actividad de factores de transcripción. Este proceso fomenta la síntesis de nuevas proteínas [9].

3.3.4. Relación entre la expresión de GLUT-4 y la insulina. La glucosa para entrar a las fibras musculares y adipocitos necesita de la presencia del GLUT-4. Por lo regular, en reposo, existe la presencia de los GLUT-4 en la membrana plasmática de dichas células. Esta cantidad de transportadores es insuficiente para proveer la glucosa necesaria en su metabolismo [9]. En condiciones basales, la mayor parte de los GLUT-4 se localizan en estructuras túbulo vesiculares agrupadas en la región del aparato de Golgi, o bien en vesículas en el citosol. Durante la activación de los receptores para insulina, la expresión de los GLUT-4 en la membrana se incrementa hasta 30 veces con respecto a la expresión basal [9].

El ejercicio físico incrementa la expresión de los GLUT-4 en fibras musculares, lo cual puede mejorar la glucemia en individuos diabéticos [9,10,13]. En células musculares y adiposas normales, el GLUT-4 es reciclado entre la membrana plasmática y un almacén intracelular. El transportador GLUT-4 difiere de otros transportadores de glucosa en que cerca del 90% se encuentra secuestrado en forma intracelular en ausencia de insulina u otros factores estimulantes como el ejercicio.

En presencia de estos factores estimulantes, el equilibrio de este proceso de reciclaje es alterado a favor de una translocación (movimiento regulado) de GLUT-4 de las vesículas de almacenamiento intracelular a la membrana plasmática, y en el caso del músculo a los túmulos transversos. El efecto neto es un incremento en la velocidad máxima del transporte

de la glucosa hacia el interior de la célula. El movimiento intracelular del GLUT-4 estimulado por insulina es iniciado por la unión de la insulina a la porción extracelular del receptor transmembrana de la insulina. La unión activa la tirosina cinasa que fosforila la porción intracelular del receptor. El principal sustrato para la tirosina cinasa incluye a los sustratos moleculares del receptor de la insulina (IRS-1, IRS-2, IRS-3 e IRS-4), Gab-1 (Grb-2 [factor de crecimiento enlazado a receptor de proteína 2]- asociado 1), SHC (Src y proteínas homólogas de la colágena), lo que es suficiente para inducir al menos una translocación parcial del GLUT-4 a la membrana plasmática. Otras dos formas posibles de la translocación del GLUT-4 a la membrana plasmática pueden ser por la expresión de las formas activas de la proteína cinasa B, o isoformas atípicas de proteína cinasa C, ambas estimuladas por la insulina [9].

3.4 CAUSAS DE RESISTENCIA A LA INSULINA. Los defectos en la acción de la insulina originan resistencia de los tejidos a ella; tal situación es un estado metabólico en que concentraciones fisiológicas de la hormona originan una respuesta biológica menor de la normal. Este estado, constituye un signo constante y unánime de la DM-2 y puede deberse a diversas razones:

- anormalidad de las moléculas insulínicas
- conversión incompleta de la proinsulina a insulina
- mayores valores de hormona de crecimiento, cortisol, glucagón o catecolaminas
- presencia de anticuerpos contra receptores de insulina o de la propia hormona
- menor número de capilares o incapacidad de la insulina para facilitar su propia distribución por medio del incremento de la corriente sanguínea
- disminución del paso transcápilar del compartimiento intravascular al intersticial

Sin embargo, la causa principal de esa resistencia en la mayor parte de los enfermos de DM-2, se sitúa a nivel celular [10].

La concentración de GLUT-4 se encuentra reducida en adipocitos de sujetos obesos y en aquellos con deterioro de la tolerancia a la glucosa o con DM-2, pero las concentraciones del GLUT-4 no se encuentran disminuidas en el tejido muscular de sujetos obesos o con DM-1 o DM-2, diabetes gestacional o en familiares de pacientes con DM-2 resistentes a la insulina. Ya que el músculo es el principal sitio de utilización de la

glucosa estimulada por insulina, en estos casos, no puede ser explicada por una disminución en la producción del GLUT-4 [9].

El decremento en las concentraciones de GLUT-4 puede causar diabetes pero no es la causa directa de la resistencia a la insulina en obesidad y diabetes, ésta puede tener un importante abordaje terapéutico [10].

3.4.1 Defectos en la translocación del GLUT-4. La reducción del consumo de glucosa estimulado por insulina en el músculo esquelético de sujetos obesos y en aquellos con diabetes, se encuentra asociada con un deterioro en el movimiento de GLUT-4 de las vesículas intracelulares a la membrana plasmática. De esta forma, las concentraciones de GLUT-4 son normales en el músculo esquelético de estos sujetos, y la principal explicación para la resistencia a la insulina, es un defecto en la vía de señalización mediada por la insulina que regula la translocación del GLUT-4 o en la maquinaria molecular directamente involucrada en el reclutamiento de las vesículas con GLUT-4 a la membrana plasmática, su acoplamiento y posterior fusión a esta membrana [9].

3.5 FACTORES PARÁCRINOS QUE DETERIORAN EL TRANSPORTE DE LA GLUCOSA. En este tema sólo abordare cuatro factores parácrinos, los ácidos grasos libres, el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) y resistina, que guardan estrecha relación con otra molécula conocida como factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF).

3.5.1. Ácidos grasos libres. La acumulación de grasa corporal (obesidad) y el consumo excesivo de grasas en los alimentos conllevan a la resistencia a la insulina [10,13]. El hecho de que la resistencia a la insulina se intensifique al aumentar de peso y disminuya al reducirlo, ha sugerido que la acumulación de grasa, además de incrementar la resistencia a la insulina, podría ser un factor del origen de la resistencia [10]. Evidencias recientes soportan esta hipótesis, pues se ha reportado que, la infusión de lípidos disminuye la utilización de la glucosa inducida por la insulina en el músculo, en asociación con una pérdida en la habilidad de la insulina para estimular la actividad de la fosfoinositido-3 cinasa (una de las vías de señalización para alterar GLUT-4) [9]. Un mecanismo posible sería la liberación en mayor volumen de uno o más mensajeros desde el tejido adiposo, que inhiben la acción de la insulina en el músculo de fibra estriada o en el hígado. Se ha postulado algunos encargados de esta posible función, como serían la leptina, el TNF- α , los ácidos grasos libres (FFA) y la resistina [10,13].

3.5.2. Factor de necrosis tumoral α (TNF- α). El origen de expresión del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) en el tejido adiposo son principalmente los macrófagos pero

también los adipocitos, de este hecho parte que haya una relación positiva entre el TNF- α y el grado de obesidad con una relación inversa con el grado de resistencia a la insulina. Hasta ahora no se conocen bien el (los) método(s) o rutas por la que TNF- α promueva la resistencia a la insulina, pero en varios diseños experimentales recientes se han estudiado sus efectos tanto indirectos como directos [9,10,13].

Efectos indirectos, en experimentos con roedores se vio que TNF- α promueve la resistencia de insulina, además de que se observaron mayores concentraciones de glucocorticoides y adrenalina. Es probable que la leptina al igual que los FFA sean regulados positivamente por TNF- α , la cuál podría influir en decremento de la acción de la insulina a nivel sistémico en la obesidad [10].

Efectos directos se ha visto que en células sensibles a insulina tratadas con TNF- α se modifica claramente la actividad catalítica del receptor de insulina. En los adipocitos dicho tratamiento origina un decremento moderado (del 20-50%) de la autofosforilación de la insulina estimulada por la hormona, y un efecto más notable en la fosforilación de IRS-1. También la inhibición de la señalización de insulina por TNF- α es mediada por el receptor 1 de dicho factor (de dos factores), esto en adipocitos [10].

Además de los adipocitos se ha demostrado resistencia a la insulina inducida por TNF- α en otros tipos celulares. Al parecer varían los mecanismos, o los factores que median tales acciones, y dependen no sólo de la duración y la intensidad de la exposición a TNF- α , sino también de los tipos celulares específicos.

Los miocitos, los hepatocitos y los adipocitos expresan mRNA para los dos receptores de TNF identificados R1 y R2. El mRNA y la proteína de TNF- α son producidos principalmente en el tejido adiposo, y se ha demostrado que el TNF- α exógeno suprime la acción insulínica en los adipocitos; por todo lo expuesto, es razonable suponer que dicha citocina actúa de manera directa en los adipocitos por medio de un circuito autócrino [10].

Otros posibles reguladores pudieran ser algunos productos avanzados de la glucosilación que se incrementan en la diabetes y son capaces de inducir la acción de TNF- α en macrófagos.

3.5.3. Resistina. El tejido adiposo ha sido reconocido no solamente como un almacén para los lípidos, sino también como un órgano metabólico endócrino. Estudios recientes han demostrado que los adipocitos son capaces de sintetizar y secretar un número de moléculas activas biológicamente [14], incluyendo TNF- α , leptina, interleucina 6 (IL-6), activador plasmogénico inhibidor-1, adiponectina y resistina [15].

El descubrimiento de la resistina ha intensificado las investigaciones en cuanto a los mediadores de la resistencia a la insulina en la obesidad y la DM-2 [15].

Se sabe que la resistina promueve la poca sensibilidad a la insulina, especialmente en el tejido hepático durante la DM-2, además de incrementarse las glucemias debido a un aumento en la glucogenólisis y gluconeogénesis en el hígado [16].

Los niveles incrementados de resistina han sido relacionados con niveles incrementados de endotoxinas y citocinas inflamatorias [17].

3.6 FACTOR INHIBIDOR DE LA MIGRACIÓN DE MACRÓFAGOS (MIF)

3.6.1. Contexto histórico. La molécula MIF fue descubierta en la década de los 60's por los Drs. J. R. David y Bloom simultáneamente con el Dr. Bennett, [6,7,18].

Los factores solubles producidos por los linfocitos fueron referidos inicialmente como linfocinas y subsecuentemente con el término de citocinas, éste último concepto incluye factores hechos por otras células [18]. En este contexto, el factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) es una citocina, descrita inicialmente como un factor soluble producido por linfocitos que inhibía la migración aleatoria de los macrófagos *in vitro* [19]. Se propuso, entonces que MIF mediaba la reacción de hipersensibilidad retardada que involucraba a los macrófagos [6,7,18,20]. Ahora se sabe que MIF también participa en los procesos de activación de los macrófagos para mejorar su metabolismo [18,20,21], para eliminar tumores celulares, bacterias y parásitos. MIF, al igual que otras citocinas exhibe funciones endocrinas, parácrinas, autócrinas y posiblemente enzimáticas [18,22-24].

MIF se produce en diferentes tejidos celulares [18,25,26], pues Lanahan y *col.* encontraron que cDNA de MIF en cerebro, corazón, intestino, hígado, riñón, pulmón, ovarios, vesículas seminales, bazo, testículos, timo, útero [27] e incluso en células diferenciadas de los lentes oculares [18]. Subsecuentemente, se demostró que los macrófagos son una fuente importante de MIF y la activación de los macrófagos por el lipopolisacárido (LPS) y/o TNF- α inducen la liberación de MIF, y MIF incrementa de vuelta la liberación de TNF- α . Un hallazgo fascinante es el que los glucocorticoides, generalmente conocidos por amortiguar la inflamación, inducen la liberación de MIF, y que MIF regula negativamente la acción de los glucocorticoides, disminuyendo su acción antiinflamatoria [18].

En el humano el gen para MIF (*MIF*) se encuentra en el cromosoma 22q11.2., el gen MIF aparece constitutivamente expresado a nivel basal en casi todo los tipos celulares;

sin embargo, su expresión puede ser altamente regulada por diversos estímulos activadores. MIF consiste de 114 aminoácidos combinados en una estructura [18,26].

Cristalografías radiográficas ha demostrado que MIF es un homotrímero de subunidades idénticas. Cada monómero contiene dos hélices antiparalelas α y seis láminas β . Tres de las láminas β están rodeadas por seis hélices antiparalelas α y forman una estructura de forma central de barril con terminaciones abiertas. La estructura incluye un canal de 4-15 Å de diámetro que corre a través del centro de la proteína a lo largo del eje de una molécula y consiste principalmente de átomos hidrofílicos cargados positivamente, sugiriendo que esta interactúa con moléculas negativamente cargadas. Aunque esta estructura es homóloga al 4-oxalocronato tautomerasa y 5-carboximetil-2-hidroximuconato isomerasa, es única entre las citocinas y mediadores hormonales, lo que sugiere que MIF participa en nuevas interacciones como ligando-receptor [26,28,29].

3.6.2. MIF en la inmunidad. MIF tiene un papel central en la activación autócrina/parácrina de los macrófagos [18], promueve la expresión de TNF- α por macrófagos llevando a la liberación adicional de MIF, produciendo una “re-entrada” en la activación de la vía que es necesaria para una óptima expresión de TNF- α en los macrófagos.

Lo relevante de MIF, en las funciones proinflamatorias, es que la proteína está preformada en vesículas citoplasmáticas en los macrófagos (y otras células), y este es rápidamente liberado en respuesta a productos microbianos [18,30-32], lo cual hace a MIF diferente de otras citocinas de monocitos/macrófagos que requieren una activación transcripcional y la traslación de mRNA antes de que pueda ocurrir la liberación.

Las acciones inmunológicas de las citocinas derivadas de monocitos/macrófagos como TNF- α e IL-1 β se encuentran bien identificadas, y su papel en las respuestas patológicas corroboran su exitoso objetivo terapéutico [18].

Estudios en una gran variedad de sistemas experimentales de la última década, han demostrado que la acción de MIF es la de promover la producción de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ) [18,33-40], óxido nítrico [18,37], y metaloproteinasa de matriz [18,41] y PGE2 [18]. Todas estas tareas de alto rango han sido ligadas a una amplia acción contrareguladora de MIF sobre la supresión de los glucocorticoides de las respuestas celulares [18,22,23,34,42].

Su estructura tridimensional y su acción como proteína son únicas; su posible receptor (CD74) es distinto de otras superfamilias de receptores de citocinas [18,43]; y sus propiedades de señalización de bajo nivel o rango, los que involucran una sostenida

activación de ERK-1/2 [18,43], y la regulación de JAB1 [18,44] y de la actividad de transcripción de p53 [18,24,45,46], reflejan actuaciones más centradas hacia la regulación del crecimiento celular, apoptosis y el control del ciclo celular que aquél de la transducción de las señales inflamatorias [18].

3.6.3. Mecanismos inmunopatológicos relevantes a enfermedades. MIF es una citocina pleiotrópica que media un número de enfermedades inmunes e inflamatorias que incluyen choque séptico [18,22,30,32], artritis reumatoide (RA) [18,47,48], hipersensibilidad del tipo retardada (DTH)[18,49], síndrome de distrés respiratorio agudo (ARDS) [18,50], glomerulonefritis [18,24,51] y cáncer [18,45]. MIF es producido durante la respuesta inmune por las células T activadas, macrófagos y una variedad de células no inmunológicas. La expresión constitutiva de mRNA de MIF y de la proteína se encuentra en varias células no inmunológicas en tejido normal, así como en células de la pituitaria anterior; miocitos cardíacos; células vasculares; células parenquimales que se encuentran en el hígado cerebro, riñones y en células de los islotes pancreáticos. Se ha observado que MIF sobre regulado y liberado bajo varias condiciones patológicas, así como choque séptico, enfermedades infecciosas, ARDS, lesiones cardíacas de isquemia, aterosclerosis, esclerosis múltiple, colitis, diabetes tipo 2 y pancreatitis [18].

3.6.4. Mecanismos de MIF en la regulación de enfermedades inmunes mediadas por células T. MIF es producido por las células T y participa en la respuesta inmune mediada por células T en varias enfermedades inmunológicamente inducidas.

Las células T producen MIF, y cuando MIF es sobre regulado en los tejidos enfermos, es asociado con la severidad de la de la patología [6,7,18].

Los hallazgos donde las células T liberan MIF en respuesta al estímulo de los glucocorticoides, MIF actúa sobrellevando la inhibición de los glucocorticoides [22,34,42,50] favoreciendo así la proliferación y activación de las células T para producir citocinas del tipo Th-1 incluyendo IL-2 e IFN- γ [52], esto indica que MIF actúa junto con los glucocorticoides controlando la proliferación y activación de las células T, y participa en las respuestas inmunes-antígeno específicas [18].

La proliferación y activación de las células T está también implicada en el desarrollo de la diabetes de tipo autoinmune experimental, la cual es dependiente de MIF. MIF está significativamente elevada en las células de los islotes de Langerhans durante el desarrollo de la diabetes. Cuando se bloquea la actividad de MIF, se producen efectos inhibitorios marcados sobre la hiperglicemia e insulinitis, asociadas a la inhibición de las respuestas proliferativas-antígeno específicas para las células T en los islotes [18].

3.6.5. MIF como mediador de la respuesta inmune innata. Los macrófagos son las principales células productoras de MIF tanto en condiciones fisiológicas como patológicas [18,49]. En los macrófagos se encuentran concentraciones significativas de la proteína MIF en las vesículas intracelulares. MIF juega un papel importante en la activación parácrina y autócrina de los macrófagos, los cuales fagocitan partículas ajenas así como parásitos patógenos [18].

Una vez liberado, MIF puede actuar en ambas maneras, parácrina y autócrina para activar respuestas críticas proinflamatorias en los macrófagos, células T y muchas otras células intrínsecas tejido/órganos de una patología. Por lo que MIF resulta ser una llave mediadora de la respuesta inmune innata mediada por macrófagos [18].

Se ha visto que MIF directamente o indirectamente promueve la expresión o la producción de un gran elenco de moléculas proinflamatorias incluyendo citocinas (TNF- α , INF- γ , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8) [7,18,32-35,37] y proteína inflamatoria de los macrófagos 2), óxido nítrico [18,30,37], COX2 [18,53] y productos de la vía del ácido araquidónico (como PGE2), por macrófagos [18]. En adición TNF- α e INF- γ , son también fuertes inductores de la producción de MIF por macrófagos [18]. Después de que MIF es liberado en el tejido o en la circulación, este actúa como una clásica citocina pro-inflamatoria que promueve la respuesta inmune innata a través de la activación de los macrófagos.

3.6.6. MIF en patologías inflamatorias e inmunológicas. A diferencia de las citocinas proinflamatorias IL-1 y TNF- α que son inducibles, MIF está preformado y almacenado en el citoplasma de macrófagos y otras células intrínsecas del cuerpo, incluyendo el eje de la pituitaria adrenal del hipotálamo (HPA). MIF es liberado durante la estimulación por estrés, endotoxinas, exotoxinas, infección y estímulos inflamatorios e inmunológicos. Una vez liberado MIF, actúa como una citocina proinflamatoria que induce la expresión de otras citocinas proinflamatorias e iNOS que promueven las respuestas inflamatorias e inmunológicas. A diferencia de otras citocinas proinflamatorias que generalmente son suprimidas por los glucocorticoides, se ha propuesto a MIF como un contraregulador fisiológico de la acción de estos dentro del sistema inmune.

MIF es secretado en respuesta a los glucocorticoides en monocitos, células T, islotes pancreáticos, células neuronales y fibroblastos sinoviales. Estados de estrés, inflamación y respuestas inmunológicas estimulan y promueven la liberación de MIF, que activa la cascada de citocinas inflamatorias para sobrellevar la función fisiológica de los glucocorticoides como una consecuencia de la activación aguda del eje de la pituitaria adrenal del hipotálamo (HPA)[18].

Por otra parte la activación de NF- κ B, es posiblemente otro mecanismo por el cuál MIF puede modular la respuesta inflamatoria y contraregular los efectos de los glucocorticoides en la inhibición de la expresión de las citocinas proinflamatorias.

NF- κ B es un regulador importante de la expresión génica de los citocinas inflamatorias y varios estudios sugieren que los glucocorticoides pueden inhibir la producción de mediadores inflamatorios como TNF- α e IL-1 β , mediante la modulación de la actividad de NF- κ B [18].

En resumen, MIF es un factor que puede ser producido en condiciones de estrés, por una citocina inflamatoria, un factor de crecimiento y/o una hormona en casos tanto de condiciones fisiológicas cómo patológicas. MIF juega un papel importante en muchas enfermedades, incluidas la sepsis, enfermedades infecciosas e inflamatorias, enfermedades autoinmunes, rechazo de injertos, aterosclerosis y cáncer. MIF actúa por medio de diversos mecanismos para mediar las enfermedades, incluyendo la inmunidad innata y adaptativa, la inducción de citocinas, quimiocinas y moléculas de adhesión, interacciones con glucocorticoides y el eje HAP, influye sobre la proliferación celular, apoptosis, fagocitosis y otras funciones celulares [18].

La activación de los macrófagos es un componente central en el proceso inflamatorio, resultando en la elaboración de citocinas proinflamatorias tales como MIF, que promueven una inducción de la respuesta inflamatoria de fase aguda. En varios estudios de DM-2 ha sido demostrado que esta activación de los macrófagos esta particularmente afectada [54].

4.-JUSTIFICACIÓN

MIF posee características biológicas que anticipan una posible participación de esta citocina en la generación de la DM-2; posiblemente un mediador importante en los acontecimientos iniciales de la disfunción a la susceptibilidad de la insulina, además de ser una molécula que favorece la producción de otras citocinas inflamatorias y mediadoras solubles implicados en la patogénesis de la enfermedad como TNF- α , IL-1- β , INF- γ y óxido nítrico (NO) [55]. Es de relevancia mencionar que estas citocinas inducen sinérgicamente al incremento de la producción de óxido nítrico a través de un incremento en la expresión incrementada de óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), dónde éste último puede representar otro mecanismo molecular de inflamación mediada por citocinas ligadas a la resistencia a la insulina, por lo que la modulación de las rutas inflamatorias promueven un nuevo blanco terapéutico para el tratamiento de la resistencia a la insulina en el padecimiento de la DM2.

5.-HIPÓTESIS

Dado que MIF posee características que lo califican como un posible mediador de la resistencia a la insulina en la DM-2, nosotros creemos que:

- MIF favorece la respuesta inflamatoria (TNF- α , IL-1 β) y facilita la génesis de la DM-2, e hiperglucemia. La ausencia del gen que codifica para MIF disminuye la patología en la DM-2 inducida en el modelo murino propuesto en este trabajo.

6.-OBJETIVOS

Objetivo general

Estudiar la participación de MIF en la génesis y patología de la DM-2 usando un modelo murino de diabetes mellitus de progreso lento no dependiente de insulina (tipo 2).

Objetivos particulares

1. Desarrollar un modelo de DM-2 en ratones con fondo genético BALB/c.
2. Desarrollar un modelo de DM-2 en ratones con fondo genético BALB/c con delección para el gen que codifica para MIF.
3. Determinar los niveles de insulina en sangre de ratones diabéticos inducidos con STZ deficientes para el gen MIF y no deficientes.

4. Determinar los niveles de glucosa en sangre de los ratones diabéticos inducidos con STZ deficientes para el gen MIF y no deficientes.
5. Establecer si existe una correlación entre los niveles detectados de glucosa e insulina plasmática con la presencia o ausencia de MIF.
6. Determinar los niveles de citocinas TNF- α , IL-1 β , y resistina en los grupos experimentales mencionados.
7. Determinar cambios en la morfología de los islotes de las células pancreáticas en los grupos experimentales.

7.-MATERIALES Y METODOS

7.1.-Animales. Se utilizaron en todos los experimentos ratones machos de ocho semanas de edad BALB/c MIF^{+/+} y MIF^{-/-}, que fueron criados en sistemas de cajas aislados en un cuarto con aire acondicionado a 23 ± 1 °C, los animales fueron proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala (UNAM).

7.2.-Determinación del genotipo de los animales experimentales utilizando PCR (polimerase chain reaction). **7.2.1.-Extracción de ADN.** Se genotiparon ratones MIF^{+/+} y MIF^{-/-}, cómo control se utilizaron ratones MIF^{+/+}. Utilizando siempre guantes, material nuevo, estéril y libre de DNAsas-RNAsas se obtuvo aproximadamente 0.05 cm de la parte final de la cola de los ratones experimentales, se llevó a cabo la digestión en tubos de 1.5 ml (Eppendorf) previamente identificados en dónde se colocó el tejido con 500 µl de proteinasa K (in vitrogen 100 µg/ml) durante toda la noche o mínimo 6 horas en un incubador a 55 °C.

Posteriormente se centrifugó a 8,000 rpm durante 10 minutos, se tomó el sobrenadante con micropipeta y se colocó en tubos de Eppendorf con 500 µl de isopropanol frío, se homogenizó invirtiéndolos de manera suave hasta que la precipitación del ADN fue evidente. Se centrifugó a 14,000 rpm por cinco minutos, se dejó evaporar el etanol a temperatura ambiente, por lo menos una hora. El botón de ADN, se secó y resuspendió en el tubo con 200 µl de agua grado biología molecular (Sigma), para nuevamente incubarlo toda la noche a 55 °C.

Cuantificación de ADN (doble cadena): Esta parte se realizó utilizando una dilución 1:200 de muestra de ADN en agua grado biología molecular. Se calibró con agua el espectrofotómetro (Jenway, Génova) y se leyeron las muestras a 260 y 280 nm. La relación A₂₆₀/A₂₈₀ se empleó para determinar la pureza del ADN obtenido vs proteína. La concentración final de ADN se obtuvo utilizando la lectura A₂₆₀ por la dilución con el factor de 1 D.O=40 mg/ml.

Las muestras se ajustaron a la concentración de 16 µg/ml. Una vez ajustado a esta concentración, se toman 2.5 µl (40 ng de ADN) para el PCR.

7.2.2.-Amplificación del gen (PCR). Para el reconocimiento del gen para el Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF) se utilizaron los primers específicos (F) AgA CCA CgT gCT TAg CTg Ag; (R) gCA TCgCTA CCg gTg gAT AA (200pb).

Para el reconocimiento del gen de inserción (NEO), se utilizaron los primers específicos (F) ATT gAA CAA gAT ggA TTg CAC, (R) CgT CCA gAT CAT CCT gAT (500pb).

En este proceso se utilizaron tubos nuevos libres de DNAsas-RNAsas con capacidad para 0.2ml, en los cuales con un volumen final de reacción de 25µl se colocaron los siguientes reactivos en orden:

Reactivo	Para MIF	Para NEO
Buffer 10x	2.5µl	2.5µl
MgC12 (50mM)	0.75µl	0.75µl
dNTP's mix (10mM) in vitrogen	0.5µl	0.5µl
Primer F (15pM)	7.5µl	3µl
Primer R (15pM)	6.34µl	3µl
ADN Taq polimerasa (5U/µl) (Platinum in vitrogen)	0.25µl	0.25µl
Agua (Sigma)	4.66µl	12.5µl
Muestra ADN	2.5µl	2.5µl

Una vez que se obtuvieron los tubos rotulados y con los respectivos reactivos, se sometieron al siguiente programa con 35 repeticiones en el termociclador (Corbett Research) con una temperatura de alineación de 60 °C.

7.2.3.-Electroforesis. Se utilizó un gel de agarosa (ICN Biochemicals) 1.5% en buffer TBE 1x (apéndice 1). Una vez hecho el gel se colocó una muestra de los productos de PCR de 5µl del amplificado con 3 µl de Sybr-Green (1:1,000) (In vitrogen) a partir del segundo pozo ya que en el primero se colocó 2 µl del marcador de peso molecular 100 pb (In vitrogen). Se colocaron las muestras en la cámara en el extremo y se corrió a 90 Voltios, 45 Amperes durante 45 minutos. Se observó en un transiluminador para fluorescencia (Fugifilm).

7.3.-Inducción de diabetes. La diabetes puede ser inducida por diversos factores, entre los cuales se encuentran los fármacos; un claro ejemplo es el empleo de drogas tóxicas y dañinas para los órganos del cuerpo, en este caso para el páncreas [10].

La estreptozotocina (STZ; N/nitroso derivado de la glucosalina) es un antibiótico de amplio espectro extraído de *Streptomyces acromogenes*, es un antibiótico antitumoral del grupo de las nitrosoureas. Su indicación principal es para tumores de islotes celulares pancreáticos [56]. Esta es una toxina para la región pancreática que induce necrosis rápida e irreversible de las células β [57].

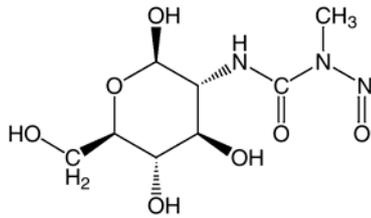


Fig 3. Estructura molecular de la estreptozotocina

Dosis intraperitoneales repetidas de esta droga (STZ) son utilizadas para generar en los ratones modelos experimentales de diabetes mellitus dependiente de insulina (DM-1) [58,59]. Mientras que una única dosis de STZ (165 mg/Kg) i.p. en ratones BALB/c genera diabetes de progreso lento no dependiente de insulina (NIDDM o DM-2) [60]. En este trabajo se utilizó este último (DM-2). Brevemente, se disolvió la STZ en un buffer de citratos 0.05M, pH de 4.5. Los ratones MIF^{-/-} y MIF^{+/+} ambos con fondo genético BALB/c recibieron una inyección i. p. con un volumen equivalente de STZ en el buffer de citratos.

7.4.-Glucosa, insulina y otras citocinas (TNF- α y resistina). En orden de esclarecer las características de la diabetes progresiva en dos grupos de ratones (MIF^{-/-} y MIF^{+/+}), seguimos los cambios en la concentración de la glucosa en suero después de la administración de la STZ. Se tomaron muestras de ambos grupos de ratones (MIF^{-/-} y MIF^{+/+}), que recibieron la dosis de STZ a 1, 3, 5, 7, 9 y 12 semanas después de haber sido inyectados, esto, para la determinación de la glucosa en sangre e insulina. Para la medición de glucosa en sangre, insulina y niveles de citocinas, se determinaron por medio de los siguientes reactivos comerciales: ELISA Insulin Kit (Morinaga Seikagaku Industries, Ltd, Tokio) y TNF- α y Resistina (Peprotech México).

7.5.-Evaluación clínica. El peso de los animales fue medido inmediatamente después del examen sanguíneo, los animales fueron resguardados individualmente en cajas metabólicas por 24 horas, se les midió el consumo de agua y de alimento.

7.6.-Histología. En orden de esclarecer las características de la diabetes progresiva en los dos grupos de ratones (MIF^{-/-} y MIF^{+/+}) seguimos los cambios morfológicos de los islotes (el número de las células α y β) después de la administración de la STZ. Dos de los ratones serán sacrificados en una cámara de cloroformo y su páncreas fue removido en 6 y 12 semanas después de la administración de la STZ. El páncreas fue puesto en un buffer al 10% de formalina y después fué embebido en parafina. Dos secciones consecutivas (grosor de la sección 5- μ m) del bloque de parafina, fueron cortadas. Los cortes fueron teñidos por medio del

método de Hematoxilina-Eosina para observar las células de los islotes pancreáticos, para dar un análisis de infiltración celular hacia los islotes y ver el grado de destrucción de los mismos.

7.7.-Prueba de tolerancia a la glucosa. Con esta prueba determinamos en ambos grupos experimentales la capacidad de respuesta de la insulina a una carga de glucosa oral. Esta prueba fue realizada a la semana 6, después de inducción con STZ. Se prepararon los ratones con un ayuno de al menos de 5 horas, se les tomo sangre 30min antes de la prueba, entonces se les dió 2g/kg de glucosa en solución, vía intraperitoneal. Por último, se les volvió a tomar muestras sanguíneas a la 1^a, 2^a, y 4^a horas después de haberles dado la glucosa en solución. Con las muestras sanguíneas se realizaron pruebas de glucosa en suero y se midieron los niveles de insulina.

7.8.-Determinación de los niveles de citocinas empleado en la técnica de ELISA (sándwich). Se obtuvo sangre por goteo con un ligero corte en la vena caudal de cada uno de los ratones experimentales MIF^{+/+} en las semanas 0, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 posinducción; y se analizó la producción de TNF- α , IL-1 β y resistina. Se utilizaron anticuerpos de la marca Preprotech (México).

7.8.1.-Sensibilización de la placa. Se diluyó el cuerpo de captura a una concentración de 2 μ g/ml en el buffer de pegado (apéndice 1) se homogenizó y se colocaron 100 μ l por pozo utilizando una micropipeta multicanal (pipet lite) en una placa para ELISA de 96 pozos (NUNC, Maxisorp). Para que se llevara a cabo la relación de pegado del anticuerpo a la placa, esta última se cubrió con papel aluminio e incubó a 4 °C toda la noche para prevenir la evaporación.

7.8.2.-Muestras y curva. Al día siguiente se lavó tres veces con la solución de lavado (apéndice 1), se secó por aspiración y, ya sea durante una hora a 37 °C o, dos horas a temperatura ambiente se bloqueó el pegado inespecífico con 200 μ l de solución de bloqueo (apéndice 1), después se lavó tres veces y se secó por aspiración.

Se utilizaron muestras de 25 μ l de sobrenadantes de cultivos celulares y de suero, colocándolos en los pozos correspondientes para las muestras, posteriormente para poder extrapolar los valores de densidad óptica, se realizó una curva patrón con la correspondiente citosina recombinante murina, con diluciones al doble para cada una de las placas y se utilizaron las dos primeras líneas de cada placa diluidas en solución de bloqueo. Las curvas se 1°C.

7.8.3.-Revelado del ELISA. La placa se llevó a temperatura ambiente, se lavó cuatro veces y se secó por aspiración para adicionar el anticuerpo correspondiente a cada citocina marcado con biotina en un volumen de 100 µl por pozo de dilución de 1µg/ml de anticuerpo con biotina en solución de bloqueo, se incubó por una hora a 37 °C. Terminado el tiempo de incubación se lavó cuatro veces la placa y se secó por aspiración.

Se preparó una dilución de 1:5,000 de enzima streptoavidin peroxidasa (Amersham Biosciences) en solución de bloqueo. Se adicionó 100 µl por pozo para dejar incubar las placas por 35 minutos a temperatura ambiente.

Por último se lavó 7 veces la placa después de la incubación con la enzima, se preparó la solución del sustrato 100 µl de H₂O₂ al 3% (J. T. Baker, Miriam) en 10 ml de ABTS (apéndice 1) para poner 100 µl por pozo, esperar 10 minutos y llevarlo al lector de placa (Termo Labsystems, Multiscan AFCENT) utilizando un filtro de 405 nm de longitud de onda.

7.9.-Análisis estadístico. Los resultados obtenidos según el significado \pm SEM. Los datos serán analizados usando un estadístico no paramétrico (análisis de ANOVA) y una $p < 0.05$ se considerará significativa.

7.10.-Alcance de la investigación. Correlacional.

7.11.-Diseño. Pos-test con grupo control y grupo K.O., longitudinal.

7.12.-Fórmula

R1	MIF+/+ x STZ	01 día	02 día	... 12 día
R2	MIF+/+ x buffer	01 día	02 día	... 12 día
R3	MIF-/- x STZ	01 día	02 día	... 12 día
R4	MIF-/- x buffer	01 día	02 día	... 12 día

Donde R = aleatorización de los sujetos (ratones)

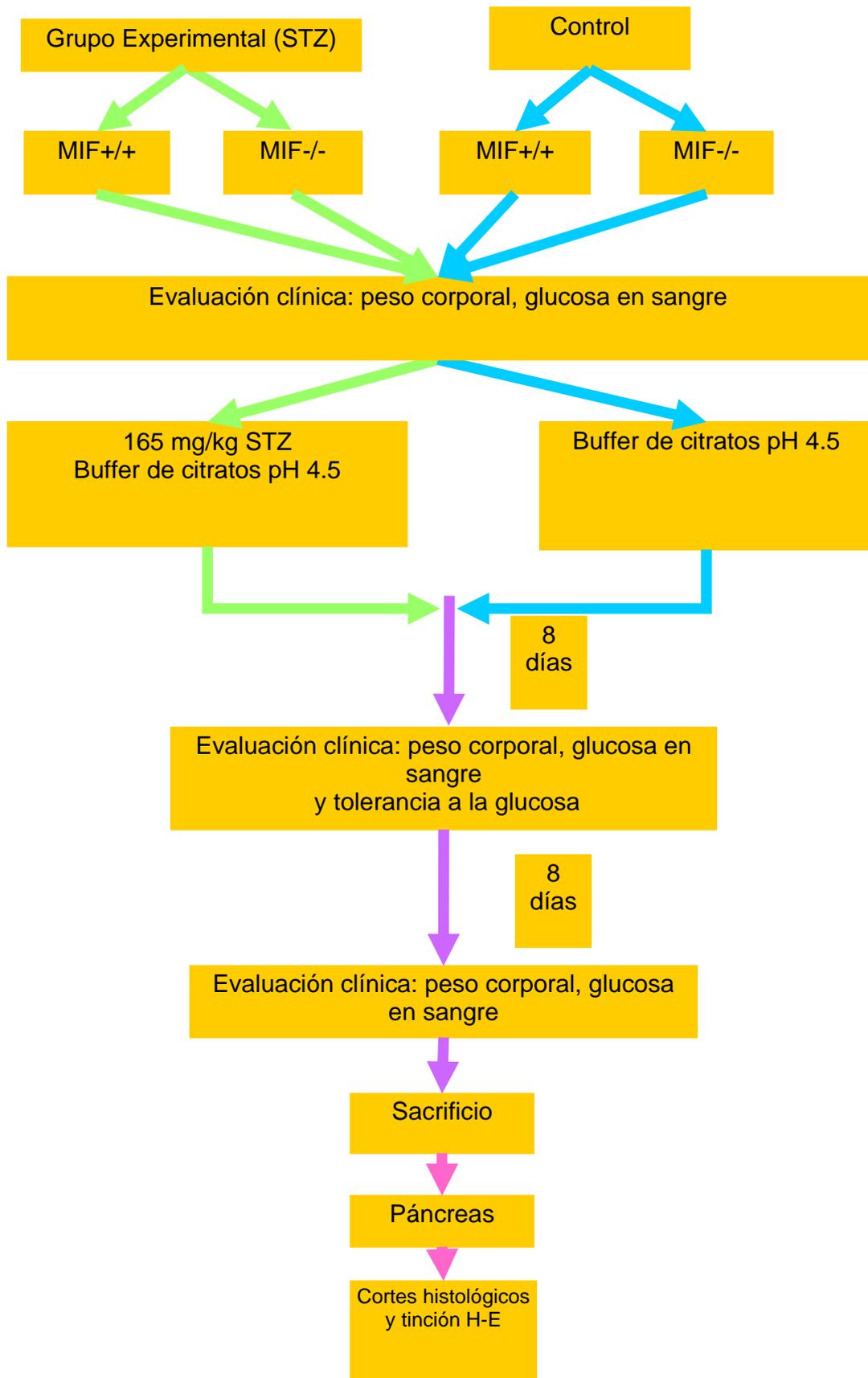
MIF +/+ ratones silvestres

MIF -/- ratones deficientes para el gen MIF

X Manipulación de la variable (Provocar diabetes con STZ) por eso es experimental

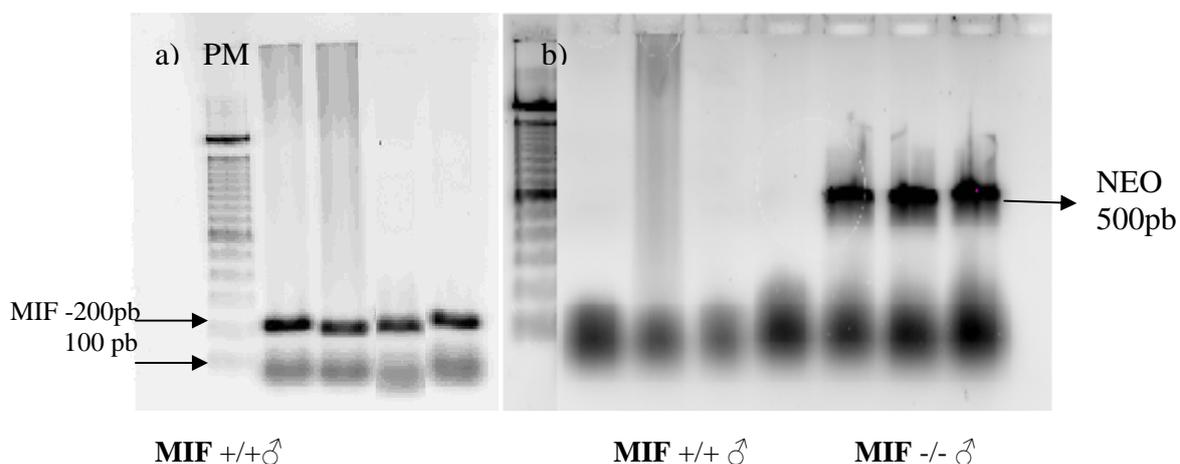
O1 O2 O3 O4 O5 O6 Observaciones o mediciones de las variables involucradas o de interés. Como se hacen varias (cada semana) es longitudinal.

7.13.-MATERIAL Y METODOS



8.-RESULTADOS

Genotipo de ratones MIF^{-/-} por PCR. La determinación de la electroforesis del gel muestra la amplificación del gen que codifica para MIF en los ratones silvestres (MIF^{+/+}) y para los ratones deficientes para el gen MIF la expresión del gen de inserción NEO (MIF^{-/-}).



Determinación de peso, glucosa y células sanguíneas

Peso de los ratones MIF^{+/+} vs MIF^{-/-} inducidos a DMT-2.

Durante el proceso del proyecto se apreciaron cambios clínicos significativos entre los ratones tratados con STZ y los ratones no tratados (Ctrl).. Como se puede apreciar en la fig. 5, uno de los aspectos fisiológicos que saltó a la vista, fue el poco peso ganado por los ratones MIF^{+/+} y MIF^{-/-} tratados con STZ con comparado sus respectivos controles respectivos (MIF^{+/+} y MIF^{-/-}-Ctrls) en ambos casos la significancia estadística fue menor a $p < 0.05$. Por otro lado, fue de llamar la atención que la pérdida de peso en los ratones MIF^{-/-}-STZ no fue tan drástica como en los MIF^{+/+}-STZ, la diferencia entre estos dos grupos fue estadísticamente significativa desde la semana 3 post-inducción. Estos resultados concuerdan con la gráfica de niveles de glucosa mostrada más adelante.

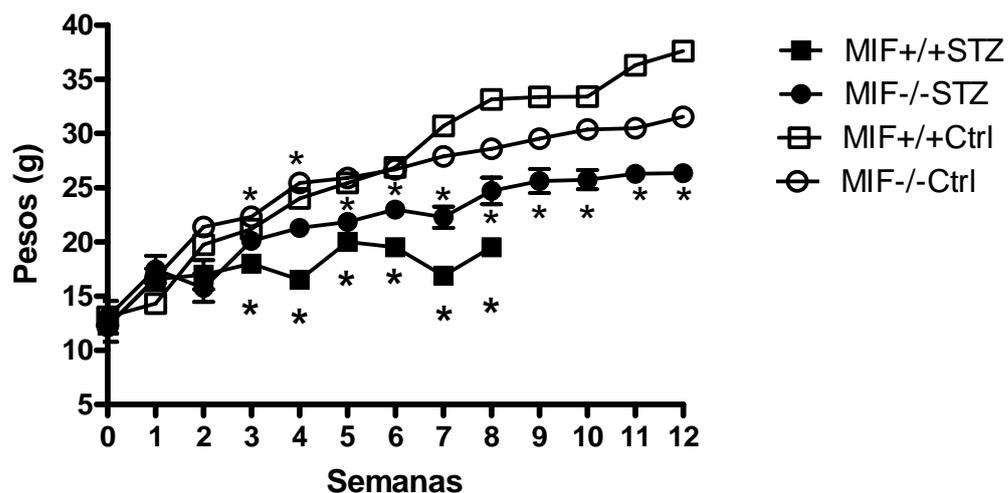


Figura 5. Promedio de pesos de los grupos experimentales. Grafica que muestra la relación de pesos de ambos grupos tomados semanalmente de antes de la inducción (tiempo cero) hasta la semana 12 después de la inducción con STZ. n=8 t de student $p < 0.05$.

Los monocitos de sangre periférica se ven disminuidos en los ratones deficientes para MIF.

Cuando analizamos las células de sangre periférica al microscopio en frotis sanguíneos a los 7, 14 y 21 días post-inducción de ambos grupos observamos durante la segunda semana, un aumento en la cantidad de monocitos y en los neutrófilos de los ratones MIF+/+STZ comparados con los ratones MIF-/-STZ (Figura 6 y 7). No encontramos diferencias estadísticamente significativas en los porcentajes de otras células, como se puede observar en la tabla 2.

TABLA 2: Conteo porcentual de células sanguíneas a los 14 días post-inducción con STZ

	%linfocitos	%monocitos	%neutrófilos	%basófilos	%eosinófilos
MIF+/+	68.75	3.75	25	0.62	1.87
MIF-/-	68	2	22	0.57	1
MIF+/+STZ	51	9	35	4	3
MIF-/-STZ	54	8	22	2	1

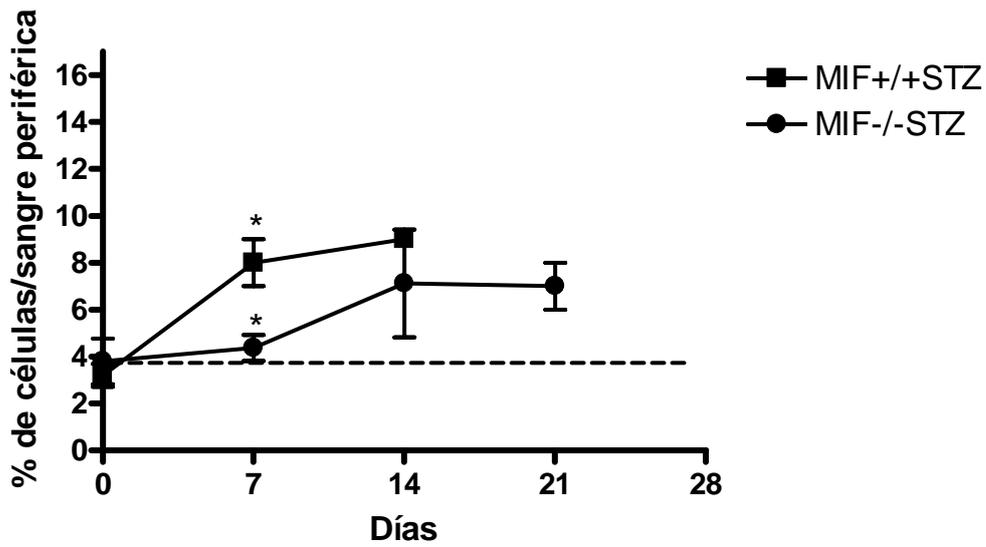


Figura 6. Cuenta de monocitos. Porcentajes de células monocitos en sangre periférica de ratones MIF+/+STZ y MIF-/-STZ.

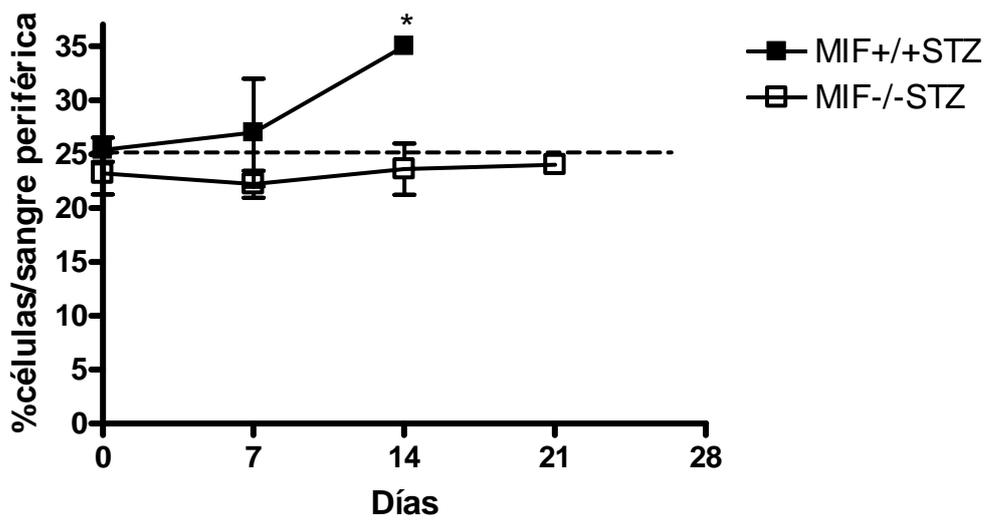


Figura 7. Cuenta de neutrófilos. Porcentajes de células neutrófilos en sangre periférica de ratones MIF+/+STZ y MIF-/-STZ.

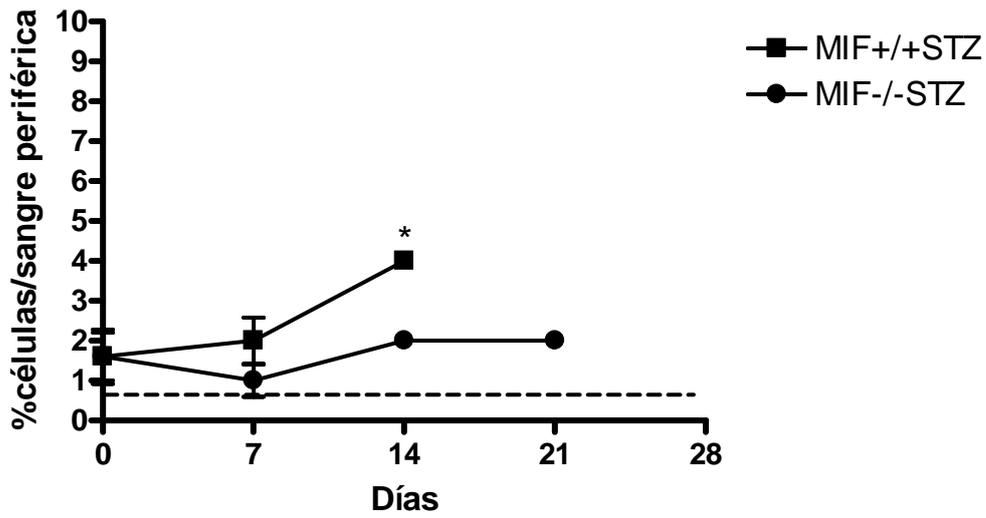


Figura 8. Cuenta de basófilos. Porcentajes de células basófilas en sangre periférica de ratones MIF+/+STZ y MIF-/-STZ.

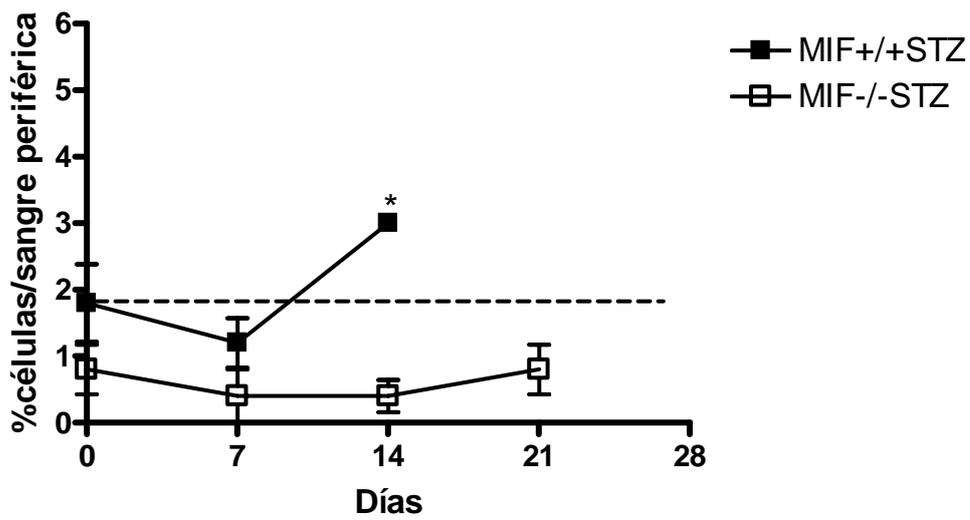


Figura 9. Cuenta de eosinófilos. Porcentajes de células Eosinófilas en sangre periférica de ratones MIF+/+STZ y MIF-/-STZ.

La ausencia de MIF evita parcialmente el incremento de glucosa en sangre.

Los niveles de glucosa en sangre de los ratones MIF^{+/+}STZ fueron altos desde la primera semana post-inducción (475 $\mu\text{g}/\text{dl}$) incrementándose paulatinamente hasta (550 $\mu\text{g}/\text{dl}$) hasta alcanzar niveles de glucosa por arriba de los 600 $\mu\text{g}/\text{dl}$, en algunos ejemplares el glucómetro indicaba una leyenda “HI” por sus siglas en inglés “alto”.

Por otro lado los ratones MIF^{-/-} inducidos con STZ, aún cuando desarrollaron hiperglucemia, nunca alcanzaron niveles de glucosa tan altos como los detectados en los ratones MIF^{+/+}. Los datos se muestran en la figura 10, además estos valores se comparan con los de ratones MIF^{+/+} control (sin STZ).

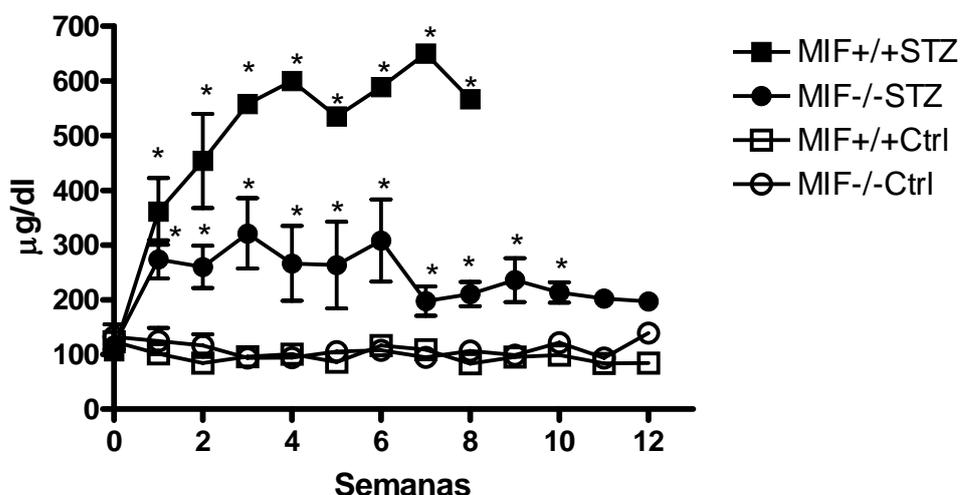


Figura 10. Determinación semanal de glucosa en sangre. Niveles de glucosa en sangre ($\mu\text{g}/\text{ml}$), donde el grupo de ratones MIF^{+/+}STZ desarrollaron niveles altos de glucosa mientras que los niveles de glucosa de los MIF^{-/-}STZ, estuvieron por debajo de estos. Los niveles de glucosa de los grupos control fueron constantes a lo largo de las 12 semanas. Esta gráfica es el promedio de 3 experimentos con una $n = 8$. Prueba estadística t de student, $p < 0.05$.

Sobrevida. Es evidente que a pesar de que ambos grupos experimentales se les indujo para el mismo tipo de diabetes (DM-2), el grupo de los ratones experimentales MIF^{-/-}STZ fueron mas resistentes a la patología, sobreviviendo el 62.5% mientras que los ratones MIF^{+/+}STZ fallecieron casi todos durante las primeras 2 semanas, siendo el 8.3% de la población total que logra sobrevivir hasta la semana número 9, y para la semana 10 finalmente fallecieron todos los integrantes del grupo antes mencionado (fig11).

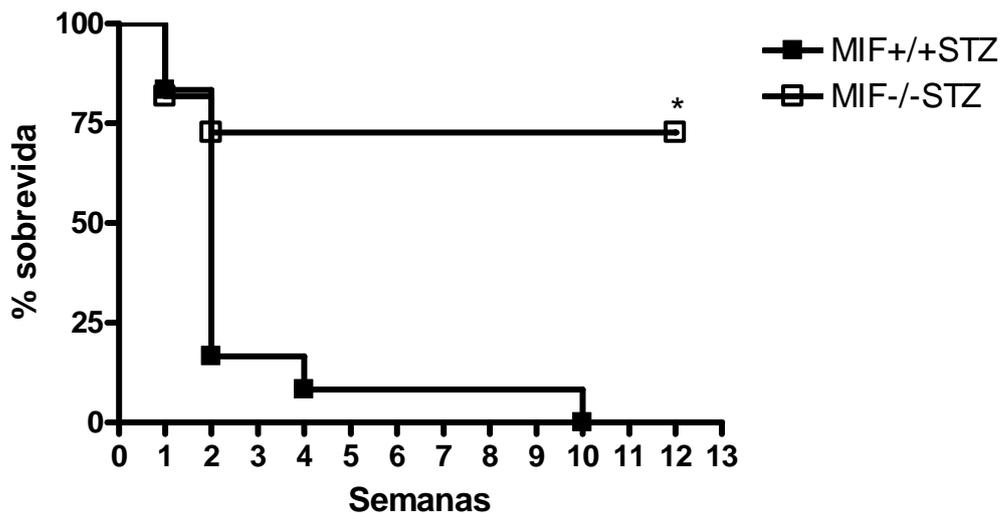


Figura 11. supervivencia de los ratones MIF+/+ y MIF-/- inducidos con STZ. Valores porcentuales de supervivencia de los grupos experimentales MIF+/+ (0% sobrevivientes) y MIF-/- (62.5% sobrevivientes). MIF-/- es menos susceptible a la patología de la DM2. La n es de 13 por grupo y se utilizó la prueba estadística de log Rank.

Pruebas de tolerancia a la glucosa. En las pruebas de tolerancia a la glucosa se pudo observar que el grupo que siempre obtuvo las mejores respuestas ante la prueba fueron los ratones pertenecientes al grupo MIF-/. Durante la 1ª prueba de tolerancia las diferencias entre los dos grupos experimentales no difiere mucho y por lo tanto sin nivel de significancia.

En el lapso de la segunda semana ambos grupos responden igual al estímulo, pero después de la 3ª hora, el grupo de los ratones MIF+/+ empezó a elevar sus niveles de glucosa drásticamente, comparados con los de los ratones MIF-/-.

Por último en la prueba de tolerancia, ambos grupos ya presentaba diferencias significativas en cuanto a los niveles de glucosa en sangre, con el transcurso de las horas, se mostraron cambios leves en el grupo MIF-/-, mientras que en el grupo MIF+/+ mantuvo una constante alza en los niveles de glucosa en sangre, manteniéndose en un rango de entre 600 µg/dl y los 650 µl/dl de glucosa en sangre.

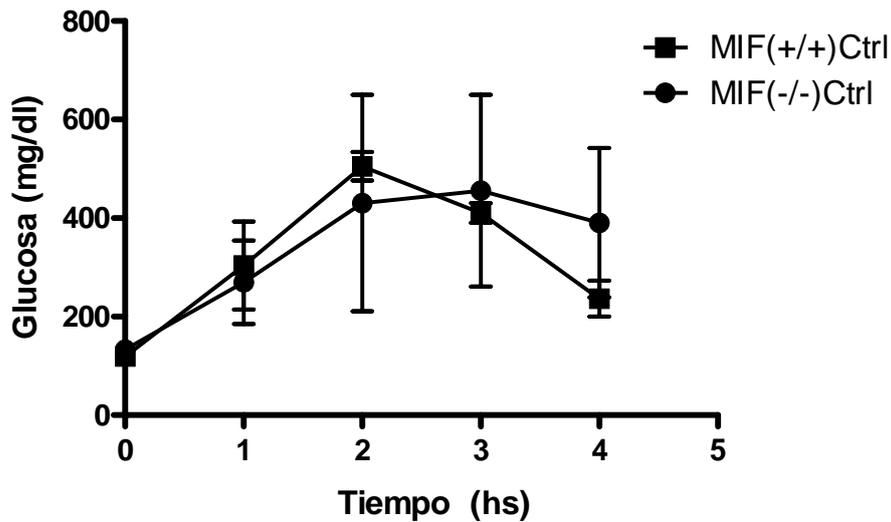


Figura 12. Tolerancia a la glucosa en los grupos control. Primera prueba de tolerancia a la glucosa, pre-inducción con STZ, en esta prueba no se observan diferencias significativas en ambos grupos MIF+/+ y MIF-/- . n=8 t de student p<0.05.

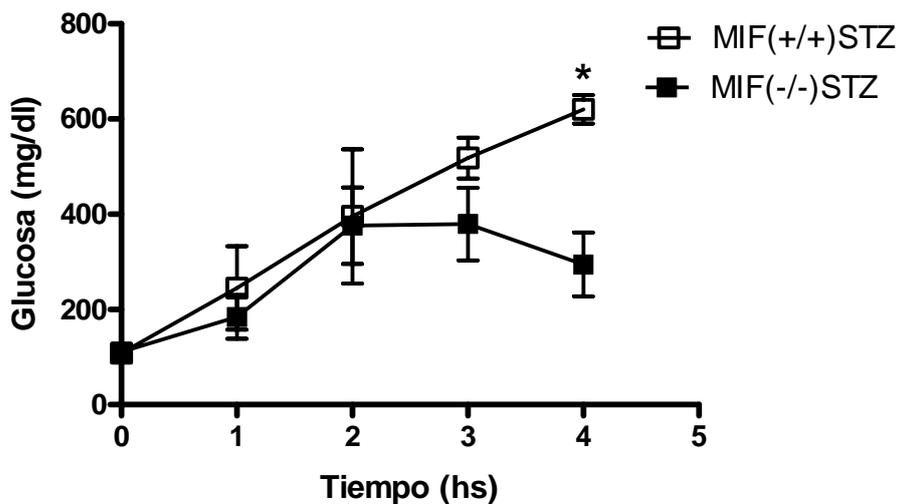


Figura 13. Tolerancia a la glucosa en los grupos inducidos con STZ. Realizada después de la 1ª semana pos-inducción dónde ya se perciben las diferencias en los niveles de glucosa de los grupos, siendo los de MIF+/+ mas altos que los de MIF-/-

Determinación de TNF- α por ELISA. Los resultados para esta prueba muestran significativamente la diferencia que tienen ambos grupos para los niveles de TNF- α en suero sanguíneo, dónde los ratones MIF-/- tuvieron niveles reducidos de TNF- α , mientras

que los MIF^{+/+} lo presentan en grandes cantidades, ambos fueron comparados con los niveles de TNF- α de un grupo MIF^{+/+} (sin STZ). n=8 t de student p<0.05.

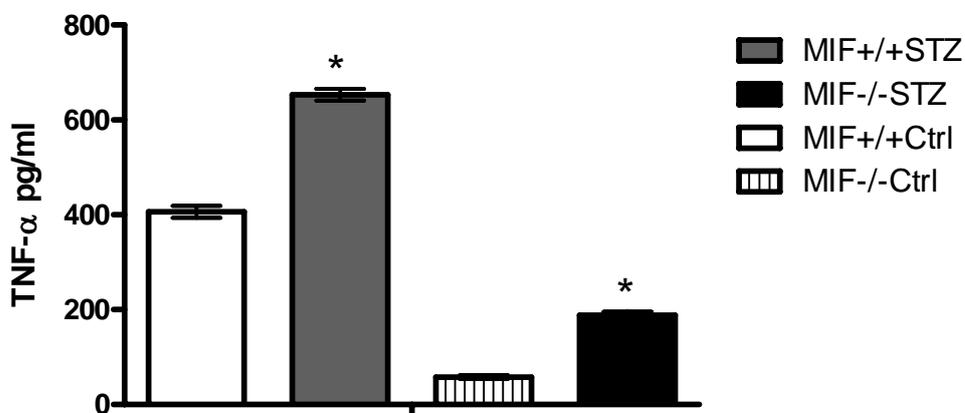


Figura 14. Niveles de TNF- α en suero. En la segunda semana, los niveles séricos de TNF- α de los grupos MIF^{+/+} y MIF^{-/-}, siendo estos últimos los que poseen TNF- α en niveles reducidos en comparación de los MIF^{+/+}, estos valores son comparados con los de un MIF^{+/+} control (s/STZ). n=8 t de student p<0.05.

Niveles de resistina. Los niveles de resistina en sangre de ambos grupos en el tiempo cero se encuentran en un promedio de 6500 pg para ambos grupos, después de la 1^a semana presentaron un incremento repentino de los niveles de resistina también para ambos grupos siendo los MIF^{-/-} mas altos que MIF^{+/+} (aunque no fueron estadísticamente significativos), pero después de la 2^a semana los MIF^{-/-} presentan una caída drástica en sus niveles de resistina, para después de la 3^a semana normalizar sus niveles, mientras que el grupo de los MIF^{+/+} mantuvo sus niveles por encima de los parámetros normales.

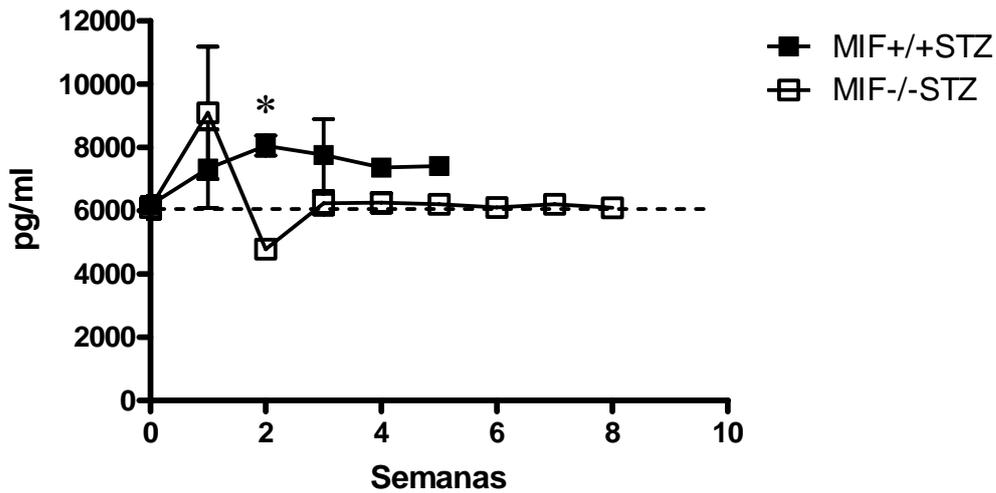


Figura 15. Niveles de resistina en suero. Gráfica de los niveles de Resistina en ambos grupos experimentales, siendo el grupo de los MIF+/+ constantemente más altos durante el transcurso de la DM2. La línea punteada representa los valores normales de resistina de ratones silvestres. n=3 t de student p<0.05.

Niveles de IL-1 β . Los niveles de IL-1 β se ven muy aumentados para el grupo de los MIF+/+ inducidos con STZ después de la semana y media comparación del grupo MIF+/+ control, los cuáles no son diabéticos, pero se ve una notable diferencia para estos dos grupos comparados con los niveles de IL-1 β para el grupo diabético MIF-/-, también después de 2 semanas de haber sido inducido con STZ.

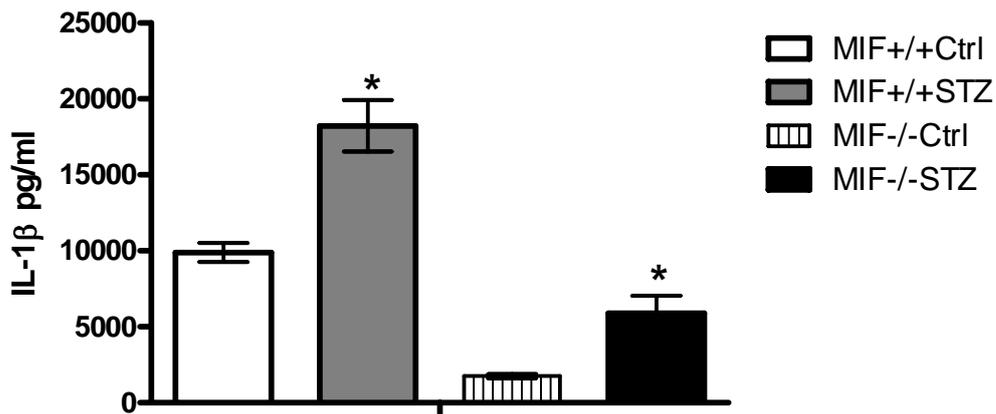


Figura 16. Niveles de IL-1 β en suero. Niveles de IL-1 β de los grupos después de 2 semanas postinducción con STZ. Los niveles de IL-1 β se perciben en los tres grupos aunque disminuidos en el grupo de MIF-/-, esto se debe a la ausencia de MIF como promotor [61]. n=8 t de student p<0.05.

Cortes histológicos del páncreas. Con el fin de establecer si las diferencias en los niveles de glucosa, y mayor mortalidad observados en los ratones MIF^{+/+} comparados con los MIF^{-/-} se pudiera deber a que hubiera mayor daño en los islotes de las células β de páncreas de los ratones MIF^{+/+} que de los MIF^{-/-}. En la siguiente figura, podemos observar un islote amplificado (40X) del páncreas de ratones MIF^{+/+} (a) y MIF^{-/-} (b) y a los 14 días postinducción con STZ MIF^{+/+} (c) y MIF^{-/-}. No observamos diferencias entre los dos grupos; no hubo daño ni infiltración celular en los ratones MIF^{+/+} que pudiera explicar los mayores niveles de glucosa y mortalidad observados en este grupo. Esta prueba de primera instancia verifica que las células β secretan insulina.

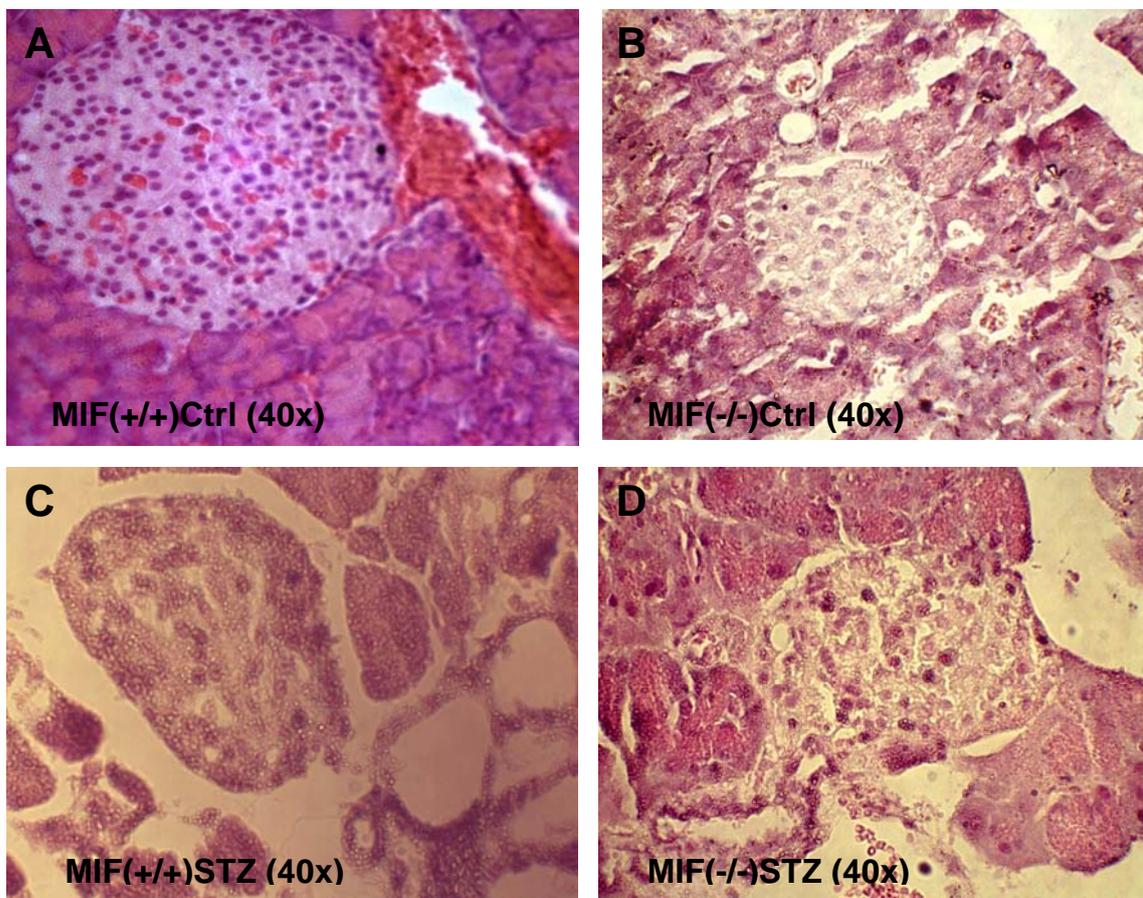


Figura 17. Cortes histológicos de páncreas (40x) de ratones MIF^{+/+} y MIF^{-/-} en el tiempo cero antes de la inducción con STZ (A y B respectivamente) y una semana y media después de la inducción con STZ (C y D)

Niveles de insulina. En este modelo de DM2 se detectaron niveles de insulina en ambos grupos experimentales, esto afirma que la patología inducida con STZ es de una NIDDM.

Los niveles de insulina en ambos grupos se ve normal en el tiempo cero, pero al cabo de la 3^a semana, se eleva en ambos grupos, aunque en MIF+/+, se detecta una hiperinsulinemia más alta que en el grupo de MIF-/. Con una n de 1 para ambos casos.

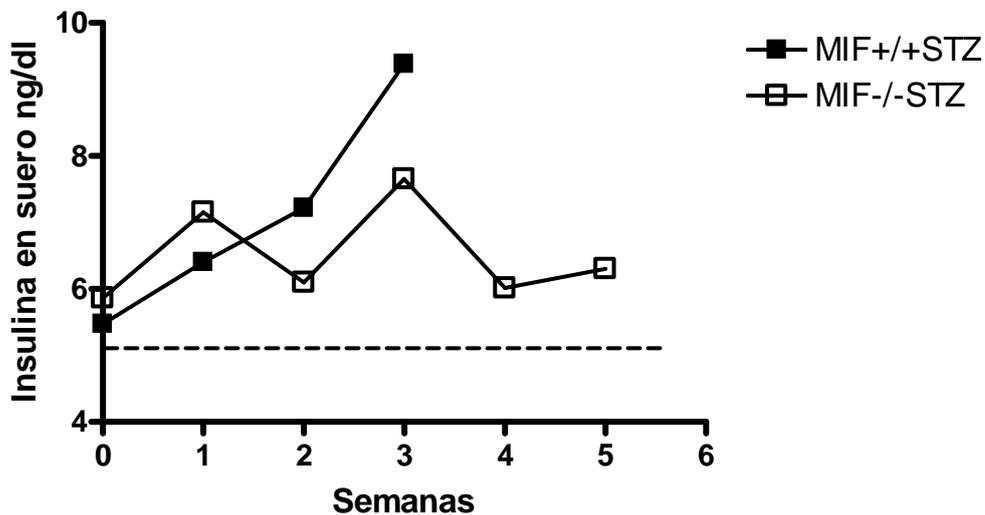


Figura 18. Niveles de insulina en suero. Los ratones sobrevivientes al transcurso de 5 semanas, dónde se puede apreciar que los niveles de insulina en suero son más altos en el grupo de los MIF+/+, mientras que en el grupo de los MIF-/- son altos pero se mantienen un poco mas regulares que el de los grupos MIF+/+.

9.-DISCUSIÓN

La estreptozotocina (STZ) ha sido usada comúnmente para producir no solo modelos de diabetes mellitus insulino dependiente, si no también modelos de diabetes mellitus no insulino dependiente con hiperinsulinemia NIDDM. Se ha reportado que la STZ es capaz de producir diferentes tipos de diabetes de leves a severas de acuerdo con la dosis usada, cuando es administrada en los ratones [62].

En el presente estudio, para esclarecer un poco más el modelo de la NIDDM, fue inducida en los ratones de fondo genético BALB/c silvestres y deficientes para MIF de 8 semanas de edad en una única dosis después de un ayuno de 8 horas.

La razón del por qué la diabetes mellitus de progreso lento es generada con una sola dosis subdiabetogénica de STZ en los ratones BALB/c no es clara [62].

Se presume que se genera una destrucción química parcial de las células β , que en un principio origina hipoinsulinemia e hipoglucemia, y en consecuencia resistencia a la insulina causada por un defecto en el transporte de la glucosa [10].

La captación de glucosa *in vivo* se altera en término de 24 h, a causa de un descenso en la glucólisis de todo el organismo; por consiguiente, la glucemia en los grupos experimentales es alta, además es probable que las células β sobrevivientes traten de compensar la falta de insulina con una sobre secreción de esta [62], por lo cual también es muy posible que esta compensación no sea del todo con insulina, muy probablemente se esté liberando mas proinsulina que insulina [10].

La administración de una única dosis de STZ en nuestros grupos experimentales MIF+/+ y MIF-/- causó glucemias altas en ambos grupos, pero fué menor en el grupo MIF-/-.

Reportes recientes demuestran que MIF se encuentra de manera constitutiva en las células β y que MIF actúa como un regulador autócrino de la secreción de la insulina [35,63]. Al parecer el gen de MIF es positivamente regulado de manera dependiente de dosis-tiempo por la glucosa en las células β [64], adiposas y musculares [63]. Así la condición de concentraciones altas de glucosa en sangre favorece al aumento de MIF promoviendo así también las elevaciones de TNF- α en la sangre.

Se ha demostrado resistencia a la insulina inducida por TNF- α en varios tipos celulares [10,63]. Al parecer varían los mecanismos o los factores que median tales acciones, y dependen no solo de la duración y la intensidad de la exposición a TNF- α , sino también de los tipos celulares específicos [10], como por ejemplo en hepatocitos y fibroblastos dónde TNF- α tiene el efecto inmediato de inhibidor de las señales del receptor

de insulina [10] y/o por el microambiente local de citocinas [39,65]. En hepatocitos y adipocitos TNF- α parece estimular la fosforilación de IRS-1 e IRS-2 [9,10], esto modifica la capacidad de ambos IRS's de interactuar con los receptores de la insulina [10]. También algunos estudios indican que TNF- α permite bloquear ciertas fases dístales de la acción de la insulina [9,10,13], se ha demostrado que TNF- α desregula las concentraciones de mRNA mensajero de GLUT-4 en adipocitos y miocitos [9,10,13].

En la obesidad, en la DM-2, el mRNA y la proteína de TNF- α son producidos principalmente por tejido adiposo, y se ha demostrado que el TNF- α exógeno suprime la acción insulínica en los adipocitos; por todo lo expuesto es de suponer que dicha citosina actúa de manera directa en los adipositos por medio de un circuito autócrino [10,66]. En los miocitos, TNF- α podría actuar de manera directa, a través de un mecanismo parácrino, por que el tejido y las fibras musculares a menudo conllevan una cantidad significativa de tejido adiposo. Sin embargo, otros posibles reguladores, pudieran ser algunos de los productos avanzados de la glucosilación que aumentan en la diabetes y son capaces de inducir la acción de TNF- α en macrófagos [8,10,22,37,49].

La activación de los macrófagos es un componente central del proceso inflamatorio que resulta en la elaboración de citocinas proinflamatorias y una inducción de la respuesta de fase aguda [54,67]. La activación de los macrófagos se ha visto repetidamente en estudios a humanos y modelos animales con DM-2.

Esta activación se debe a una desregulación de la respuesta inmune, orientada hacia un perfil proinflamatorio, con aumento de varias interleucinas y citocinas como IL-6, INF- γ , TNF- α e IL-1 β [65].

Con respecto a IL-1 β , se ha evidenciado que su acción en el hígado produce dislipidemia con una elevación de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) y un descenso en lipoproteínas de alta densidad (HLD), características del síndrome metabólico [68]. Así mismo estas citocinas ejercen importantes efectos sobre el metabolismo de la glucosa y la energía [65].

IL-1 β también tiene efectos reguladores sobre la secreción de la insulina y promueve la destrucción de las células β en la DM-1 [65].

Estos efectos en el cambio "microclimático" mediado por las citocinas e interleucinas, también promueve un cambio en las poblaciones celulares [65], ya que en la DM-2 se promueve para una polarización de la respuesta inmune hacia una respuesta del tipo TH-1, ya que existe la presencia elevada de citocinas TNF- α e IL-1 β , ambas producto de la estimulación de MIF.

MIF influye en el aumento de los tipos celulares que intervienen en la respuesta Th-1, por lo que se ve un incremento notorio en la población de monocitos y neutrófilos, estos estimulados por las citocinas ya mencionadas, además de que estos pueden producirlas de manera constitutiva y abundante.

Por otro lado los niveles de resistina en suero también fueron elevados de cierta manera en ambos grupos, aunque en niveles no muy altos, pero como ya se había mencionado, la sobreexpresión de la resistina conlleva a la resistencia de la insulina y a la desregulación del metabolismo de la glucosa, lípidos y energía [69,70], pero es probable el hecho que la resistina no sea el principal efector de la resistencia a la insulina, ya que varios estudios proponen que la resistencia a la insulina es más relacionado al desarrollo de un problema del proceso inflamatorio y a la producción de varios factores inflamatorios tales como TNF- α , IL-6 e IL-1 β , entre otros.

Siendo así que, en este proyecto se encontró que MIF es una molécula que adquiere un rol importante en la patología de la DM-2, esto desencadenado por una dosis baja de STZ que causa la muerte de algunas células β pancreáticas, generando una alteración de disminución de la secreción de la insulina provocando así en las primeras horas después de su administración hipoglucemias pero dónde los efectos de estas causas repercuten posteriormente en la resistencia a la insulina y por lo tanto en graves hiperglucemias [10] como las observadas en el proyecto.

Entretanto, esto despliega una serie de reacciones en las cuáles MIF promueve una cascada de reacciones inmunitarias en la cual se liberan otras moléculas para el desarrollo de tales reacciones como son TNF- α e IL-1 β [61], dónde se ven incrementadas en el grupo MIF+/+ y además el conjunto de estas reacciones también generan un cambio a nivel celular, aumentando las poblaciones de monocitos y neutrófilos, también observados en el grupo antes mencionado.

Por otro lado también se vio un incremento de la adipocina llamada resistina que también tiene un efecto sobre la resistencia a la insulina, pero debido a que su descubrimiento es reciente, no se sabe a ciencia cierta acerca de su interacción con el sistema inmune.

Todo en conjunto promueve que la patología de la DM-2 sea severa y que sus efectos negativos no sólo sean encontrados a nivel molecular, además conllevan a que el organismo padezca los desórdenes a nivel sistémico generados durante la DM-2, como por ejemplo daños renales y hepático, entre los más importantes. Esto se ve reflejado en el

estado físico de los animales con DM-2 inducida, dónde los animales del grupo MIF^{+/+} no ganan peso y el conjunto de las deficiencias los lleva a la muerte, aunado a que las hiperglucemias fueron severas tanto en las mediciones semanales como en las pruebas de tolerancia a la glucosa.

El conjunto de factores antes mencionado, hacen suponer que la presencia de MIF desencadena una liberación de más factores moleculares entre los cuales destaca también TNF- α , pues este factor es bien sabido que bloquea la subunidad β del receptor de la insulina el cual está ligado al con el líquido intracelular y tener regiones catalíticas para su autofosforilación y la fosforilación de diversas proteínas, entre ellas la insulina[9,10] e IL-1 β que también influye sobre la desregulación de la insulina, promueve cambios metabólicos relacionados con el síndrome “X” y promueve la muerte de las células β en la DM-1, por último, estas citocinas además de la IL-6 polarizan la respuesta inmune hacua una respuesta tipo Th-1, que crea un microambiente dónde los tipos celulares como monocitos y neutrófilos aumenten en número dándose una retroalimentación molecular.

Los niveles de citocinas tanto de TNF- α , IL-1 β , resistina, monocitos y neutrófilos se encontraron disminuidos ciertamente debido a la ausencia de MIF en estos, por lo que la DM-2 en estos resultó mejor librada.

Los ratones MIF^{-/-}-STZ sobrevivieron al estudio debido a que no poseen MIF y por lo tanto no hay producción de TNF α , haciendo que cierta cantidad de insulina entre a las células depositando ciertas cantidades de glucosa, evitando así, la muerte de los ratones.

10.-CONCLUSIONES

- En este proyecto se logró un modelo de diabetes mellitus no insulino dependiente en ratones de fondo genético BALB/c, del tipo silvestre y con delección del gen que codifica para MIF.
- La patología de DM-2 inducida con STZ afectó de manera diferente los ratones MIF^{+/+} y MIF^{-/-}, fue más severa en el grupo de MIF^{+/+}STZ que en los MIF^{-/-}STZ.
- Los niveles de hiperglucemia fueron más severas en el grupo de los ratones MIF^{+/+}STZ que en los MIF^{-/-}STZ.
- Los niveles de TNF- α fueron mayores en el grupo de los ratones MIF^{+/+}STZ que en los MIF^{-/-}STZ.
- Los niveles de TNF-a e IL-1 β en suero de los ratones MIF^{+/+}STZ fueron estadísticamente superiores que en los ratones MIF^{-/-}STZ
- Los valores de resistina en los grupos tratados con STZ, fueron ligeramente elevados en comparación con los niveles normales, y fue aún más elevada en el grupo de los ratones MIF^{+/+}STZ fue significativamente mayor durante la segunda semana después de tratamiento comparado con el grupo de los ratones MIF^{-/-}STZ..
- Los niveles de insulina en los ratones MIF^{+/+}STZ fueron más elevados durante la 2^a semana post inducción con STZ..
- Los niveles de insulina en el grupo de los ratones MIF^{-/-}STZ fueron más estables y cercanos al promedio en suero.

- MIF puede favorecer la respuesta inflamatoria (TNF- α , IL-1 β) y facilitar la génesis de DM-2.
- La ausencia del gen que codifica para MIF atenúa la patología en la DM-2 cuando es inducida en el modelo murino propuesto en este protocolo.

CRÉDITOS

Apoyo recibido

Beca Tesis de Licenciatura COMECyT-CONACyT 2008 otorgada el 15 de Diciembre de 2008.

Proyectos que financiaron esta Tesis

CONACYT 49812-Q
PAPCA; PAPIIT IN-208606

Miembros del Comité Tutorial

Presidente: Luis Ignacio Terrazas Valdés

Vocal: Leticia Moreno Fierros

Secretario: Miriam Rodríguez Sosa

Suplente: Maximiliano Ibarra Barajas

Suplente: Javier Alonso Trujillo

Este trabajo fue realizado en el laboratorio 5 de Inmunología de la Unidad de Biomedicina dentro de la Facultad de Estudios Iztacala UNAM, bajo asesoría de la Dra. Miriam Rodríguez Sosa.

11.- APENDICE 1

Buffer de solución salina amortiguada con fosfatos (PBS) para 10 Lts y pH 7.4

80 gr NaCl (J.T. Baker)

11.6 gr Na₂HPO₄ (J.T. Baker)

2 gr KH₂PO₄ (J.T.Baker)

2 gr KCl (ICN Biomedicals Inc.)

Buffer de lisis (Laird W. P. et. al. 1991Simplified mammalian DNA isolation procedure, Nucleic Acids Research Vol. 19 Num15, 4293).

200 mM NaCl (J.T. Baker)

5 mM de Ácido Etilenediaminatetraacetico (EDTA) (J.T. Baker)

0.2% Dodecil sulfato de sodio (SDS) (J. T.Baker)

100 mM Tris HCl, pH 8.5 (ICN Biomedicals Inc.)

Se afora con agua destilada hasta 1Lt.

Solución hemolizante

Tris base 0.17 M (ICN Biomedicals Inc.)

NH₄Cl 0.16 M (JT.Baker)

Se prepara para 300 ml.

Buffer TBE 10x

Tris base (890mM) (Sigma Chemicals)

Ácido Bórico (890mM) (J.T. Baker)

40 ml. de 0.5 M Ácido Etilenediaminatetraacetico (EDTA) disódico (J.T.Baker)

Se ajusta todo a pH 8 y se afora a 500 ml. con agua destilada

Buffer de pegado (ELISA)

0.1 M de NA₂HPO₄ (J.T. Baker)
para 1 lt con agua destilada.

Solución de lavado (ELISA)

1000 mL de PBS más 0.5% de Tween 20 (Promega co.)

Solución de bloqueo (ELISA)

100 ml de PBS más 1% de Albumina serica bovina (ICN Biochemicals)

Sustrato ABTS para revelado (ELISA)

Adicionar 150 mg de ABTS (ICN Biomedicals) en 500 ml de 0.1 M de ácido cítrico (tecsiquim) en agua destilada y con NaOH (Monterrey) llevar a un pH de 4.35, posteriormente se hicieron alícuotas de 1 ml en tubos y se congelaron hasta su uso a -70°C.

SYBR Nucleic Acid Gel Satín

Para un óptimo resultado se recomienda utilizar a una solución stock de 1:10,000
Si el SYBR Green es adicionado directamente al buffer, debe quedar a una concentración final de 1:1,000.

Solución Hematoxilina de Harris para tinción de cortes histológicos

Hematoxilina de Harris

Hycel de México

Se utiliza directamente del frasco hasta que cubra las láminas donde se encuentran los cortes a teñir

Eosina acidificada

Eosina amarillenta 20 g SIGMA

H₂O destilada 500 ml

HCl 10 ml

Mezclar la eosina amarillenta en el agua destilada, agregar el ácido clorhídrico lentamente por las paredes del recipiente y dejar que se asiente la mezcla durante toda la noche.
Lavar el precipitado mediante filtración con papel filtro y agua destilada varias veces (5-8 veces).
Secar la pastilla que quedó en el papel filtro en un horno a 60° C durante 24 horas.
Una vez seca la pastilla, colocarla en un mortero y macerar finamente la pastilla, una vez macerada, agregar 1000 ml de alcohol al 96°.

Este proceso da como resultado una solución stock

Cuando se utilice para teñir por cada parte de eosina stock, agregar dos mas de alcohol y 10 ml de ácido acético glacial

Tinción de cortes histológicos con la técnica Hematoxilina de Harris-Eosina

Meter las laminas en canastilla por 30' a 60° C, antes de teñir para mejorar el pegado, dejar enfriar
Se colocará en la canastilla con la solución y el tiempo indicado en la siguiente guía:

Xilol I 5'

Xilol II 5'

Alcohol-Xilol*	3'
OH 100%	3'
OH 90%	2'
OH 80%	2'
OH 70%	1'
Agua corriente	3'
Hematoxilina de Harris	5'
Agua corriente	lavado
Alcohol ácido	lavado
Agua amoniacal	lavado
Agua corriente	1'
Eosina alcohólica	5'
Agua corriente	lavado
OH 70%	1'
OH 90%	1'
OH 100%	2'
Alcohol-Xilol	3'
Xilol I	5'
Xilol II	5'

Montaje en resina (Entellan, resina sintética, bálsamo de Canadá, etc)

- *Alcohol al 100% mismo volumen de Xilol puro
- **No sacar las láminas del último xilol, ir montando en resina una por una**
- Tiempos mínimos, si los colorantes tienen alrededor de un año, aumentar los tiempos de tinción
- El alcohol utilizado es etílico
- Montaje en Entellan (Baker) secado rápido (30' para ver en inmersión)

12.-BIBLIOGRAFÍA

- [1] Gustavo Olaiz JR, Teresa Shamah, Rosalba Rojas,, Salvador Villalpando MH, Jaime Sepúlveda. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006. Instituto Nacional de Salud Pública: Instituto Nacional de Salud Pública
Av. Universidad 655, Col. Santa María Ahuacatitlán
62508 Cuernavaca, Morelos, México,2006.
- [2] Federación Mexicana de Diabetes AC, <<http://www.fmdiabetes.org>>. Diabetes México, D.F. , 2007: Diabetes en Números.
- [3] Gustavo Olaiz-Fernández RR, Carlos A Aguilar-Salinas, Juan Rauda, Salvador Villalpando. Diabetes mellitus en adultos mexicanos. Resultados de la Encuesta Nacional
de Salud 2006. Salud Pública de México / vol49, suplemento 3 de 2007 2006;49:331-337.
- [4] Federation ID. Diabetes Cape Town 2006: Diabetes en Números.
- [5] MedLine Plus idSpu, <http://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/000305.htm>. Diabetes Rockville Pike, Bethesda, MD., USA, 2008: Diabetes
- [6] David JR. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. Proc Natl Acad Sci U S A 1966;56:72-77.
- [7] Bloom BR, Bennett B. Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity. Science 1966;153:80-82.
- [8] Pickup JC, Crook MA. Is type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system? Diabetologia 1998;41:1241-1248.
- [9] González Antonio LF, Rios José de Jesus. Síndrome metabólico y enfermedad cardiovascular: México D. F. ,2007.
- [10] Derek LeRoith SIT, Jerrold M. Olefsky. Diabetes Mellitus: Texto Básico y Clínico. McGraw-Hill Companies, Inc.: México,2003.
- [11] Bell GI, Polonsky KS. Diabetes mellitus and genetically programmed defects in beta-cell function. Nature 2001;414:788-791.
- [12] Díaz Henández Diana. P BHLC. ¿Cómo se transporta la glucosa a través de la membrana celular? IATREIA 2002;15:179-189.
- [13] Gerald M. Reaven AL. Insulin Resistance: the Metabolic Syndrome X 999 Riverview Drive, Suite 208 Totowa, New Jersey 07512, U. S. A.,1999.
- [14] Lyon CJ, Law RE, Hsueh WA. Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. Endocrinology 2003;144:2195-2200.
- [15] Stepan CM, Bailey ST, Bhat S, Brown EJ, Banerjee RR, Wright CM, Patel HR, Ahima RS, Lazar MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. Nature 2001;409:307-312.
- [16] Rajala MW, Obici S, Scherer PE, Rossetti L. Adipose-derived resistin and gut-derived resistin-like molecule-beta selectively impair insulin action on glucose production. J Clin Invest 2003;111:225-230.
- [17] Kaser S, Kaser A, Sandhofer A, Ebenbichler CF, Tilg H, Patsch JR. Resistin messenger-RNA expression is increased by proinflammatory cytokines in vitro. Biochem Biophys Res Commun 2003;309:286-290.
- [18] I. Bucala R. MIF : Most Interesting Factor. World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd: Yale University, New Haven, Connecticut,2007.
- [19] George M, Vaughan JH. In vitro cell migration as a model for delayed hypersensitivity. Proc Soc Exp Biol Med 1962;111:514-521.

- [20] Nathan CF, Karnovsky ML, David JR. Alterations of macrophage functions by mediators from lymphocytes. *J Exp Med* 1971;133:1356-1376.
- [21] Nathan CF, Remold HG, David JR. Characterization of a lymphocyte factor which alters macrophage functions. *J Exp Med* 1973;137:275-290.
- [22] Calandra T, Bernhagen J, Metz CN, Spiegel LA, Bacher M, Donnelly T, Cerami A, Bucala R. MIF as a glucocorticoid-induced modulator of cytokine production. *Nature* 1995;377:68-71.
- [23] Bacher M, Meinhardt A, Lan HY, Dhabhar FS, Mu W, Metz CN, Chesney JA, Gemsa D, Donnelly T, Atkins RC, Bucala R. MIF expression in the rat brain: implications for neuronal function. *Mol Med* 1998;4:217-230.
- [24] Lue H, Kleemann R, Calandra T, Roger T, Bernhagen J. Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infect* 2002;4:449-460.
- [25] Denkinger CM, Metz C, Fingerle-Rowson G, Denkinger MD, Forsthuber T. Macrophage migration inhibitory factor and its role in autoimmune diseases. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 2004;52:389-400.
- [26] Bernhagen J, Calandra T, Bucala R. Regulation of the immune response by macrophage migration inhibitory factor: biological and structural features. *J Mol Med* 1998;76:151-161.
- [27] Lanahan A, Williams JB, Sanders LK, Nathans D. Growth factor-induced delayed early response genes. *Mol Cell Biol* 1992;12:3919-3929.
- [28] Jung H, Kim T, Chae HZ, Kim KT, Ha H. Regulation of macrophage migration inhibitory factor and thiol-specific antioxidant protein PAG by direct interaction. *J Biol Chem* 2001;276:15504-15510.
- [29] Sun HW, Bernhagen J, Bucala R, Lolis E. Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:5191-5196.
- [30] Bernhagen J, Calandra T, Mitchell RA, Martin SB, Tracey KJ, Voelter W, Manogue KR, Cerami A, Bucala R. MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature* 1993;365:756-759.
- [31] Bacher M, Meinhardt A, Lan HY, Mu W, Metz CN, Chesney JA, Calandra T, Gemsa D, Donnelly T, Atkins RC, Bucala R. Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. *Am J Pathol* 1997;150:235-246.
- [32] Calandra T, Spiegel LA, Metz CN, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:11383-11388.
- [33] Abe R, Peng T, Sailors J, Bucala R, Metz CN. Regulation of the CTL response by macrophage migration inhibitory factor. *J Immunol* 2001;166:747-753.
- [34] Bacher M, Metz CN, Calandra T, Mayer K, Chesney J, Lohoff M, Gemsa D, Donnelly T, Bucala R. An essential regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in T-cell activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:7849-7854.
- [35] Benigni F, Atsumi T, Calandra T, Metz C, Echtenacher B, Peng T, Bucala R. The proinflammatory mediator macrophage migration inhibitory factor induces glucose catabolism in muscle. *J Clin Invest* 2000;106:1291-1300.
- [36] Calandra T, Bernhagen J, Mitchell RA, Bucala R. The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor. *J Exp Med* 1994;179:1895-1902.

- [37] Bernhagen J, Mitchell RA, Calandra T, Voelter W, Cerami A, Bucala R. Purification, bioactivity, and secondary structure analysis of mouse and human macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Biochemistry* 1994;33:14144-14155.
- [38] Rogers LA, Zlotnik A, Lee F, Shortman K. Lymphokine requirements for the development of specific cytotoxic T cells from single precursors. *Eur J Immunol* 1991;21:1069-1072.
- [39] Romagnani S. Th1 and Th2 in human diseases. *Clin Immunol Immunopathol* 1996;80:225-235.
- [40] Pritchard DI, Hewitt C, Moqbel R. The relationship between immunological responsiveness controlled by T-helper 2 lymphocytes and infections with parasitic helminths. *Parasitology* 1997;115 Suppl:S33-44.
- [41] Onodera S, Kaneda K, Mizue Y, Koyama Y, Fujinaga M, Nishihira J. Macrophage migration inhibitory factor up-regulates expression of matrix metalloproteinases in synovial fibroblasts of rheumatoid arthritis. *J Biol Chem* 2000;275:444-450.
- [42] Santos L, Hall P, Metz C, Bucala R, Morand EF. Role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in murine antigen-induced arthritis: interaction with glucocorticoids. *Clin Exp Immunol* 2001;123:309-314.
- [43] Leng L, Metz CN, Fang Y, Xu J, Donnelly S, Baugh J, Delohery T, Chen Y, Mitchell RA, Bucala R. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *J Exp Med* 2003;197:1467-1476.
- [44] Kleemann R, Hausser A, Geiger G, Mischke R, Burger-Kentischer A, Flieger O, Johannes FJ, Roger T, Calandra T, Kapurniotu A, Grell M, Finkelmeier D, Brunner H, Bernhagen J. Intracellular action of the cytokine MIF to modulate AP-1 activity and the cell cycle through Jab1. *Nature* 2000;408:211-216.
- [45] Hudson JD, Shoaibi MA, Maestro R, Carnero A, Hannon GJ, Beach DH. A proinflammatory cytokine inhibits p53 tumor suppressor activity. *J Exp Med* 1999;190:1375-1382.
- [46] Mitchell RA, Liao H, Chesney J, Fingerle-Rowson G, Baugh J, David J, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:345-350.
- [47] Onodera S, Tanji H, Suzuki K, Kaneda K, Mizue Y, Sagawa A, Nishihira J. High expression of macrophage migration inhibitory factor in the synovial tissues of rheumatoid joints. *Cytokine* 1999;11:163-167.
- [48] Leech M, Metz C, Hall P, Hutchinson P, Gianis K, Smith M, Weedon H, Holdsworth SR, Bucala R, Morand EF. Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids. *Arthritis Rheum* 1999;42:1601-1608.
- [49] Bernhagen J, Bacher M, Calandra T, Metz CN, Doty SB, Donnelly T, Bucala R. An essential role for macrophage migration inhibitory factor in the tuberculin delayed-type hypersensitivity reaction. *J Exp Med* 1996;183:277-282.
- [50] Donnelly SC, Haslett C, Reid PT, Grant IS, Wallace WA, Metz CN, Bruce LJ, Bucala R. Regulatory role for macrophage migration inhibitory factor in acute respiratory distress syndrome. *Nat Med* 1997;3:320-323.
- [51] Honda K, Nishihira J, Nitta K, Kobayashi H, Uchida K, Kawashima A, Yumura W, Nihei H. Serum levels of macrophage migration inhibitory factor in various types of glomerulonephritis. *Nephron* 2000;86:91-92.

- [52] Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood* 1994;84:4008-4027.
- [53] Mitchell RA, Metz CN, Peng T, Bucala R. Sustained mitogen-activated protein kinase (MAPK) and cytoplasmic phospholipase A2 activation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). Regulatory role in cell proliferation and glucocorticoid action. *J Biol Chem* 1999;274:18100-18106.
- [54] O'Connor JC, Sherry CL, Guest CB, Freund GG. Type 2 diabetes impairs insulin receptor substrate-2-mediated phosphatidylinositol 3-kinase activity in primary macrophages to induce a state of cytokine resistance to IL-4 in association with overexpression of suppressor of cytokine signaling-3. *J Immunol* 2007;178:6886-6893.
- [55] Sun N, Yang G, Zhao H, Savelkoul HF, An L. Multidose streptozotocin induction of diabetes in BALB/c mice induces a dominant oxidative macrophage and a conversion of TH1 to TH2 phenotypes during disease progression. *Mediators Inflamm* 2005;2005:202-209.
- [56] U.S. Department of Health and Human Services PHS, National Toxicology Program Report on Carcinogens. U.S. Department of Health and Human Services, 2007.
- [57] Orci L, Junod A, Pictet R, Renold AE, Rouiller C. Granulolysis in a cells of endocrine pancreas in spontaneous and experimental diabetes in animals. *J Cell Biol* 1968;38:62-66.
- [58] Cvetkovic I, Al-Abed Y, Miljkovic D, Maksimovic-Ivanic D, Roth J, Bacher M, Lan HY, Nicoletti F, Stosic-Grujicic S. Critical role of macrophage migration inhibitory factor activity in experimental autoimmune diabetes. *Endocrinology* 2005;146:2942-2951.
- [59] Junod A, Lambert AE, Stauffacher W, Renold AE. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *J Clin Invest* 1969;48:2129-2139.
- [60] Mikio ITO KH, Rhyoji KOJIMA. Strain Differences in the Diabetogenic Activity of Streptozotocin in Mice. *Biology and Pharmaceutical Bulletin* 2006;29:1110-1119.
- [61] Baugh JA, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor. *Crit Care Med* 2002;30:S27-S35.
- [62] Hayashi K, Kojima R, Ito M. Strain differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice. *Biol Pharm Bull* 2006;29:1110-1119.
- [63] Waeber G, Calandra T, Roduit R, Haefliger JA, Bonny C, Thompson N, Thorens B, Temler E, Meinhardt A, Bacher M, Metz CN, Nicod P, Bucala R. Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet beta cell macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:4782-4787.
- [64] Plaisance V, Thompson N, Niederhauser G, Haefliger JA, Nicod P, Waeber G, Abderrahmani A. The mif gene is transcriptionally regulated by glucose in insulin-secreting cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;295:174-181.
- [65] M. Flores-Aldana OP-Z, S. Barquera-Cervera. El paradigma inmune Th1-Th2: un vínculo entre obesidad, aterosclerosis y diabetes mellitus. *Clin Invest Arterioscl* 2004;17:232-248.
- [66] S Sakaue SI, N Hizawa, Y Ohtsuka, I Tsujino, T Honda, J Suzuki, Y Kawakami, J Nishihira and M Nishimura. Promoter polymorphism in the macrophage migration inhibitory factor gene is associated with obesity. *International Journal of Obesity* 2005;30:238-242.

- [67] You Liu QW, Ying-bin Pan, Zhi-jie Gao, Yan-fen Liu, and Shao-hong Chen. Effects of over-expressing resistin on glucose and lipid metabolism in mice. *J Zhejiang Univ Sci B* 2008;9:44-50.
- [68] Beutler B, Mahoney J, Le Trang N, Pekala P, Cerami A. Purification of cachectin, a lipoprotein lipase-suppressing hormone secreted by endotoxin-induced RAW 264.7 cells. *J Exp Med* 1985;161:984-995.
- [69] Stepan CM, Wang J, Whiteman EL, Birnbaum MJ, Lazar MA. Activation of SOCS-3 by resistin. *Mol Cell Biol* 2005;25:1569-1575.
- [70] Fan HQ, Gu N, Liu F, Fei L, Pan XQ, Guo M, Chen RH, Guo XR. Prolonged exposure to resistin inhibits glucose uptake in rat skeletal muscles. *Acta Pharmacol Sin* 2007;28:410-416.