



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

Participación del Factor Inhibidor de la Migración de
Macrófagos en la diabetes inducida con una sola dosis de
estreptozotocina.

T E S I S

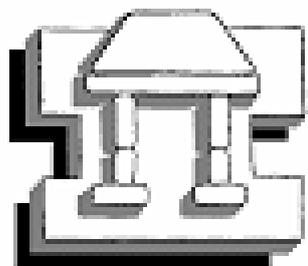
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MARISOL DE LA MORA CURIEL

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MIRIAM RODRIGUEZ SOSA



IZTACALA

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MEXICO

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
 FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
 CARRERA DE BIOLOGIA

13 de Enero de 2009

DR. SERGIO CHÁZARO OLVERA
 DIRECTOR
 PRESENTE.

Atención: Lic. Eloy González Fernández
 Jefe de la Unidad de Administración Escolar

Los abajo firmantes, miembros de la Comisión Dictaminadora del trabajo de:

TESIS DE INVESTIGACIÓN

Titulado "Participación del Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos en la diabetes inducida con una sola dosis de estreptozotocina"

Que presenta el (la) pasante de Biología **MARISOL DE LA MORA CUIEL**

Para obtener el título de Biólogo.

Informan que después de haber revisado cuidadosamente el trabajo, consideramos que reúne las características de calidad académica que se requieren para aspirar a la obtención del título citado, razón por la cual otorgamos nuestros **votos aprobatorios** para la presentación del examen profesional correspondiente.

GRADO	NOMBRE	FIRMA	CARGO
M. EN C.	MARTHA OFELIA SALCEDO ALVAREZ		Presidente
DR.	LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDEZ		Vocal
DRA.	MIRIAM RODRIGUEZ SOSA		Secretario
DRA.	EMMA BERTA GUTIERREZ CIRLOS MADRID		Suplente
DR.	RAFAEL VILLALOBOS MOLINA		Suplente

Con base en lo anterior solicito su autorización para que los profesores que otorgan los votos aprobatorios funjan como sinodales del examen profesional en el cargo anotado, y a la Administración Escolar otorgue la fecha para la Réplica Oral del trabajo presentado.

Atentamente
 "POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

JEFE DE CARRERA

M. EN C. RAFAEL CHAVEZ LÓPEZ

FACULTAD DE
 BIOLOGIA

Vo.Bo.

Dr. Sergio Cházaro Olvera
 Director

Con amor para mi familia: Les dedico todo mi esfuerzo a mis padres Margarita Curiel Hernández y Moisés De la Mora Centeno que siempre me han apoyado en todos los aspectos de mi vida. Han sido todo un ejemplo a seguir.

Para mis hermanas Carolina De la Mora Curiel, mi filosofa favorita, y Elizabeth De la Mora Curiel, por todos sus consejos, compañía, comprensión y cariño.

Para mi tía Socorro Curiel Hernández que siempre me ha alentado para seguir superándome

LOS AMO

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de tesis la Dra. Miriam Rodríguez Sosa a quien aprecio y respeto mucho, gracias Miriam por tu constancia y perseverancia para formarme profesionalmente, además del ejemplo que me diste, por el tiempo que me dedicaste, por todo lo que me enseñaste, por tu sinceridad y apoyo en los momentos más críticos de mi formación académica pero sobretodo quiero agradecerte por tu amistad.

A la Dra. Emma Berta quien también formo parte activa de mi formación profesional y por su paciencia durante una parte de la fase experimental de la tesis. Además del buen trato que siempre tuvo conmigo.

Gracias a la guía de las dos, pude darme cuenta que, como dijo Rabelais: “ciencia sin conciencia no es sino ruina del alma”. Pues quien no comprende lo que hace y para que lo hace, no puede ser creativo al generar hipótesis, posibles mecanismos de respuesta, sugerir otras posibilidades, etc. Espero poder poner esta enseñanza en práctica al entrar al posgrado y para cada nueva investigación que realice, gracias.

Por otra parte, de ninguna manera he llegado sola hasta este punto, quiero agradecer de modo muy especial a mis amigos de la licenciatura Ariadna Velázquez y Daniel Vélez, que juntos formamos la Tri-fuerza, un bello recuerdo que llevo grabado en el corazón. También agradezco la amistad de Miriam Campos y Eduardo Becerril, Teresa Ortiz, Elvira Hernández, Patricia Cuellar, con quienes pasase momentos muy gratos y en quienes confié plenamente, sin ellos mi vivencia no hubiera sido la misma, los quiero mucho.

A mi amigo Edson Espinoza, por recordarme a cada instante lo grandioso que es estudiar biología (claro de una forma poco común) y por su valiosa amistad.

Por su puesto y sobre todo a mi amiga Sarai Salinas a quien conozco desde hace ocho años, que siempre tiene tiempo para platicar y me escucha de todo corazón, gracias amiga.

Por sus consejos, apoyo y amistad a la M. en C. Norma García, al Dr. José Gomes, Lic. Prisila Morales y a la Dra. Sara Cruz, que siempre me pregunta como estoy.

A mis compañeros de laboratorio Imelda Juárez, Emanuel Leal, Alicia Vasquez, Laura Vera, Axin Ortiz, Yuriko Sánchez y Rubí Viedma, por resolver mis constantes dudas y guiarme en algunos tramites.

Por sus comentarios y asistencia técnica a Dr. Ignacio Terrazas, Dra. Leticia Moreno, Dr. Alonso Vilchis, Dr. Rafael Villalobos y a la M. en C. Martha Salcedo.

Durante mi formación como bióloga tuve excelentes maestros, que realmente nos enseñaron a mis compañeros y a mi, lo que debíamos aprender y mas. Siempre dieron lo mejor de si mismos en las clases y me contagiaron el interés y el entusiasmo por cada uno de los temas, disfrute mucho sus clases. Además siempre tuvieron tiempo y paciencia para resolver todas mis dudas, aun en horario fuera de clase.

Geobiología.....Roberto Rico Montiel

Físico química.....Ignacio Peñalosa Castro

Biología Celular y Bioquímica.....Martha Salcedo Álvarez

Diversidad Animal 1.....Antonio Martínez y José Luis Tello Musi

Diversidad Vegetal 2.....Daniel Tejero Diez

Diversidad Animal 2.....Sergio Stanford Camargo

Evolución.....Elias Piedra Ibarra

Ecología.....Acela Sánchez Reyes

Manejo de recursos naturales.... ..Francisco López Galindo

Ornitología.....Patricia Ramírez Bastida

Mamíferos acuáticos.....Luis Medrano Gonzales (de Facultad de ciencias, CU.)

GRACIAS A TODOS

Créditos

Este trabajo fue financiado por:

Proyecto PAPIIT IN208606
PAPCA 2008 FES Izatacala

Con el apoyo económico para la impresión de la tesis y trámites de titulación de:

COMECYT-CONACYT “Becas para tesis de licenciatura 2008”

Directora de tesis

Dra. Miriam Rodríguez Sosa

Miembros del comité tutorial

M. en C. Marta Ofelia Salcedo Álvarez
Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdez
Dra. Emma Berta Gutiérrez Cirros Madrid
Dr. Rafael Villalobos Molina

ÍNDICE

I RESUMEN	1
II.ABREVIATURAS.....	2
III INTRODUCCIÓN.....	3
III.1 Sistema inmune.....	3
III.2 Factor inhibidor de la migración de macrófagos.....	4
III.3 Diabetes.....	5
III.4 Tipos de diabetes.....	7
III.5 Sistema inmune y diabetes tipo 2.....	8
III.6 Modelo de diabetes experimental.....	9
IV.JUSTIFICACIÓN.....	10
V HIPOTESIS.....	11
VI OBJETIVO GENERAL.....	12
VI.1 Objetivos particulares.....	12
VII MATERIAL Y MÉTODOS.....	13
VII.1 Determinación del genotipo por PCR.....	14
VII.1.1 Extracción de DNA.....	14
VII.1.2 Amplificación del gen.....	14
VII.1.3 Electroforesis.....	15
VII.2 Inducción de diabetes.....	15
VII.3 Concentración glucosa en sangre.....	15
VII.4 Sobrevida.....	15
VII.5 Evaluación clínica.....	16
VII.6 Parámetros en orina.....	16

VII.7 Prueba de tolerancia a la glucosa.....	16
VII.8 Obtención de islotes pancreáticos.....	16
VII.9 Obtención de suero para las pruebas de ELISA	
VII.9.1 Cuantificación de TNF-a, IL-1b, IL-6 y resistina en suero por ELISA.....	17
VII.9.2 Cuantificación de insulina en plasma por ELISA.....	17
VII.10 Ensayo de RT-PCR para RNAm de insulina.....	17
VII.10.1 Cuantificación de RNAm.....	17
VII.10.2 PCR para insulina, GLUT-2 y RNAr 18S.....	18
VII.10.3 Electroforesis.....	18
VIII RESULTADOS.....	19
VIII .1 Genotipo de los ratones, grupos experimentales.....	19
VIII.2 Estandarización de la dosis de STZ (curva dosis-respuesta).....	19
VIII.3 Tolerancia a la glucosa (grupos 90 y 130 mg/kg STZ).....	23
VIII.4 Glucosa en sangre del grupo 130 mg/kg.....	24
VIII.5 Peso del grupo 130 mg/kg.....	24
VIII.6 Evaluación clínica del grupo 130 mg/kg.....	25
VIII.7 Tolerancia a la glucosa del grupo 130 mg/kg.....	28
VIII.8 Obtención de islotes y RNAm para GLUT-2 e insulina.....	29
VIII.9 Determinación de citocinas, insulina y resistina del grupo 130 mg/kg.....	30
IX ANALISIS Y DISCUSIÓN.....	34
X CONCLUSIONES.....	37

XI REFERENCIAS.....	38
XII GLOSARIO.....	41
XIII APENDICES.....	42

I. RESUMEN

El Factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) es una citocina pleiotrópica proinflamatoria producida por distintas células; recientemente se ha observado sobre-expresada en el suero de pacientes con diabetes mellitus tipo 2 (D-2), lo cual sugiere que podría participar de manera importante en el desarrollo de la enfermedad. En este estudio tratamos de establecer el modelo experimental de esta enfermedad en ratones BALB/c y la participación de MIF en la D-2. Se utilizaron distintas dosis (160, 130, 90 y 55 mg/kg) de estreptozotocina (STZ), en los cuales se determinó la glucemia por un periodo de 21 días, cada siete días, y una prueba de tolerancia a la glucosa. Los resultados demostraron que el modelo es viable administrando una dosis de 130 mg/kg de STZ en ayuno de 5 horas, previo a la inyección intraperitoneal. Los ratones inducidos con 130 mg/kg fueron evaluados durante 12 semanas posteriores a la inducción, para determinar la participación de MIF. Se utilizaron ratones deficientes para el gen MIF (MIF^{-/-}) y ratones silvestres (MIF^{+/+}) ambos con fondo genético BALB/c. Los ratones MIF^{+/+} desarrollaron la patología de D-2 en mayor grado que los ratones MIF^{-/-}. Es decir, las características de la enfermedad, tales como, hiperglucemia en ayunas, fallo a la prueba de tolerancia a la glucosa a la semana 6 y 8, polidipsia, poliuria y glucosuria, se acentuaron en el grupo MIF^{+/+} en comparación con el grupo MIF^{-/-}. Además los ratones MIF^{+/+} mostraron un incremento en la producción de citocinas proinflamatorias; TNF- α , IL-1 β e IL-6. Nuestros resultados sugieren que MIF tiene una importante participación en la génesis y el desarrollo de la D-2, es posible que dicha participación sea mediada por la función de MIF al promover la producción de citocinas proinflamatorias.

II. ABREVIATURAS

- **BALB/c:** Nomenclatura para designar cepa de ratones con fondo genético Th2, generados por endogamia.
- **COX 2:** Ciclo oxigenasa 2
- **CPR:** Proteína C reactiva
- **D-2:** Diabetes tipo 2
- **DNAasa:** Enzima que degrada DNA.
- **ERK/2:** Cinasa activada por receptor extracelular 2
- **GLUT:** Transportador de glucosa
- **ICAM-1:** Molécula de adhesión intracelular tipo 1
- **ICR:** Cepa de ratones más comúnmente utilizados de los ratones generados por cruza, tienen excelentes características reproductivas.
- **IL- * :** Interleucina
- **IL-*R:** Receptor de interleucina
- **INF- γ :** Interferón gamma
- **JAB1:** Proteína de activación ligada al dominio 1
- **MHC-II:** Complejo principal de histocompatibilidad tipo dos
- **MIF:** Factor Inhibidor de la migración de macrófagos
- **MPC-1:** Proteína quimiotaxis monocito 1
- **NF-k β :** Factor nuclear k β
- **NSB :** Suero fetal bovino
- **PGE 2:** Prostaglandina E2
- **RNAasa:** Enzima que degrada RNA
- **RNAm:** Mensajero de adenosin ribonucleótido
- **SGLT :** Transportador sodio-glucosa
- **STZ:** Estreptozotocina.
- **TGF- β :** Factor de crecimiento transformante beta
- **TNF- α :** Factor de necrosis tumoral alfa
- **VCAM-1:** Molécula de adhesión vascular celular tipo 1

III. INTRODUCCIÓN

Diabetes inducida por una sola dosis de STZ, alude a un modelo experimental de diabetes tipo 2 (D-2) propuesto por Ito y col. (2001), donde utilizaron diferentes cepas de ratones, y describe la patología desarrollada en los ratones ICR. Ellos demostraron que una única dosis de STZ es capaz de generar diabetes no insulino dependiente caracterizada por un daño en la respuesta a insulina después de un estímulo con glucosa. Basados en este modelo nosotros establecimos el modelo en ratones de fondo genético BALB/c, describimos la patología y determinamos las diferencias en el desarrollo de la enfermedad en presencia o ausencia del gen que codifica para MIF. Para lo cual, utilizamos ratones con fondo genético BALB/c deficientes para el gen de MIF (MIF^{-/-}) y ratones silvestres (MIF^{+/+}). En el presente reporte se define la respuesta del sistema inmune para situar a MIF en el contexto, se describen sus características y funciones. Se hace un breve acercamiento a la epidemiología de la diabetes y se describe la enfermedad junto con las características de cada tipo. Se establece la relación que existe entre la diabetes mellitus tipo 2 con el sistema inmune y MIF. Por último se describe el modelo empleado para la inducción de la diabetes mellitus tipo 2 y la participación de MIF en el desarrollo de la D-2 en este modelo.

III.1 Sistema inmune

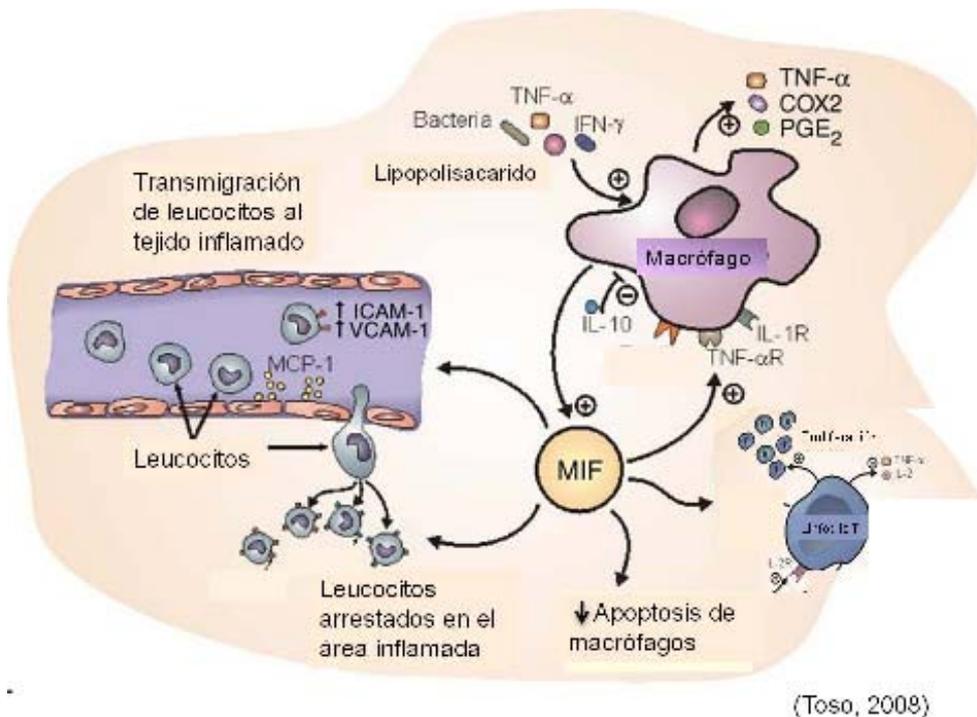
Los vertebrados son los organismos que presentan el sistema inmune más complejo, es el encargado de la defensa del organismo contra agentes infecciosos. Una respuesta inmune específica, como la producción de anticuerpos contra un patógeno en particular, se conoce como respuesta inmune adaptativa porque esta ocurre durante el tiempo de vida de un individuo como una adaptación a la infección con ese patógeno. En muchos casos, una respuesta inmune adaptativa confiere inmunidad a la reinfección con el mismo patógeno y está difiere de la respuesta inmune innata (Janeway, 2005).

El sistema inmune innato es la primera línea de defensa contra patógenos, además contra daños químicos, físicos y fisiológicos, varias reacciones se encargan de reparar el daño o aislarlo y mantener la homeostasis (Fernández-Real, 2007). Sus principales componentes son barreras físicas y químicas, como los epitelios y las sustancias antimicrobianas sintetizadas en las superficies epiteliales; células fagocíticas (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas) y linfocitos citolíticos naturales (NK); proteínas de la sangre, que incluyen componentes del sistema del complemento y citocinas (Abas, 2005). La respuesta inmune innata combate un amplio rango de patógenos a los que se expone por primera vez. Las acciones del sistema inmune innato son un prerrequisito para el desarrollo de la inmunidad adaptativa y las células involucradas en la inmunidad innata también participan en las respuestas inmunes adaptativas (Janeway, 2005).

III.2 Factor inhibidor de la migración de macrófagos

Es una citocina pleiotrópica proinflamatoria producida por distintas células inmunes como monocitos, macrófagos, células T activadas, células B, células dendríticas, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos y basófilos (Calandra, 2003; Cvetkovic, 2006). MIF también es producido por células no inmunes tales como células troncales, células de la glándula pituitaria anterior, monocitos cardiacos, células parenquimales del hígado, el pulmón, cerebro, riñón, células β del páncreas y adipocitos (Cvetkovic, 2005 y 2006, Waeber, 1997; Hirokawa, 1997; Sakue, 1999). Esta citocina tiene un amplio espectro de funciones entre las que se encuentran: 1) mantener *in situ* a los macrófagos en el sitio de infección y, directa o indirectamente, promueve la producción de un amplio panel de citocinas proinflamatorias (IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6 e IL-8), otros mediadores de la inflamación (COX2, PGE2) y la producción de óxido nítrico (Calandra 2003). Así mismo MIF promueve la expresión de moléculas de adhesión celular como ICAM-1, VCAM-1, quimiocinas como MCP-1 que atraen a los monocitos al área inflamada (Toso, 2008). Además de disminuir la apoptosis en macrófagos y promover la proliferación de linfocitos T (figura 1).

Los receptores reconocidos para MIF son las moléculas CD74 y JAB1 , CD74 se encuentra representado en la cadena invariante del MHC-II y JAB1 es una proteína intracelular con función de coactivador transcripcional. La interacción de MIF con éstas moléculas conlleva acciones intracelulares que incluyen la activación de las vías de señalización de NF- κ B y ERK/2 y la inhibición de la expresión de p53 (Cvetkovic, 2006; Roger, 2005).



(Toso, 2008)

Figura 1. Principales funciones de MIF. (Modificado de Toso, 2008).

Por otro lado, MIF se expresa en diversas patologías como: aterosclerosis, glomérulonefritis, esclerosis múltiple, colitis crónica, endometriosis, artritis reumatoide y pancreatitis (Leech, 1999; Rahman, 2007; Mikulowska, 1997; Morand, 2002; Cvetkovic, 2006). Recientemente se ha encontrado en el suero de pacientes con D-2 niveles incrementados de esta citocina, lo que sugiere que MIF juega un papel significativo en esta enfermedad (Herder, 2006).

III.3 Diabetes

La Diabetes es uno de los padecimientos que tiene mayor incidencia y mortalidad tanto a nivel mundial como en México (Islas y Revilla, 2005). Es sin lugar a dudas un problema de salud pública creciente, pues se espera que para el 2025 en México la incidencia de diabetes sea del 12.3% (King, y col., 1998). Actualmente el país cuenta con mas de 106.7 millones de habitantes (INEGI, 2008), esto significa que para el 2025 habrá más de 12.8 millones de personas con diabetes (figura 1). Por tratarse de un padecimiento incurable, las personas enfermas deben recibir atención durante toda su vida, lo cual determina que los costos asociados al tratamiento y sus complicaciones representen una grave carga tanto para los pacientes como para los servicios de salud (Tapia, 2006).

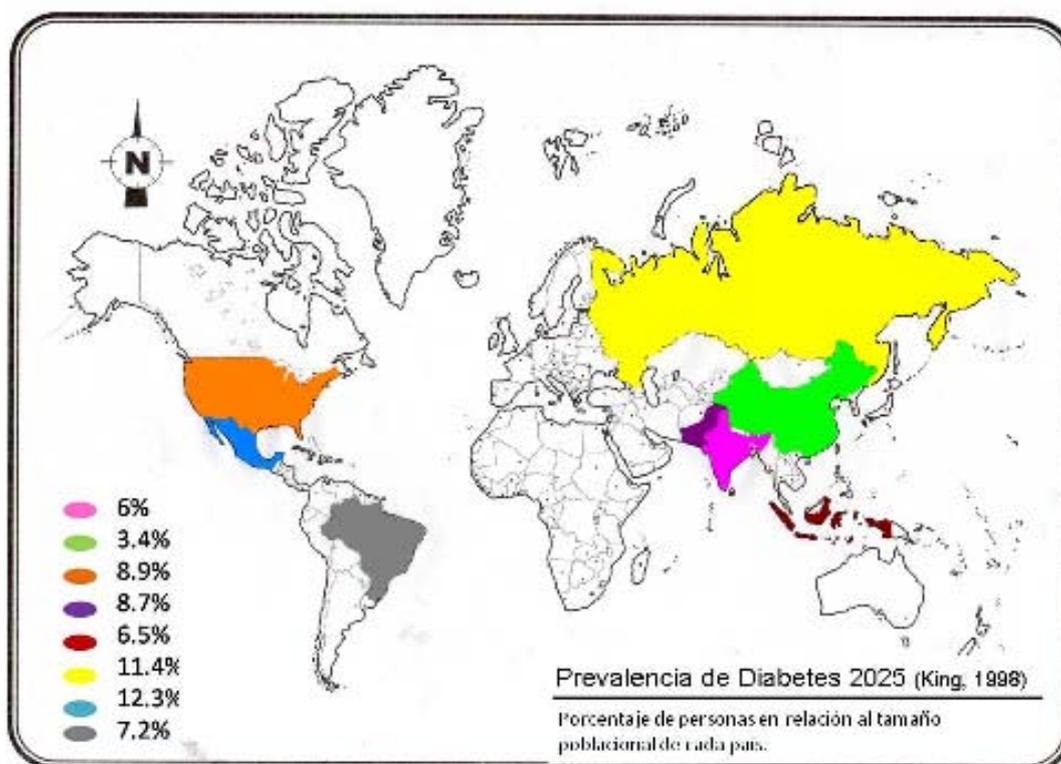


Figura 1. Prevalencia mundial de Diabetes. Los países con mayor número de personas con diabetes en el 2025 serán: India (rosa), China (verde), E.U.A. (anaranjado), Pakistán (morado), Indonesia (rojo), La Federación Rusa (amarillo), México (azul) y Brasil (gris).

La diabetes es una enfermedad sistémica crónico-degenerativa, caracterizada por el aumento de los niveles de glucosa sanguínea (hiperglucemia), causada por un defecto (completo o no) en la secreción o acción de la insulina. Los síntomas de la diabetes son: poliuria, polidipsia, polifagia y pérdida de peso. Si la diabetes no se controla adecuadamente surgen complicaciones crónicas mayores como son: enfermedades cardiovasculares, retinopatías, nefropatías, úlceras de pies y varias neuropatías autonómicas y sensoriomotoras. La diabetes es la causa más importante de amputación de miembros inferiores de origen no traumático y los problemas que de ello se derivan (Tapia 2006).

En breve, la principal fuente de energía de todas las células es la glucosa, ésta entra por medio de proteínas que facilitan su entrada. Dichas proteínas se dividen en dos familias SGLT y GLUT (SGLT-del inglés sodium/glucose transporter; GLUT-del inglés glucose-Transporter), los SGLT son cotransportadores dependientes de sodio y se encuentran principalmente en el riñón y el intestino. Existen trece transportadores GLUT que se diferencian por su estructura, grado de afinidad a la glucosa y los órganos en los que se expresan. GLUT-4 se expresa en tejidos adiposo y muscular, y es importante en la diabetes porque su expresión está regulada por la insulina (Zhao, 2007).

La insulina es una hormona sintetizada por las células β de los islotes del Langerhans que se encuentran en el páncreas, formando la parte endócrina de este. La insulina viaja a través del torrente sanguíneo para llegar a sus células blanco, tejido muscular y tejido adiposo. Donde se une a su receptor, desencadenando una secuencia de fosforilaciones sucesivas cuyo resultado final es la expresión de genes que codifican para la síntesis de moléculas transportadoras de glucosa (GLUT-4) y enzimas que intervienen en la formación del glucógeno (Kahn and Flier, 2000). Cuando este mecanismo falla se origina la patología.

Una de las características fundamentales de la deficiencia de insulina (debido a la falta de ésta o intolerancia en su acción) es la disminución de la entrada de glucosa a los tejidos. También aumenta la liberación neta de glucosa del hígado debida, en parte, al exceso de glucagon. La hiperglucemia resultante ocasiona glucosuria y diuresis osmótica deshidratante. La deshidratación ocasiona polidipsia. En presencia de deficiencia intracelular de glucosa, se estimula el apetito, se forma glucosa a partir de proteína y los suministros energéticos se mantienen por el catabolismo de proteínas y grasas. El resultado es la pérdida de peso, deficiencia debilitante de proteínas e inanición.

El catabolismo de los lípidos se intensifica y el sistema es sobrecargado con triglicéridos y ácidos grasos libres. La síntesis de grasa es inhibida y la sobrecarga de las vías metabólicas no puede manejar el exceso de acetil-CoA que es generada. En el hígado, la acetil-CoA se convierte en cuerpos cetónicos. Dos de éstos son ácidos orgánicos (ácido β -hidroxybutírico y acetoacetato) y la acidosis metabólica aparece conforme se acumulan las cetonas. Por último el paciente o animal acidótico, hipovolémico, hipotenso y agotado cae en coma por los efectos tóxicos de la acidosis, la deshidratación y la hiperosmolaridad en el sistema nervioso y muere si no se inicia el tratamiento (Ganong, 2004).

III.4 Tipos de Diabetes

La Organización Mundial de la Salud (OMS) distingue dos tipos principales de diabetes: diabetes tipo 1 o insulino-dependiente y diabetes tipo 2 no insulino-dependiente. En 1996 y 1997 el comité de la Asociación Americana de Diabetes propuso abolir los términos insulino-dependiente y no insulino-dependiente sustituyéndolos solo por tipo 1 y tipo 2 respectivamente (LeRoith y col., 2004). De acuerdo a la Asociación Americana de Diabetes los criterios que distinguen a ambos tipos de diabetes son los siguientes:

La diabetes tipo 1 (D-1) es causada por la destrucción de las células β del páncreas, mediado por el sistema inmune que conlleva a una deficiencia parcial o absoluta en la secreción de insulina. Los agentes etiológicos que causan el proceso autoinmune y la destrucción de las células β aun no se han establecido, se caracteriza por hiperglucemia y cetoacidosis. Representa entre el 5%-10% de los casos con diabetes a nivel mundial (LeRoith y col., 2004).

La diabetes tipo 2 (D-2) es causada por una combinación de factores genéticos y no genéticos como edad avanzada, alta ingesta de calorías, sobrepeso, adiposidad central, estilo de vida sedentario y bajo peso al nacer (LeRoith y col., 2004) que resultan en un decremento en el transporte y metabolismo de la glucosa estimulado por insulina en músculo esquelético y adipocitos además de daño en la supresión de la producción de glucosa hepática (Kahn, 2000). En contraste con la D-1, ésta no depende de insulina exógena para la prevención de la cetonuria y los pacientes no son propensos a sufrir cetosis. Comprende aproximadamente entre el 90%-95% de los casos con diabetes (LeRoith y col., 2004).

Las bases para el diagnóstico de la D-2 son: típicamente personas mayores de 40 años de edad, obesidad, poliuria, polidipsia, a menudo pocos síntomas o nulos, después de un ayuno de toda la noche una glucemia de 126 mg/100 ml o mayor en más de una ocasión;

en la prueba de tolerancia a la glucosa, después de la administración de 75 g de glucosa, oral, los valores de diagnóstico son de 200 mg/100 ml o más, 2 horas después de la administración de la glucosa, a menudo se acompaña de hipertensión y dislipidemia (Tapia, 2006).

III.5 Sistema inmune y diabetes tipo 2 (D-2)

La D-2 ha sido relacionada con una activación general del sistema inmune innato, esta enfermedad se asocia a un estado de bajo grado de inflamación mediado por citocinas. Muchas proteínas de la fase aguda son incrementadas en la D-2 y muestran un gradiente de incremento con la aparición de las características del síndrome metabólico (Fernández-Real, 2007). La respuesta de fase aguda es aquella que se produce cuando una bacteria entra en el organismo, esta involucra la síntesis de proteínas por el hígado y su secreción al plasma sanguíneo como respuesta a la estimulación de citocinas como IL-1, IL-6 y TNF- α sobre los hepatocitos.

Los macrófagos producen estas citocinas para promover la defensa al organismo por medio de un aumento en la temperatura corporal (acción en el hipotálamo), promoviendo la movilización de neutrófilos e incrementando la producción de proteínas de la fase aguda como se menciono anteriormente. Estas proteínas son: manosa ligada a lectina, fibrógeno, proteína de suero amiloide, proteína C reactiva, SP-A y SP-D, las cuales activan el complemento y promueven la opzonización (Janeaway, 2005).

Mas de 20 estudios realizados por Schmidt y col. (1999) muestran que sujetos inicialmente no diabéticos, con concentraciones circulantes de marcadores inflamatorios como proteína C reactiva, ácido siálico e IL-6 son predictores independientes para el futuro desarrollo de D-2 (Fernández-Real, 2007). Aunado a esto la obesidad está fuertemente relacionada con la propensión a desarrollar D-2. Se sabe que los depósitos de grasa blanca no son masas inertes, si no que realmente son tejidos que secretan varias sustancias (adipocinas), entre las cuales se haya la leptina y la adiponectina que aumentan la sensibilidad a insulina, la resistina y el TNF- α que promueven la resistencia a esta (Ganong, 2004).

Recientemente se ha asociado la obesidad con una respuesta inflamatoria crónica, donde MIF es uno de los principales mediadores de citocinas como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, TGF- β , que están involucradas en la respuesta inflamoria. Se ha observado que adipocitos de donadores obesos *ex vivo*, secretan altos niveles de MIF en comparación con adipocitos de donadores no obesos, al mantener la glucosuria normal de los pacientes obesos

decrecieron significativamente sus concentraciones de MIF en plasma. Sin embargo, la relación causal entre obesidad y la producción de MIF aun no ha sido firmemente establecida (Toso, 2008). Resultados de Herder y col (2006) indican que MIF está asociado con el daño en la tolerancia a la glucosa y la D-2, mostrando que su concentración en suero es mucho mayor durante la patología, incluso en comparación con los marcadores utilizados habitualmente para esta enfermedad, como son proteína C reactiva e IL-6.

III.6 Modelo de diabetes experimental

Para la inducción de diabetes se utilizó una sola dosis de estreptozotocina (STZ; N-nitroso derivado de glucosamina) (figura 5), toxina extraída de la bacteria *Streptomyces acromogenes*. Es una toxina que actúa directamente en las células β del páncreas en concentración alta, induce necrosis irreversible, razón por la cual ha sido utilizada para generar D-1 en modelos animales administrada en múltiples dosis de cantidades bajas. Recientemente fue utilizada para desarrollar un nuevo modelo de diabetes no insulino dependiente con una sola dosis subdiabetogénica (100 mg/kg) en ratones ICR (Ito, 2001). Nosotros retomamos el modelo utilizado ratones con distinto fondo genético, BALB/c.

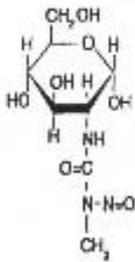


Figura 5. Estructura molecular de la estreptozotocina (Bolzán, 2002)

IV. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades crónicas se han convertido en uno de los problemas de salud pública más importantes a nivel mundial y en México, debido a su alta prevalencia, los costos de su tratamiento y de la prevención de las complicaciones. Los cambios en el comportamiento humano en cuanto a los hábitos alimenticios y el estilo de vida en el último siglo han provocado un gran incremento de la incidencia mundial de diabetes, sobre todo la tipo 2.

El estudio experimental de esta patología es difícil, pues la mayoría de los modelos en animales se basan en la manipulación genética, por lo tanto es necesario el establecimiento de un modelo experimental de esta enfermedad que se acerque a la patología que ocurre en el humano.

Dado que el conocimiento acerca de la asociación entre la D-2 y MIF aún es escaso, es claro que se requiere profundizar en la investigación para saber de qué manera está actuando MIF en la enfermedad.

V. HIPOTESIS

Dadas las observaciones previas, en donde se reconoce a MIF como una molécula promotora de la producción de citocinas proinflamatorias y la D-2 se ha asociado a un bajo grado de inflamación crónica. Además las evidencias de que MIF se sobreexpresa en el suero de pacientes con D-2, nosotros proponemos que:

MIF participa en la génesis y patología de la D-2 murina a través de la promoción de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL_6 e IL-1b) involucradas en la resistencia a la insulina

VI. OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento de la participación del Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF) en la Diabetes tipo 2, en un modelo murino.

VI.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Continuar desarrollando el modelo de D-2 de desarrollo progresivo en ratones con fondo genético BALB/c estableciendo la dosis de STZ para esta cepa.
2. Identificar la existencia de hiperglucemia en los ratones MIF+/+ y MIF-/- con D-2.
3. Registrar las manifestaciones clínicas de la D-2 entre los ratones MIF-/- y MIF+/+ con D-2 (consumo de alimento, agua y producción de orina).
4. Determinar los principales parámetros de diagnóstico clínico en la D-2, en este modelo experimental.
5. Determinar si existen diferencias funcionales entre los ratones MIF-/- y MIF+/+ con D-2 en la prueba de tolerancia a la glucosa.
6. Determinar la expresión de insulina en los islotes pancreáticos por RT-PCR y en suero por la técnica de ELISA.
7. Caracterizar la expresión de citocinas proinflamatorias en suero entre los ratones MIF-/- y MIF+/+ con D-2.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

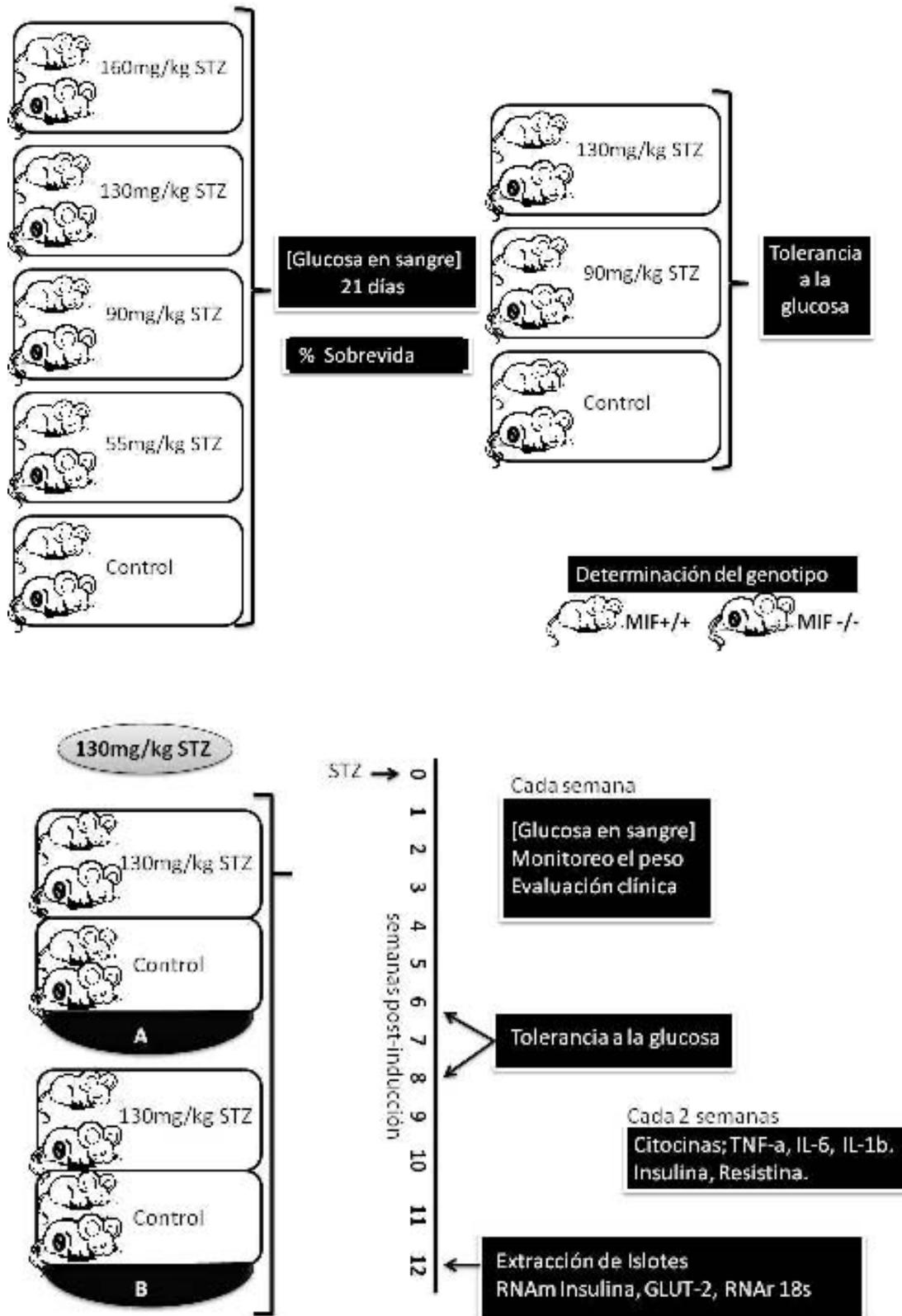


Figura 2. Diagrama general de la metodología. Establecimiento de la dosis de STZ (A). Grupos experimentales para la evaluación de la D-2 en los ratones MIF+/+ y MIF-/- (B).

VII.1 Determinación del genotipo por PCR

VII.1.1 Extracción de DNA

Para generar y evaluar el desarrollo de la D-2, se usaron ratones macho de 8 semanas de edad con fondo genético BALB/c, modificados para que no cuenten con el gen que codifica para MIF (MIF^{-/-}) y como controles se usaron ratones silvestres del mismo fondo genético y edad (MIF^{+/+}). Los ratones MIF^{-/-} fueron donados por el Dr. David de la Escuela de Salud Pública de Harvard y han sido mantenidos en el bioterio de la FES-I por varias generaciones. Se verificó el genotipo para determinar la pureza de la colonia, de la siguiente manera:

Utilizando guantes, material nuevo y estéril libre de DNAsas-RNAsas, se obtuvo aproximadamente 0.5 cm de la parte final de la cola de cada uno de los ratones experimentales, la cola fue colocada en tubos Eppendorf (NEPTUNE) de 1.8 ml, marcados previamente, para llevar a cabo la digestión del tejido agregando 500ul de buffer de lisis (apéndice 1) y 20 μ l de proteinasa K (IN VITROGEN 100 μ g/ μ l), dejando incubar toda la noche a 55°C.

Posteriormente se centrifugó a 11,000 rpm durante 10 min, se recuperó el sobrenadante con micropipeta y se colocó en tubos Eppendorf con 500 μ l de isopropanol frío, invirtiéndolos de manera suave hasta hacer evidente la precipitación del DNA. Se centrifugó nuevamente a 11000 rpm durante 5 segundos para precipitar el DNA, se decantó el sobrenadante para proceder a lavar la pastilla de DNA con etanol frío al 75%, en el mismo tubo se resuspendió la pastilla y fue centrifugando nuevamente a 11,000 rpm durante 5min el sobrenadante se desechó, dejando evaporar el etanol del tubo a temperatura ambiente, mínimo 1 hora. Posteriormente la pastilla se resuspendió en 200 μ l de H₂O mili Q (todo marca SIGMA).

VII.1.2 Amplificación del gen

Se utilizaron los desoxiligonucleotidos específicos referidos en el apéndice 2 para el reconocimiento del gen MIF. En tubos nuevos libres de DNAsas-RNAsas de 0.2 ml, se llevó a cabo la reacción con un volumen final de 25 μ l colocando los siguientes reactivos (Kit Red-Taq DNA polimerase, SIGMA) en el siguiente orden:

		Para MIF	Para NEO
Buffer	10x	2.5 μ l	2.5 μ l
dNTP's	10mM	0.5 μ l	0.5 μ l
F	15pM	5.6 μ l	5.6 μ l
R	15pM	4.1 μ l	4.1 μ l
Red-Taq	2.5 U/ μ l	0.5 μ l	0.5 μ l
H ₂ O	(Sigma)	10.8 μ l	10.8 μ l
Muestra de DNA		1 μ l	1 μ l

Una vez listos los tubos con sus respectivos reactivos se colocan en el termociclador (BIOER XP CYCLER) con la temperatura de alineación correspondiente (apéndice 2).

VII.1.3 Electroforesis

Se utilizó un gel de agarosa (ICN BIOCHEMICALS) 1% en buffer TBE 1x (apéndice 1) sobre una cámara molde y un peine de 13 pozos, que se mantuvo a 4°C por 15 min para que solidificara.

A cada uno de los tubos se les agregó 5 µl de buffer de carga blue Juice con Sybr-Green (IN VITROGEN) una vez mezclados se tomaron 8 µl de la muestra y se colocaron en el gel a partir del segundo pozo, dejando el primero para colocar 3 µl de marcador de peso molecular 100 pb (IN VITROGEN). Las muestras fueron colocadas en la cámara hacia el extremo positivo y se corrió a 90 volts, 200 mA durante 40 min. Se capturó la imagen con el equipo fujifilm Fla 5000.

VII.2 Inducción de diabetes

La diabetes fue inducida en ratones macho BALB/c (MIF+/+ y MIF-/-) de 8 semanas de edad en ayuno de 5 horas. Con el fin de establecer claramente la dosis adecuada de estreptozotocina (STZ) para el modelo experimental, se hicieron varios grupos con distintas dosis de STZ. Se administraron vía intraperitoneal las siguientes dosis 55, 90, 130 y 160 mg/kg de STZ disuelta en buffer de citratos (0.05M) con pH de 4.5 recién preparado. Al grupo control se le administró el equivalente en volumen de buffer de citratos (0.05M a pH 4.5). Una vez establecida la dosis se administró 130 mg/kg, en dos experimentos independientes denominados A y B. En estos se le midieron todas las variables establecidas en el protocolo.

VII.3 Concentración de glucosa en sangre

Cada semana, posterior a la inducción de la diabetes, se midió la glucosa sanguínea en ayuno de 5 horas utilizando las tiras reactivas y sensor Accu-Chek. Se cortaron 0.2 cm de cola y la gotita de sangre se colocó en la tira reactiva.

VII.4 Sobrevida

La sobrevida de los ratones inyectados con 160 mg/kg de STZ MIF+/+ y MIF-/- se hizo mediante monitoreo visual diario en el bioterio, durante 21 días posteriores a la inducción. En el caso de las otras dosis, los grupos sobrevivieron completamente las 12 semanas de la fase experimental.

VII.5 Evaluación clínica

Antes de administrar la dosis de estreptozotocina o ácido cítrico para el grupo control, se pesó a los ratones. Se colocaron en cajas metabólicas (3 ratones por caja), se pesó la cantidad de alimento colocado en la caja (70 g), así como la cantidad de agua (100 ml) y después de 24 horas se volvió a pesar para restar este valor y obtener el alimento y agua consumidos después se sacó el promedio por ratón. Se midió el volumen de orina producida después de 24 horas.

VII.6 Parámetros en orina

Se determinaron los principales parámetros de diagnóstico clínico en orina. Semanalmente después de la inducción con STZ, se utilizó la prueba Combur 10 Test M que consiste en una tira reactiva para determinar densidad, pH, leucocitos, nitrito, proteínas, glucosa, cetonas, urobilinógeno, bilirrubina, sangre y hemoglobina en la orina.

VII.7 Prueba de tolerancia a la glucosa

Se llevó a cabo a la a la semana ocho (experimento A) y a la semana seis (para el experimento B) después de la inducción. En ayuno de 5 h se administró una carga de glucosa vía oral a cada uno de los ratones (1.5 g/kg) y se monitorearon los niveles de glucosa 30 minutos antes, 30, 60 y 120 minutos, cortando 0.25 cm de la cola del ratón al inicio para obtener una gota de sangre y ponerla en la tira reactiva y sensor Accu-Chek. Después de cada media hora no fue necesario hacer mas cortes pues la gotita de sangre se obtuvo de la misma herida.

VII.8 Obtención de islotes pancreáticos y aislamiento de RNAm

Se sacrificó a todos los ratones después de la semana 12 post-inducción. Se extrajo el páncreas, se cortó en pedazos pequeños y se procedió a la digestión, se colocaron en 0.6 mg de colagenasa (WORTHINGTON), se colocó en baño María a 37°C con agitación rápida por 15 min. El punto final de la digestión se determinó de manera visual, cuando no se observaron grumos grandes, y la solución tenía un color café y textura cremosa.

Se lavaron las células y se colocaron en un gradiente de Ficoll (SIGMA) al 27, 23, 20 y 11%, se centrifugó y se recogieron los islotes de la interfase de Ficoll entre 11% y 20%. Por último se pasaron los islotes al tubo Falcon (NEPTUNE) con solución Hanks, se centrifugaron, y se colocaron en una caja petri con medio de Hanks. Se recolectaron los islotes bajo el microscopio de disección y se colocaron en 0.8ml de Trizol (IN VITROGEN) para aislar el RNAm, con precipitación en isopropanol. La cantidad de RNA total se cuantificó por espectrofotometría a 260nm.

VII.9 Obtención de suero para las pruebas de ELISA

Semanalmente posterior a la inducción con STZ se tomaron muestras de suero, después de 5 horas de ayuno se metió a los ratones a una caja de madera con un foco de 60 watts (PHILIPS), visualmente se determinó la dilatación de la vena caudal y se sacaron de la caja, para facilitar el sangrado. Con un bisturí se cortó la vena mas sobresaliente y la sangre (aprox. 500 μ l) fue colectada en tubos Eppendorf, se quitó el coágulo y se centrifugó el sobrenadante 2 veces a 3,500rpm durante 10min. Los sueros fueron congelados a -70°C hasta su procesamiento por ELISA.

VII.9.1 Cuantificación de TNF-a, IL-1b, IL-6 y resistina en suero por ELISA

Para todas las citocinas y resistina se utilizó el kit de Prepro Tech Mexico. Se sensibilizó la placa con el anticuerpo de captura anti-IL-1 β , IL-6, TNF- α y resistina, según el caso a una concentración de 2 μ l/ml en solución de pegado (apéndice 1). Se puso 50 μ l en cada pozo de la placa para ELISA. Después se dejó incubar la placa toda la noche a 4°C y al día siguiente se lavó con PBS-Tween (apéndice 1). Se bloqueó la placa con 200 μ l de buffer de bloqueo por pozo, dejando incubar a temperatura ambiente de 1 hora. Nuevamente se lavó la placa y se agregó 100 μ l por pozo de los estándares y las muestras de la placa, Se cubrió la placa y se dejó incubar a 4°C toda la noche. Posteriormente se lavo la placa con PBS-Tween y se añadió el anticuerpo biotinilado (dilución de 1 μ l de anticuerpo con 1ml de buffer de bloqueo). Se cubrió la placa y se dejó incubar 1 hora a temperatura ambiente, se lavó la placa y se agregó la estreptavidina (dilucion 1:4000) añadiendo 100 μ l por pozo. Se cubrió la placa y se dejó incubar 30min a temperatura ambiente. Se lavó por ultima vez y se añadio 100 μ l del sustrato ABTS (apéndice 1). Se incubo de 5-30min, finalmente se leyó la placa en el lector de ELISA Thermo Labsystems, Multiskan Ascent a 405nm.

VII.9.2 Cuantificación de insulina en plasma por ELISA

Se utilizó y siguió el protocolo del Kit de insulina (LINCO RESEARCH). Se lavó cada uno de los pozos de la placa 3 veces, con 300 μ l de Wash Buffer. Se añadió 10 μ l de Assay Buffer a los pozos NSB y se agregó 10 μ l de solución Matriz a los pozos BSB.

La curva patrón se hizo por duplicado con 10 μ l de Rat Insulin Standards en orden de concentraciones ascendentes para los pozos correspondientes. Se añadió 10 μ l de muestra en los pozos sobrantes. En todos los pozos se colocó 80 μ l de anticuerpo de detención. Se dejó incubar la placa a temperatura ambiente por un lapso de 2 horas en un plato agitador a 400-500 rpm.

Después se lavaron los pozos con buffer de lavado y se agregó 100 µl de enzima a cada pozo. Se dejó incubar 30 min y se lavó nuevamente los pozos. Por último se añadió 100 µl de solución sustrato y al cabo de 15 min se agregó 100 µl de la solución para parar la reacción. Se leyó la placa en el lector de ELISA Thermo Labsystems, Multiskan Ascent utilizando un filtro de 450 nm y a los 5 minutos se leyó nuevamente a 590 nm. Las diferencias se registraron en absorbancia.

VII.10 Ensayo de RT-PCR para RNAm de insulina

VII.10.1 Cuantificación de RNAm.

Del RNAm obtenido de los islotes se sintetizó cDNA de cadena sencilla con 1mg de RNA total, por medio de la reacción de transcripción reversa. La expresión relativa de insulina se evaluó por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), determinando la expresión del RNA ribosomal 18S como gen de referencia endógena.

VII.10.2 PCR para insulina, GLUT-2 y RNAr 18S

Se utilizaron los desoxioligonucleotidos específicos referidos en el apéndice 2 para el reconocimiento del cDNA para insulina, GLUT-2 y RNAr 18S. Se utilizaron tubos nuevos libres de DNAsas-RNAsas de 0.2 ml, para llevar a cabo la reacción con un volumen final de 25 µl colocando los reactivos (Kit Red-Taq DNA polimerase, SIGMA) en el siguiente orden:

		Para insulina	Para GLUT-2	Para RNAr 18S
Buffer	10x	2.5µl	2.5µl	2.5µl
Mg (50mM)		1.25µl	1.25µl	1.25µl
dNTP's	10mM	1µl	1µl	1µl
F	15pM	0.25µl	0.25µl	0.25µl
R	15pM	0.25µl	0.25µl	0.25µl
Red-Taq	2.5 U/µl	0.25µl	0.25µl	0.25µl
DMCO		0.25µl	0.25µl	0.25µl
Muestra de cDNA		2.5µl	2.5µl	2.5µl

Una vez listos los tubos con sus respectivos reactivos se colocan en el termociclador (Bioer Xp cycler) con la temperatura de alineación mencionada en el apéndice 2.

VII.10.3 Electroforesis

Se utilizó un gel de agarosa (ICN Biochemicals) al 1% en buffer TBE 1x (apéndice 1) sobre una cámara molde y un peine de 13 pozos, que se mantuvo a 4°C por 15 min para que solidificara.

A cada uno de los tubos se agregaron 5 μ l de buffer de carga blue Juice con Sybr-Green (IN VITROGEN) una vez mezclados se tomaron 8 μ l de la muestra y se colocaron en el gel a partir del segundo pozo, dejando el primero para colocar 3 μ l de marcador de peso molecular 100 pb (IN VITROGEN).

Las muestras fueron colocadas en la cámara hacia el extremo positivo y se corrió a 90 volts, 200 mA durante 40 min. Se capturó la imagen con el equipo fujifilm Fla 5000.

VIII. RESULTADOS

VIII .1 Genotipo de los ratones, grupos experimentales

Con el objetivo de asegurarnos de que todos los ratones empleados en el experimento cumplieran con el genotipo establecido, éste fue determinado por PCR. La figura 4 muestra la fotografía de un gel de agarosa representativo de los genes amplificados de los ratones utilizados, al formar los grupos experimentales. Los ratones MIF+/+ (b y c) muestran la expresión del gen que codifica para MIF con un peso molecular de 200 pb, en contraste con los ratones KO o MIF-/- en los cuales se observa una banda amplificada a los 500 pb que corresponden al gen de resistencia a neomicina (gen utilizado para detectar MIF en los ratones KO).

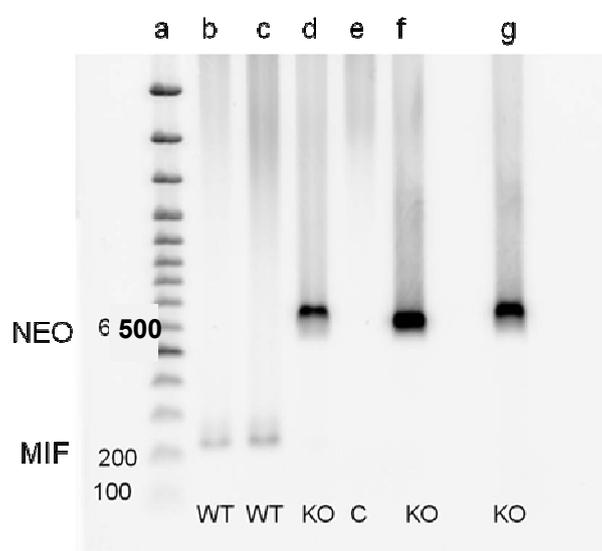


Figura 3. Genotipo. a) marcador de peso molecular, b) y c) ratones WT (MIF+/+), d), f) y g) ratones OK (MIF-/-) con la amplificación del gene para Neomicina, e) control negativo.

VIII.2 Estandarización de la dosis de STZ (curva dosis-respuesta)

Una vez habiendo asegurado el genotipo de los ratones se procedió a establecer la dosis adecuada de STZ, para lo cual se formaron cuatro grupos experimentales; MIF+/+ y MIF-/- con 55 mg/kg, 90 mg/kg, 130 mg/kg y 160 mg/kg (como se muestra en la figura 2). De los cuales se monitoreó la glucemia con 5 horas previas de ayuno, cada siete días, durante un periodo de veintiún días post-inducción (figura 4).

El valor normal de glucemia en los ratones controles tanto MIF+/+ como MIF-/- se mantuvo entre 90 y 110 mg/dl. El único grupo que no mostró diferencias estadísticamente significativas en relación a los grupos control durante todo el experimento, fue el inducido con 55 mg/kg. Por lo que se descarto esta dosis para la inducción de D-2. Los grupos de 130 y 160 mg/kg muestran diferencias estadísticamente significativas desde los siete días

post inducción ($p < 0.061$ y 0.0001 respectivamente). A los catorce días post-inducción los tres grupos (90, 130 y 160 mg/kg) mostraron diferencias en comparación con el grupo control ($p < 0.0094$, 0.0019 y 0.0343). Lo que señala una falta en la respuesta de insulina, debida a la incapacidad de los tejidos para disminuir la concentración de glucosa circulante en sangre.

Este hecho señala que las dosis de 90, 130 y 160 mg/kg STZ pueden general hipoglucemia en menos de 14 días post inducción. Sin embargo, en el grupo inducido con 160 mg/kg STZ los valores de glucosa en sangre aumentan a mas de 450 mg/dl en promedio a los siete días después de la inducción y los ratones mueren antes que en los otros grupos, los MIF+/+ 160 mg/kg sucumben por completo a los 15 días mientras que el 90% de los MIF-/- 160 mg/kg continúan vivos (figura 5).

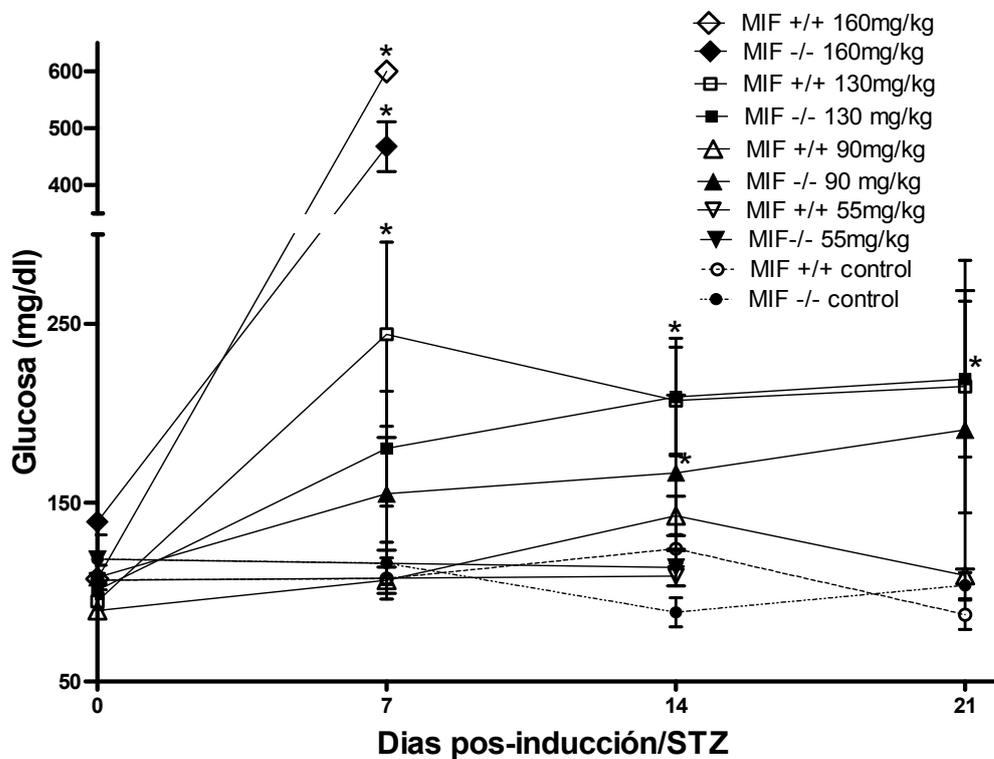


Figura 4. Curva dosis-respuesta. Se observan los niveles de glucosa sanguínea, después de cinco horas de ayuno, por un periodo de 21 días pos-inducción con STZ. (* Estadísticamente significativo en comparación con el control).

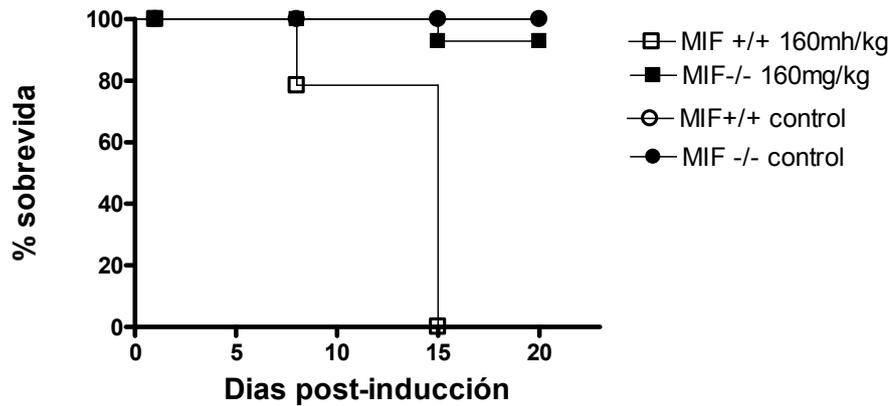


Figura 5. Sobrevida. El grupo inducido con 160 mg/kg STZ, sucumbe a la enfermedad mucho antes que los grupos con dosis mas bajas. Existe una marcada diferencia entre los ratones KO y WT, el 100% de los MIF+/+ mueren, mientras los MIF-/- mantuvieron un porcentaje de sobrevida a los 15 días.

VIII.3 Tolerancia a la glucosa (grupos 90 y 130 mg/kg STZ)

Por lo anterior elegimos al grupo de 90 y de 130 mg/kg para evaluar la respuesta funcional de la insulina para disminuir los niveles de glucosa sanguínea. Después de una dosis vía oral de 1.5 mg/kg, a la semana post-inducción, con cinco horas previas de ayuno se monitoreo los niveles de glucosa en sangre durante dos horas después de la administración de la glucosa. En la figura 6 se puede observar el grupo control (A) de ratones MIF-/- y MIF+/+ que responden adecuadamente al estímulo con glucosa oral, esto es, durante los primeros treinta minutos después del estímulo con glucosa los niveles de glucosa en sangre aumentan y conforme transcurre el tiempo estos van disminuyendo desde una hora después de la administración, debido a que la insulina se une a su receptor y permite la entrada de glucosa a las células. El grupo de 90 mg/kg presento valores de glucemia mayores que los controles. Pero aún así los ratones tanto MIF+/+ 90mg/kg como MIF-/-90mg/kg fueron capaces de responder normalmente a la prueba disminuyendo su glucemia a partir de los 60 minutos (figura 6B). Por el contrario los ratones con 130 mg/kg STZ no fueron capaces de controlar dichos valores (figura 6C), posiblemente esto mediado por una resistencia a la insulina.

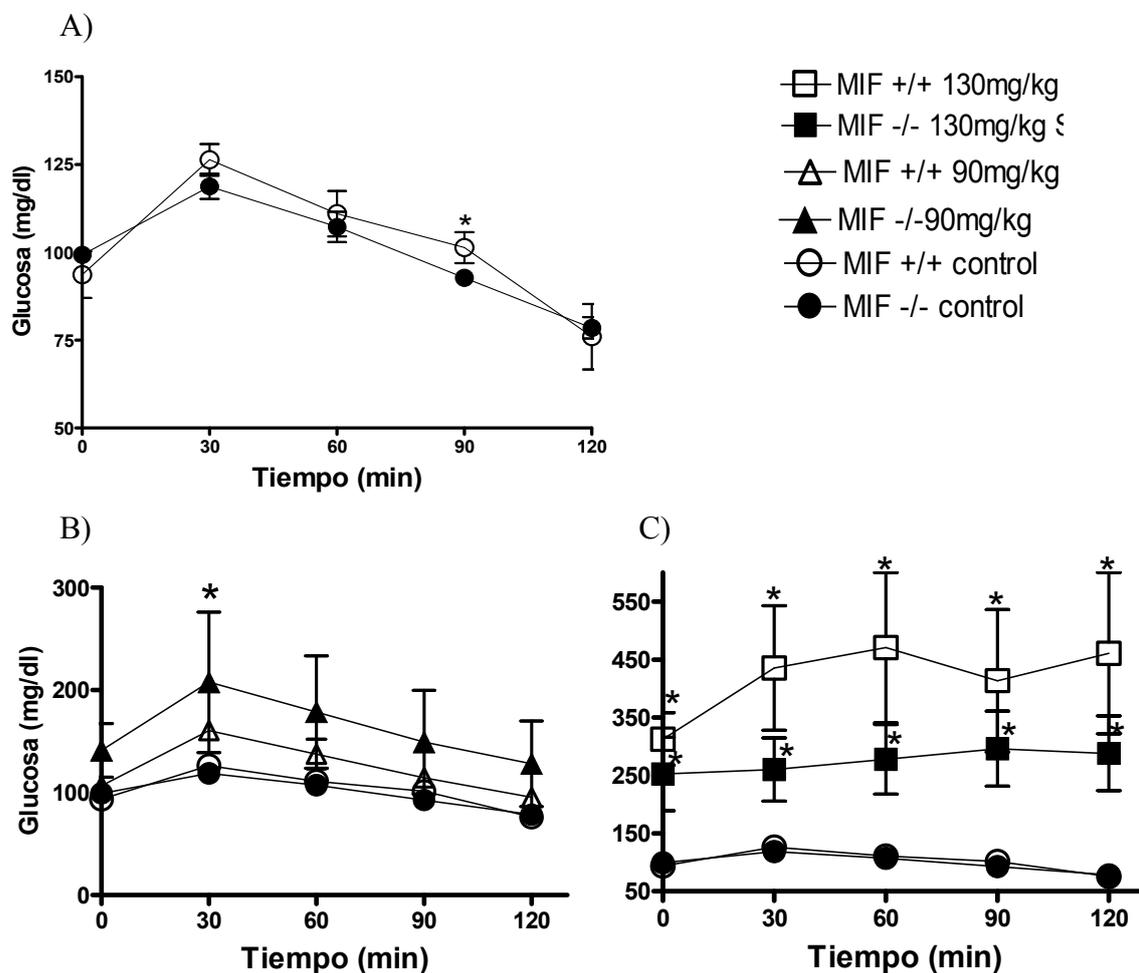


Figura 7. Tolerancia a la glucosa. A) Grupo control, B) Grupo de 90 mg/kg de STZ muestra una curva de comportamiento normal y C) Grupo de 130 mg/kg STZ no disminuyen los niveles de glucosa en sangre.

Estos resultados nos permitieron seleccionar la dosis de 130 mg/kg para la inducción de D-2. Se manejaron dos grupos experimentales (A y B) de 130 mg/kg STZ en los cuales se monitoreó la glucosa sanguínea, peso, evaluación clínica y la prueba de tolerancia a la glucosa. Como se observó un comportamiento similar entre los grupos se juntaron las muestras de suero para medir citocinas, resistina e insulina. También se juntaron los datos de ambos experimentos en lo referente a de la extracción de islotes, la cuantificación de RNAm para insulina y GLUT-2 para poder distinguir claramente las diferencias entre grupos.

VIII.4 Glucosa en sangre del grupo 130 mg/kg STZ

La glucemia se monitoreó durante doce semanas, tiempo de duración del experimento. A continuación se muestran los resultados de dos experimentos denominados A y B. La glucemia (figura 7) se incrementó desde la primera semana post-inducción en ambos experimentos, sin embargo los valores de los ratones MIF+/+ 130 mg/kg y MIF-/- 130 mg/kg tienen un comportamiento muy similar hasta la semana 6. En el experimento A, a la séptima semana los valores de glucosa en sangre del grupo MIF-/- 130m/kg STZ comenzaron a separarse del grupo MIF+/+ 130mg/kg STZ acercándose a los controles. En el experimento B la concentración de glucosa en sangre muestra valores similares en ambos grupos, posiblemente no se observa la diferencia por el rango de desviación estándar (MIF+/+ y MIF-/- 130mg/kg STZ).

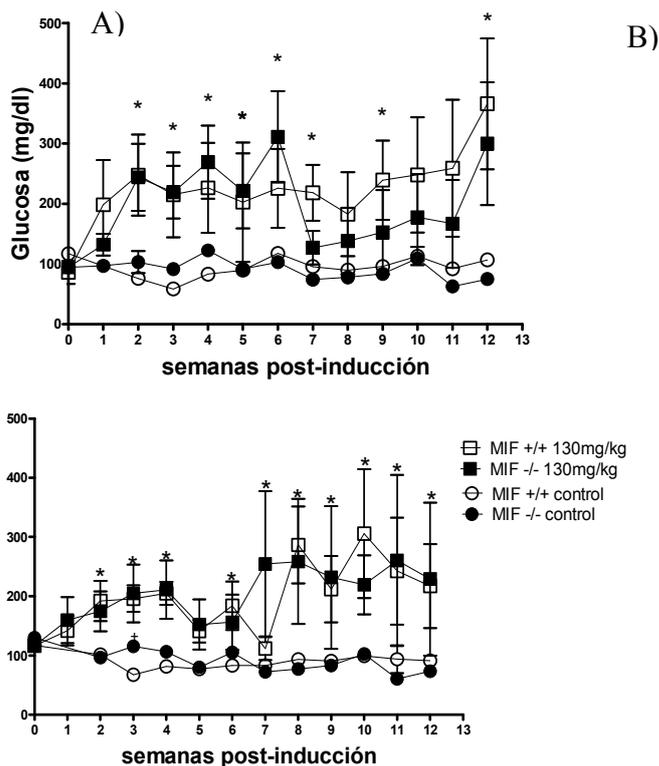


Figura 8. Concentración de glucosa en sangre. Gráficas de dos experimentos independientes A) experimento 1 y B) experimento 2 (* estadísticamente significativo en comparación con el control)

VIII.5 Peso del grupo con 130 mg/kg STZ

El peso se mantiene constante en los ratones inducidos con STZ (figura 9). Los controles MIF+/+ comenzaron a ganar peso (figura 9A) a partir de la semana cinco post-inducción, en

el experimento B se observa que los ratones MIF^{-/-} 130 mg/kg STZ siempre se mantuvieron por abajo del peso en comparación con los otros grupos, sin embargo conservaron su peso a lo largo del experimento.

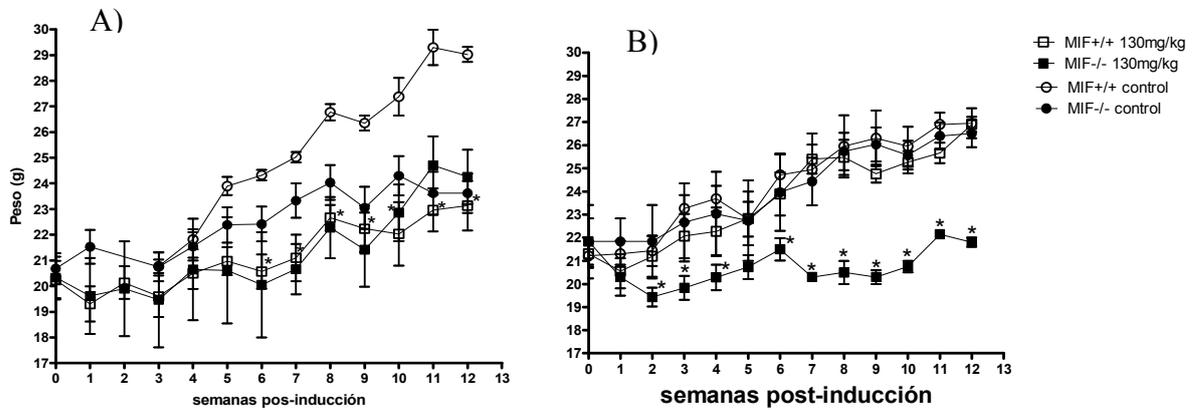


Figura 9. Determinación de peso/ratón. Gráficos representativos de dos experimentos independientes.

VIII.6 Evaluación clínica del grupo 130 mg/kg STZ

La evaluación clínica como se indicó en la parte de material y métodos se determinó con el uso de cajas metabólicas (figura 10) que nos permitieron medir consumo de alimento, consumo de agua y volumen de orina producido. Cada semana se colocó a tres ratones de cada grupo dentro de la caja, se pesó 70 g de alimento y se colocó en el contenedor (figura 8-2). El bebedero se llenó con 100 ml de agua. Después de 24 horas se calcularon los gramos de alimento consumido por ratón y el consumo de agua. El volumen de orina producida a las 24 horas se recolectó en el contenedor (figura 8-4) y se calculó el promedio por ratón. Con tiras reactivas Test-10 se determinó la densidad, el pH, leucocitos, nitritos, proteínas, glucosa, cetonas, urobilinógeno, bilirrubina y hemoglobina.

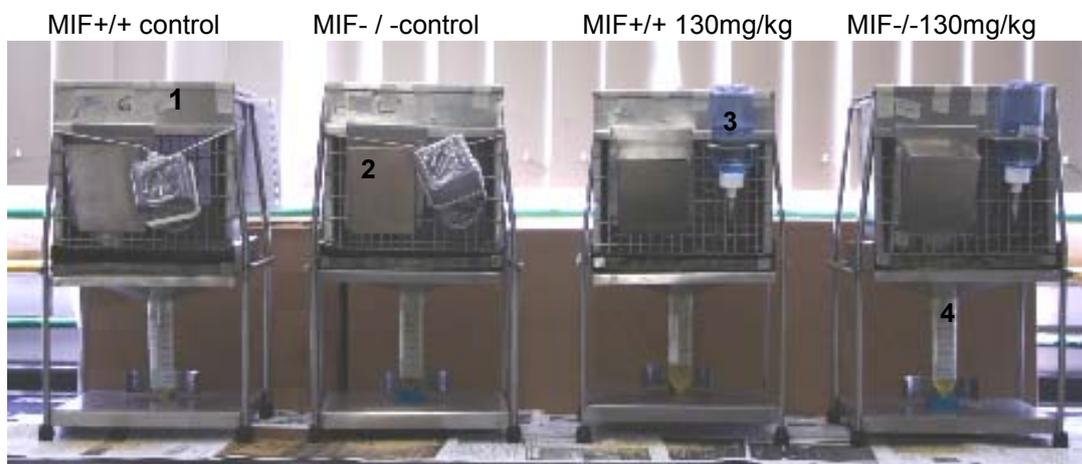


Figura 10. Cajas Metabólicas. Experimento A, semana seis post-inducción. 1) Caja donde se coloca a los ratones (n=3), 2) contenedor de alimento, 3) bebedero y 4) recolector de orina.

El consumo normal de alimento de un ratón es de 6-8 gramos de alimento cada 24. A lo largo de las doce semanas no se observaron diferencias entre el alimento consumido por los grupos experimentales (130 mg/kg STZ) y los grupos control en el experimento A, (figura 11 A). En el experimento B los grupos experimentales (130 mg/kg STZ) mostraron un ligero incremento en el consumo de alimento a partir de la semana siete, donde la tendencia a la polifagia se observa mas en el grupo MIF+/+ 130 mg/kg STZ en comparación con el grupo MIF-/- 130 mg/kg STZ (figura 9B).

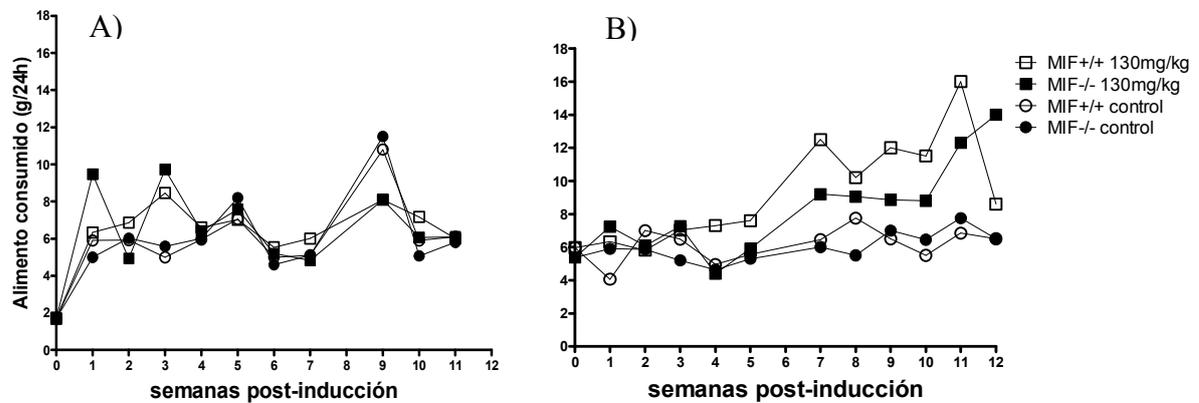


Figura 11. Alimento consumido por ratones tratados con 130 mg/kg STZ y no tratados. Cinética de consumo de alimento de dos experimentos independientes A y B.

Después de la semana seis post-inducción con STZ, se observó un incremento en el consumo de agua en el grupo MIF+/+ 130 mg/kg STZ, lo que determina la polidipsia en contraste con el consumo normal de agua del grupo MIF-/- 130mg/kg STZ (figura 12A). El grupo MIF-/- 130mg/kg STZ del experimento B consumió mas agua que los controles pero en menor cantidad que el grupo MIF-/- 130mg/kg STZ.

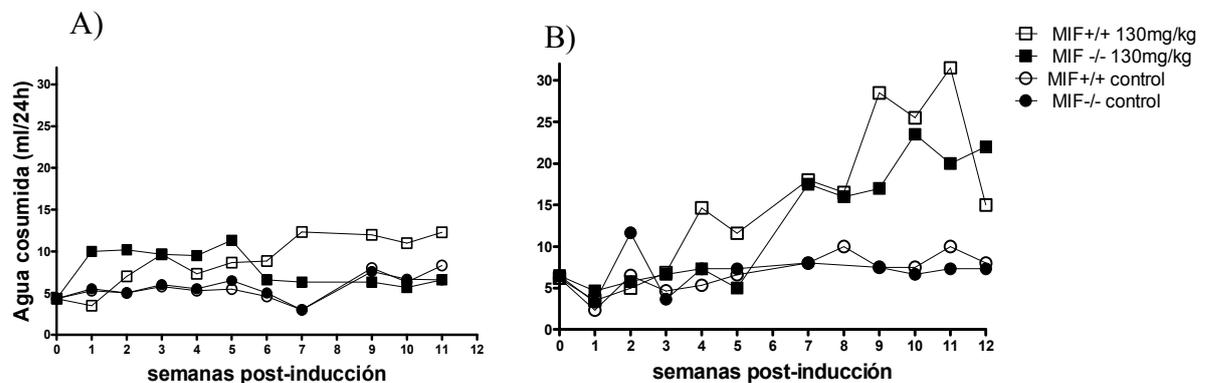


Figura 12. Consumo de agua. Cinética de consumo de agua por ratones tratados con 130 mg/kg STZ y no tratados (controles) de dos experimentos independientes.

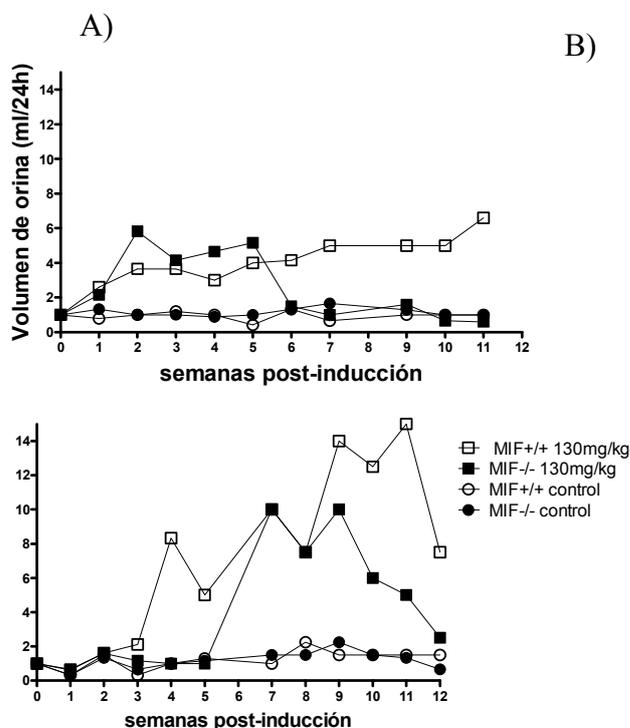


Figura 13. Volumen de orina de los grupos inducidos con 130 mg/kg STZ y controles. Gráficos representativos de dos experimentos A y B.

En lo que refiere al volumen de orina (figura 13) excretado por individuo en un periodo de 24 h, pudimos observar que ambos experimentos muestran que el grupo MIF+/+ 130mg/kg STZ produce un mayor volumen de orina. En el experimento A, el grupo MIF-/- 130 mg/kg STZ volvió a producir una cantidad de orina normal a partir de la semana seis post-inducción y se mantuvo hasta finalizar el experimento.

Igualmente en el experimento B los valores de MIF-/- 130 mg/kg STZ disminuyeron pero de manera gradual, acercándose al valor de los controles en la semana doce.

Los parámetros medidos en la orina de los ratones MIF+/+ y MIF-/- sin tratamiento (tabla 1) como son densidad, pH, leucocitos, nitritos, proteínas, glucosa, cetonas, urobigeno, bilirrubina, sangre y hemoglobina no mostraron cambios durante las doce semanas de duración del experimento.

Parámetro	MIF+/+	MIF -/-
Densidad	1.020	1.020
pH	6	6
Leucocitos	Negativo	Negativo
Nitritos	Negativo	Negativo
Proteínas	Negativo	Negativo
Glucosa	Normal	Normal
Cetonas	Negativo	Negativo
Urobilinógeno	Normal	Normal
Bilirrubina	Negativo	Negativo
Sangre	Negativo	Negativo
Hemoglobina	Negativo	Negativo

Tabla 1. Examen general de orina utilizando el kit Combur 10 Test M. Parámetros medidos en la orina producida 24 horas después de la evaluación en la caja metabólica. Grupos controles.

En los grupos con tratamiento también se midieron todos los parámetros anteriores; sin embargo, en las tablas 2 y 3 se muestran únicamente los que presentaron cambios a lo largo del experimento, como son densidad, pH, proteínas y glucosa.

Se observó que los ratones MIF+/+ tratados con 130 mg/Kg de STZ presentaron mayores concentración de glucosa en orina manteniéndose en 1000 mg/dl las primeras cuatro semanas sin alterar el pH de la orina, a la semana cinco post-inducción hubo una disminución en la concentración de glucosa, pero se encontró la presencia de proteínas. El grupo MIF-/- 130 mg/kg STZ de manera general tuvo una menor cantidad de glucosa en la orina y la presencia de proteínas se encontró una semana después que en los MIF+/+ 130 mg/kg STZ.

Semana	Densidad	pH	Proteínas	Glucosa (mg/dl)
1	1.020/1.020	6/6	-/-	1000 / 100
2	1.020/1.20	6/5	-/-	1000 / 1000
3	1.020/1.015	6/5	-/-	1000 / 1000
4	1.020/1.010	6/7	-/-	1000 / 300
5	1.010/1.015	7/6	+/-	300 / 300
6	1.010/1.015	7/7	+/+	300 / 100
7	1.015/1.015	7/7	+/+	100 / 50
8	1.010/1.010	7/7	-/-	300 / 100
9	1.005/1.025	6/6	-/-	1000 / 100
10	1.015/1.005	5/8	+/+	100 / 50
11	1.015/1.015	5.6/7	-/-	1000 / 300
12	1.015/1.015	5/7	+/-	1000 / 300

Tabla 2. Examen general de orina utilizando el kit Combur 10 Test M. Parámetros medidos en la orina producida 24 horas después de la evaluación en la caja metabólica, experimentos A y B. Grupo MIF+/+ 130 mg/kg STZ/ Grupo MIF-/- 130 mg/kg STZ.

VIII.7 Tolerancia a la glucosa del grupo 130 mg/kg STZ

Se realizó la prueba de tolerancia a la glucosa (figura 14), se monitoreó glucemia en suero a los 0, 30, 60, 90 y 120 minutos después de la administración de glucosa vía oral. En el experimento A la prueba se realizó a la octava semana post-inducción y en el experimento B a la sexta semana, en ambos casos los grupos experimentales no disminuyeron la glucemia aún 120 minutos después del estímulo.

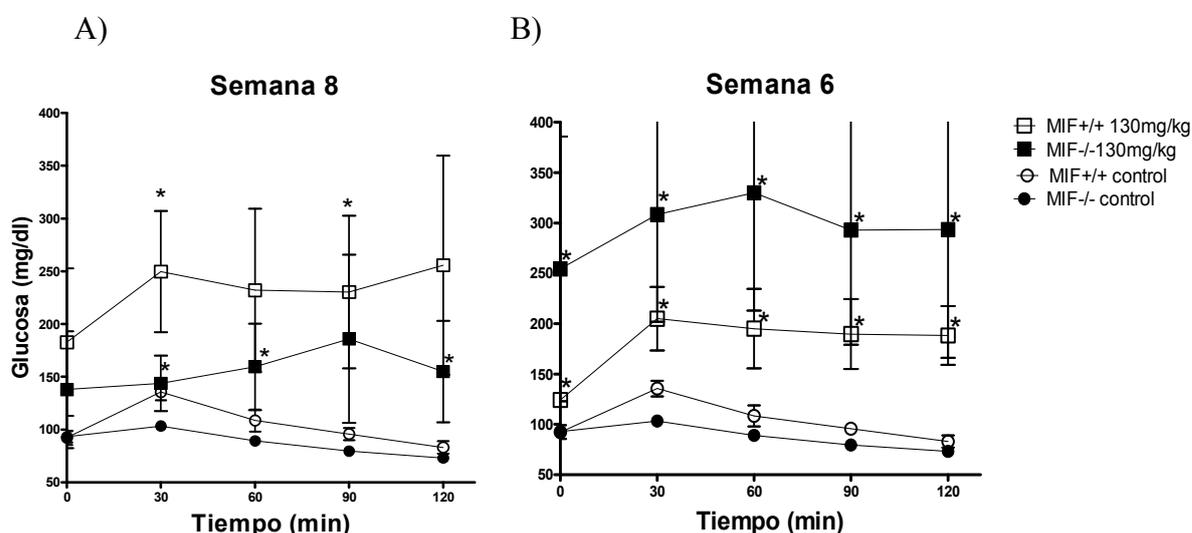


Figura 14. Prueba de tolerancia a la glucosa, en ratones inducidos con 130 mg/kg STZ y no tratados. A) Experimento A; donde la prueba se evaluó a la semana 8 pos inducción. B) Experimento B; evaluada a semana 6 post inducción.

VIII.8 Obtención de islotes y RNAm para GLUT-2 e insulina.

Al cabo de las doce semanas del experimento se sacrificaron a todos los animales y se extrajeron los islotes de Langerhans, como se mencionó en la metodología por medio de un gradiente de Ficoll. En la figura 15 se muestra el gel de agarosa donde se observa la expresión de RNAm para insulina y GLUT-2, así como del RNA ribosomal 18S, éste último se utilizó como factor de comparación. No se observó diferencia significativa entre los ratones tratados con STZ y los no tratados en la expresión de RNAm para insulina y tampoco para GLUT-2 en las células β .

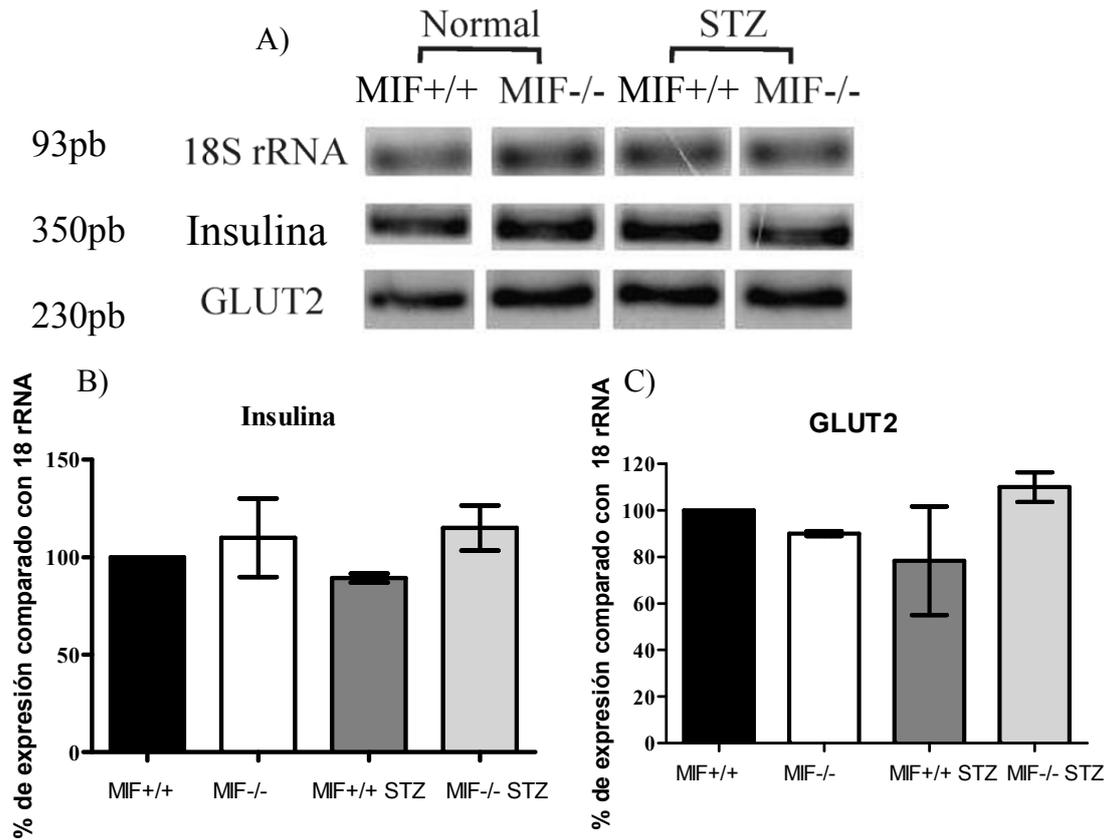


Figura 15. RNAm para insulina. De los islotes a la semana 12 pos-inducción se determino la expresión de insulina, GLUT-2 y rRNA 18S como referencia, electroforesis del gel amplificado por PCR (A). B) Densitometría del gel para insulina y C) densitometría del gel para GLUT-2.

VIII.9 Determinación de citocinas, insulina y resistina en suero del grupo 130 mg/kg STZ

Cada dos semanas se obtuvo suero para monitorear los niveles de citocinas. Se unieron los sueros del experimento A y el experimento B para hacer una sola determinación de TNF- α , IL-6, IL1 β , insulina y resistina.

La figura 16 muestra las concentraciones obtenidas en suero de TNF- α , donde se puede observar un incremento estadísticamente significativo ($p < .0078$) a las cuatro semanas post-inducción del grupo MIF+/+ 130 mg/kg STZ en comparación con el grupo control MIF+/+ y con una $p < .0154$ en comparación con el grupo MIF-/- 130 mg/kg STZ, el TNF- α disminuye a la semana seis post-inducción pero se mantuvo muy por encima de los valores de los controles y del grupo MIF-/- 130 mg/kg STZ.

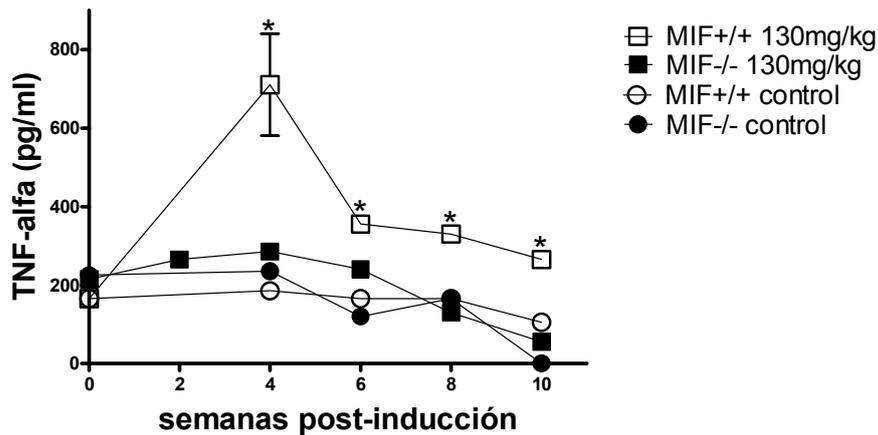


Figura 16. TNF- α . Como puede observarse solo en el grupo MIF+/+ 130 mg/kg STZ tiene valores incrementados de esta citocina, mientras que los ratones MIF-/- 130 mg/kg presentaron valores normales en comparación con el grupo control.

En contraste, no se observaron diferencias entre los grupos tratados con 130 mg/kg STZ y los controles en la producción de IL-1 β (figura 15), pero hay tendencia a una aumentada producción hacia las ultimas semanas por parte del grupo MIF +/+ 130 mg/kg STZ.

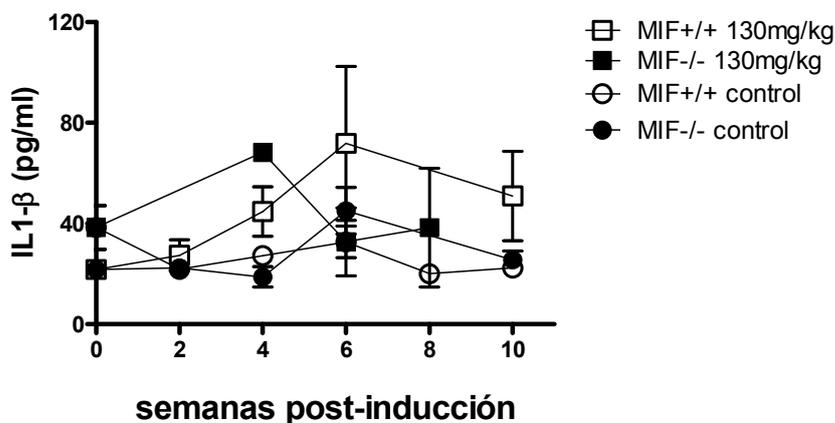


Figura 17. IL-1 β el grupo MIF+/+ 130 mg/kg STZ muestra niveles incrementados de esta citocina.

El comportamiento de la secreción de IL-6 (figura 18) sí mostró un incremento en la producción de esta citocina por parte del grupo MIF+/+ 130 mg/kg STZ, a partir de la semana cuatro post-inducción y se mantuvo hasta la semana diez. El grupo MIF-/- 130 mg/kg STZ presentó valores muy semejantes al grupo control.

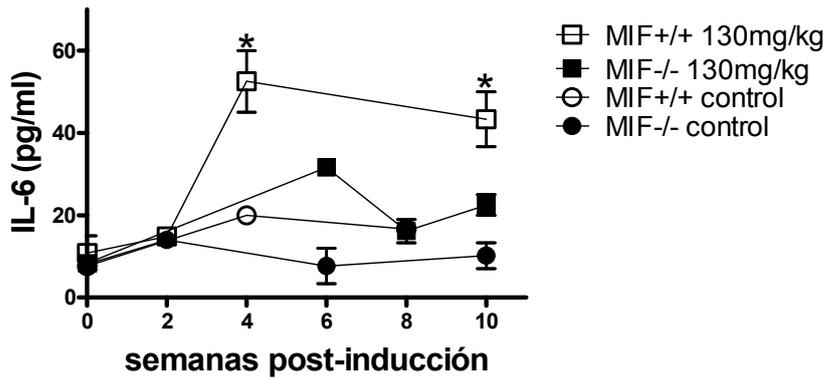


Figura 18. IL-6; el grupo MIF+/+ 130 mg/kg STZ muestra niveles elevados de esta citocina, mientras que en el grupo MIF-/- 130 mg/kg STZ fueron normales.

Los valores de insulina en suero (figura 19) no mostraron diferencias entre los grupos tratados con 130 mg/kg de STZ y no tratados, hasta la semana seis donde el grupo MIF+/+ 130 mg/kg STZ produjo una menor cantidad de esta que su grupo control ($p < 0.007$) que luego se normaliza. A la semana doce el grupo MIF-/- 130mg/kg presentaron valores mas altos de insulina que su grupo control ($p < 0.04$).

Moléculas secretadas por adipocitos influyen la condición de insulina resistencia, algunas de ellas son $TNF-\alpha$, resistina, IL-6, ácidos grasos libres, entre otras. Es por ello que en este estudio se consideró medir los niveles de resistina en suero, además de las citocinas mencionadas antes ($TNF-\alpha$ e IL-6). La concentración de resistina en suero (figura 20) no se ve modificada entre tratamientos hasta la semana doce post-inducción donde el grupo MIF+/+ 130 mg/kg STZ presentó una mayor concentración en comparación con el grupo MIF-/- 130 mg/kg STZ ($p < 0.03$).

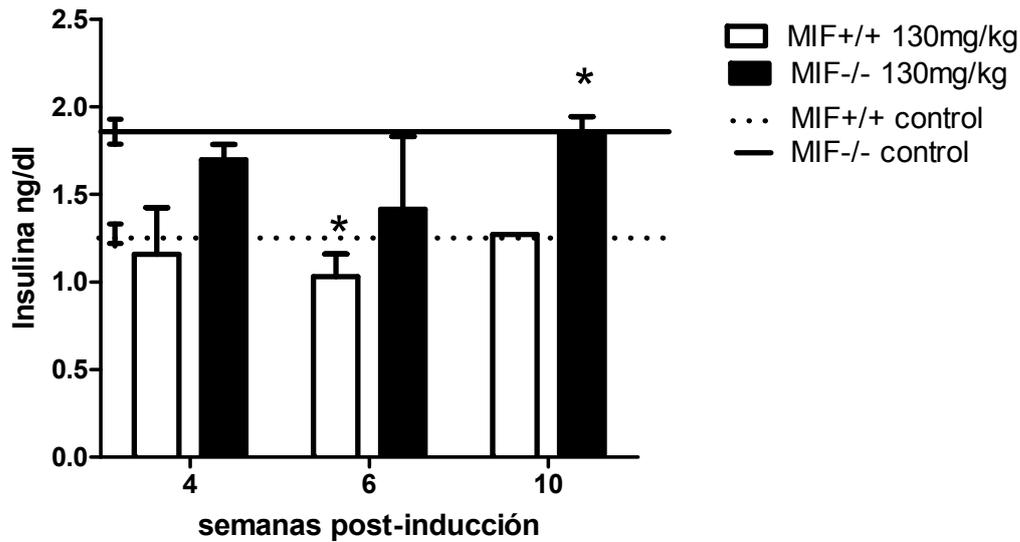


Figura 19. Insulina en suero. Sueros de dos experimentos (A y B). Los niveles de insulina circulante a lo largo del experimento no disminuyen, únicamente los MIF+/+ muestran una menor producción a la semana seis post-inducción en comparación con su grupo experimental no inducido ($p < 0.0075$), y los MIF-/- incrementan su producción a la semana diez en comparación con los MIF+/+ 130 mg/kg STZ ($p < 0.0414$).

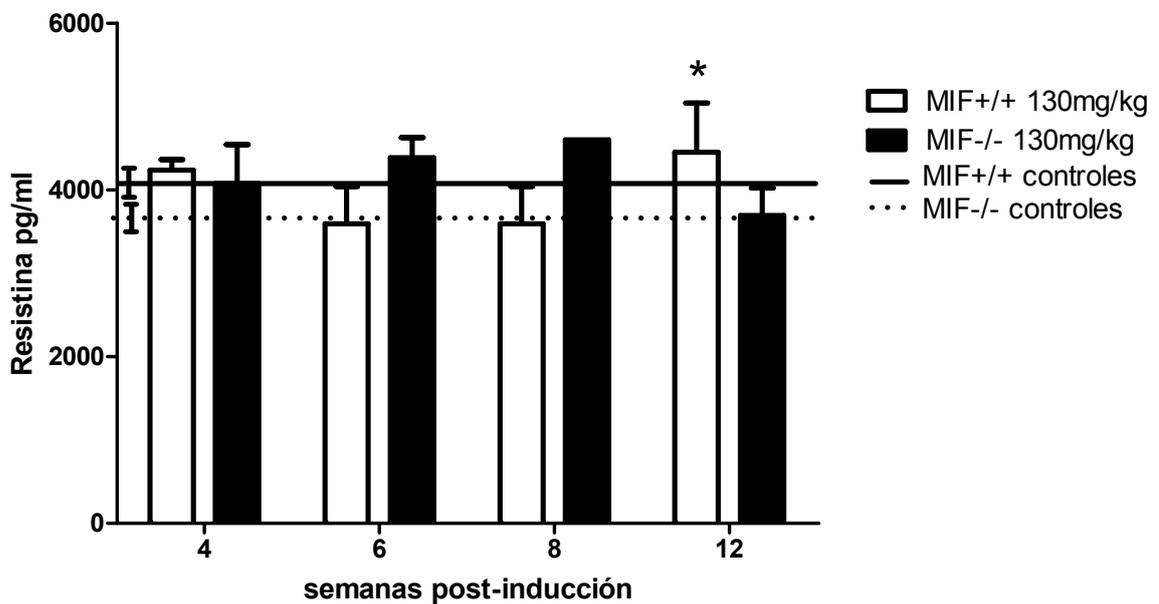


Figura 20. Resistina en suero. A la semana doce los MIF+/+ 130 mg/kg STZ muestran un incremento de resistina en comparación con el grupo MIF-/- 130 mg/kg STZ (* $p < 0.033$).

IX. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

Previamente se ha reportado que la estreptozotocina (STZ) es capaz de producir varios tipos de diabetes, de acuerdo a la dosis usada, en ratas adultas tratadas con una única dosis intraperitoneal o intravenosa de STZ (Junod, 1969). Y aunque hasta ahora no se ha determinado con claridad el mecanismo por el cual la STZ provoca necrosis específica en las células β del páncreas (en el caso de la diabetes tipo 1) y tampoco como provoca la patología de la D-2 sin destruir las células β . Se ha sugerido que el mecanismo de especificidad de la acción de la STZ en la célula beta es porque la STZ inhibe a la enzima O-GlcNAc-selectiva N-acetil- β -D-glucosaminidasa (O-GlcNAcase) que se encuentra en mayor concentración en estas células en comparación con las células de otros tejidos (Konrad, 2001).

Desde hace varios años se sabe que la glucosa actúa en forma directa sobre las células β pancreáticas para aumentar la secreción de insulina. La respuesta a la glucosa es bifásica: existe un aumento rápido y corto en la secreción, seguido de un aumento prolongado de desarrollo más lento. La exposición a mayores cantidades de insulina disminuye la concentración de receptores y la exposición a concentraciones bajas de insulina aumenta el número de receptores (Ganong, 2004). Así se ha sugerido que tal vez el mecanismo involucrado en la generación de D-2 por STZ podría explicarse por la siguiente secuencia de eventos: al administrar una dosis alta en ayuno, la respuesta por parte de la célula β es de dos tipos, una mínima parte de la población de estas células muere y la otra es estimulada por la alta dosis de STZ que es reconocida como glucosa por el GLUT-2 (Schneidl, 1994) y a su vez para compensar la pérdida de las otras células. Las células β que no mueren comienzan a producir grandes cantidades de insulina, lo que disminuye la concentración de receptores, ocasionando una resistencia en la acción de la insulina. Basados en este principio Ito y colaboradores en el 2001 desarrollaron un modelo de diabetes mellitus 2 (D-2) no insulino dependiente en ratones ICR inyectando vía intraperitoneal 100 mg/kg de STZ.

En este trabajo de tesis nosotros desarrollamos el mismo modelo de D-2 pero en ratones con fondo genético BALB/c. Establecimos que para la cepa BALB/c la dosis a utilizar para generar la D-2 de 130 mg/kg STZ, dosis un poco mayor que la utilizada por Ito y col. (2001), posiblemente debido a la variación del fondo genético entre los ratones utilizados por ellos y nosotros. El balance entre respuestas tipo Th1 y Th2 es de crítica importancia para la ocurrencia de muchas enfermedades, son esenciales en la inmunidad innata debido a que las células de los ratones ICR producen, de manera preferente citocinas de la respuesta Th1

como TNF- α , y los ratones BALB/c producen preferencialmente citocinas antiinflamatorias como IL-4 característica de la respuesta tipo Th2 (Watanabe, 2004).

Este modelo de diabetes en ratones BALB/c, como se mostró en los resultados, cumple con las características principales para el diagnóstico de la D-2, como son hiperglucemia en ayunas (MIF+/+ figura 8), fallo en la tolerancia a la glucosa (MIF+/+ figura 14), polidipsia (MIF+/+ figura 12), poliuria (MIF+/+ figura 13), además de presentar niveles de insulina normales en suero (MIF+/+ figura 19) y sin cambios a nivel de RNAm en la célula β (MIF+/+ figura 15).

Una vez desarrollado el modelo de D-2 en los ratones BALB/c, y basados en datos clínicos que muestran una co-relación directa entre MIF y D-2 como son los niveles incrementados de MIF en suero de pacientes con D-2, incluso más que otras proteínas utilizadas para su diagnóstico como proteína C reactiva e IL-6 (Toso, 2008, Leal, 2009). Se procedió a evaluar el desarrollo de la D-2 en presencia (MIF+/+) o ausencia (MIF-/-) del gen que codifica para MIF en el modelo murino desarrollado, con la finalidad de contribuir al conocimiento acerca de la asociación entre la D-2 y MIF.

Utilizando ratones machos de 8 semanas de edad MIF+/+ y MIF-/- probamos distintas dosis de STZ; 55, 90, 130 y 160 mg/kg STZ, todas administradas vía intraperitoneal y con ayuno previo de cinco horas. Destacamos la importancia del ayuno, puesto que los ratones que fueron inyectados con STZ (no importando la dosis) sin ayuno, no presentaron ningún síntoma a lo largo del experimento. En los ratones inducidos con 55 mg/kg STZ no se presentaron altas concentraciones de glucosa en sangre como se puede observar en la figura 3, por lo que fue descartada esta dosis.

En los ratones inducidos con las dosis de 90, 130 y 160 mg/kg STZ si hubo un incremento en la concentración de la glucosa en sangre, sin embargo ocurrió lo siguiente: la dosis de 160 mg/kg STZ provocó una exacerbada hiperglucemia y causó la muerte de los animales pero cabe destacar que los ratones MIF+/+ 160 mg/kg STZ presentaron un valor promedio de glucosa en sangre de 600 mg/dl mientras que los MIF-/- 160 mg/kg STZ de 450 mg/dl y los MIF+/+ 160 mg/kg STZ sucumbieron a la enfermedad cuando aún permanecían vivos el 90% de los MIF-/- 160mg/kg STZ (fig. 4). Hecho que sugiere una participación importante de MIF en la patología de la D-2, pues los ratones MIF-/- la ausencia de ésta molécula les permitió vivir por más tiempo y en mayor número, aún con concentraciones exacerbadas de glucosa en sangre. Las dosis de 90 y 130 mg/kg de STZ provocó incrementos de glucosa en sangre de manera progresiva, siendo la dosis de 130 mg/kg de STZ la que se asemeja más a los niveles de glucosa en la patología diabética en humanos esto basado en las

pruebas de tolerancia a la glucosa realizados en los grupos de 90 y 130 mg/kg STZ, pero los ratones inducidos con 90 mg/kg STZ respondieron igual que los controles no inducidos, al estímulo de glucosa oral (figura 5).

Una vez establecida la dosis de 130 mg/kg STZ, para tener el modelo viable, se procedió a desarrollar dos experimentos independientes referidos en el texto como experimento A y experimento B. El monitoreo de la glucemia en el experimento A mostró un comportamiento similar entre ratones MIF +/+ 130 mg/kg y MIF-/- 130 mg/kg hasta la semana seis, luego de la cual se separan y los ratones MIF +/+ 130 mg/kg continúan manteniendo valores más elevados en comparación con los MIF-/- 130 mg/kg. En el experimento B también comenzaba a separarse los valores a la semana seis, pero se sacrificó a la mitad de cada grupo para la extracción de islotes, lo que probablemente sesgó los resultados al grado en que no se observan diferencias entre grupos. Aún cuando en las concentraciones de glucosa no se observaron claras diferencias entre los ratones MIF+/+ 130 mg/kg y los MIF-/- 130 mg/kg los resultados en la producción de orina nos indican que la patología se está desarrollando de manera distinta y que la ausencia de MIF en los ratones knock out, provoca de alguna manera que los valores en la producción de orina se normalicen.

La polidipsia y la poliuria, son más evidentes en los ratones MIF+/+ 130 mg/kg que en los ratones MIF-/- 130 mg/kg STZ. Esto correlaciona con que la glucosuria, determinada con las tiras reactivas en la orina que se presentó en ambos grupos, pero se mantuvo por arriba de los 1000 mg/dl en los MIF+/+ 130 mg/kg, la mayor parte del tiempo mientras que en los MIF-/- 130 mg/kg STZ fue de 300 mg/dl.

La presencia de proteínas en el orina indica una mayor permeabilidad de la membrana renal, sin embargo, el daño en el riñón no llegó a un estado grave ni a una infección, esto último respaldado por la ausencia de leucocitos. Los cambios de pH en la orina posiblemente se deban a un cambio en la concentración de solutos, como el incremento de proteínas en la orina. La cetosis no se presentó, lo que es frecuente en diabetes tipo 2 (Islas, 2005).

Por otra parte, la producción de citocinas pro inflamatorias: TNF- α , IL-1 β e IL-6, se incrementó en el grupo MIF+/+ 130 mg/kg STZ durante el desarrollo de la enfermedad al contrario del grupo MIF-/- 130 mg/kg STZ cuyas concentraciones se acercaron a la de los controles. Estos resultados concuerdan con el hecho de que MIF promueve directa o indirectamente la producción de citocinas proinflamatorias como IL-1 β y TNF- α (Calandra, 2003). En el caso de la resistina, secretada por el tejido graso (al igual que TNF- α e IL-6), se ha reportado que influye en la condición de insulino resistencia (Klebanova, 2007), sin

embargo en este modelo solo se observó incrementada en la semana doce en los ratones MIF+/+ 130 mg/kg STZ (figura 18).

En resumen podemos señalar que los ratones MIF-/- 130 mg/kg STZ que no cuentan con el gene para MIF presentaron menores síntomas y concentraciones menores de citocinas proinflamatorias en comparación con los ratones MIF+/+ 130 mg/kg STZ, en este modelo de D-2.

Pickup y Crook (1998) proponen una hipótesis para explicar la génesis de la D-2, en su planteamiento señalan que un aumento en las citocinas proinflamatorias de manera sistémica y constante podría generar la condición de insulino resistencia y posteriormente diabetes tipo 2. Recientes estudios sobre los alelos funcionales en el gene MIF humano, muestran un papel considerable de la participación de MIF en la patogénesis de resistencia a insulina que ocurre más comúnmente en la diabetes, envejecimiento y obesidad (Gregersen, 2003). Es conocido que MIF posee la capacidad de modular la producción de TNF- α (Calandra, 2003), este es un hecho relevante, debido a que se ha observado que en modelos de resistencia a insulina debida a obesidad y de D-2, que la neutralización de TNF- α aumenta la sensibilidad a insulina por incremento en la actividad del receptor de insulina tirocin cinasa específicamente en músculo y tejido adiposo (Hotamisligil, 1994). TNF- α a nivel celular causa un defecto en parte de la actividad tirocin cinasa del receptor de insulina y reduce la expresión del gene para GLUT-4 (Khan, 2000) Se sugiere que MIF podría participar en la génesis de la D-2 promoviendo la resistencia a insulina vía regulación de la expresión de TNF- α . Sin embargo es necesario hacer estudios específicos para dilucidar de que manera participa MIF en esta patología y que moléculas están activado a las células para aumentar su producción.

También es importante el estudio de MIF no solo con relación a su función como citocina pro inflamatoria sino también por la función recientemente descrita, que MIF es secretado junto con los gránulos de insulina en la célula β al incrementarse las concentraciones de glucosa extracelular, y que incluso MIF tiene una función autocrina positiva en la secreción de insulina (Toso 2008).

X.CONCLUSIONES

1. El modelo de D-2 es viable en ratones BALB/c machos de 8 semanas de edad a una concentración de 130 mg/kg STZ en ayuno de cinco horas.
2. La expresión de RNAm para insulina y GLUT-2 en los islotes se mantiene sin diferencias entre grupos y los valores de insulina en suero se mantienen normales en los grupos experimentales, por lo tanto no existe un daño grave en las células β después de la administración de la STZ.
3. Los ratones MIF^{-/-} 130 mg/kg STZ presentaron síntomas de D-2 en menor grado que los ratones MIF^{+/+} 130 mg/kg STZ, esto es, los ratones MIF^{-/-} inducidos con 130 mg/kg STZ desarrollaron niveles de glucosa menores en comparación con los ratones MIF^{+/+} inducidos con la misma dosis (130 mg/kg STZ) después de la semana 7 post inducción, los síntomas característicos de la diabetes como son polifagia, polidipsia y poliuria se presentaron en ambos grupos pero en los MIF^{-/-} 130 mg/kg STZ fueron disminuyendo gradualmente acercándose a los valores de los grupos control.
4. Los ratones MIF^{+/+} 130mg/kg STZ presentan incremento de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-6 e IL-1 β y la semana doce post-inducción los valores de resistina en suero también se incrementaron, al contrario de los ratones MIF^{-/-} 130 mg/kg que presentaron siempre valores similares a los grupos controles.

Todo lo anterior, sugiere que MIF participa en la génesis de la D-2, de varias maneras, su ausencia reduce la intensidad de los síntomas tales como hiperglucemia, polidipsia, poliuria, glucosuria y presencia de proteínas en la orina, en presencia de MIF existe un incremento en la producción de citocinas proinflamatorias como son TNF- α , IL-1 β e IL-6.

XI.REFERENCIAS

1. Abbas K. A. y A. H. Lichtman. 2005. Inmunología celular y molecular. 5ed. ELSEVIER. España.
2. Calandra, T. and T. Roger. 2003. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nature Reviews Immunology*. (3): 791-799.
3. Cvetkovic, I. and S. Stosic-Grujicic. 2006. Neutralization of macrophage migration inhibitory factor-novel approach for the treatment of immunoinflammatory disorders. *Review. International Immunopharmacology* 6: 1527-1534.
4. Cvetkovic, I., Y. Al-Abed, D. Miljkovic, D. Maksimovic-Ivanic, J. Roth, M. Bacher, H. Y. Lan, F. Nicoletti and S. Stosic-Grujicic. 2005. Critical role of macrophage migration inhibitory factor activity in experimental autoimmune diabetes. *Endocrinology*. 146(7): 2942-2951.
5. Fernández-Real, J.M. and J. C. Pickup. 2007. Innate immunity. Insulin resistance and type 2 diabetes. *Endocrinology and metabolism*.19(1):10-16.
6. Ganong, W.F. 2004. Fisiología Medica.19ed. Editorial El Manual Moderno. Mexico.
7. Herder, C., H. Kolb, W. Koenig, B. Haastert, W. Rathmann, R. Holle, B. Thorand and H-E. Wichmann. 2006. Association of systemic concentrations of macrophage migration inhibitory factor with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *American diabetes association. Diabetes care* 29: 368-371.
8. Gregersen, P. K. and R. Bucala. 2003. Macrophage Migration Inhibitory Factor, MIF Alleles, and the Genetics of Inflammatory Disorders: Incorporating Disease Outcome Into the Definition of Phenotype. *American College of Rheumatology*. 48 (5): 1171–1176.
9. Herder, C., M. Peltonen, W. Koenig, I. Kräfft, S. Müller-Scholze, S. Martin, T. Lakka, P. Ilanne-Parikka, J. G. Eriksson, H. Hämäläinen, S. Keinänen-Kiukaanniemi, T. T. Valle, M. Uusitupa, J. Lindsström, H. Kolb and J. Tuomilehto. 2006. Systemic immune mediators and lifestyle changes in the prevention of type 2 diabetes. *Diabetes* 55: 2340-2346.
10. Hirokawa, J., S. Sakaue, S. Tagami, Y. Kawakami, M. Sakai, S. Nishi and J. Nishihira. 1997. Identification of macrophage migration inhibitory factor in adipose tissue and its induction by tumor necrosis factor- α . *Biochemical and biophysical research communications*. 235: 94-98.
11. Hotamisligil, G.H. and B.M. Spiegelman.1994. Tumor necrosis factor alfa: a key component of the obesity-diabetes link. *Diabetes*.43 (11): 1271-1278.
12. Islas, A. S. and Revilla M. C. 2005. Diabetes mellitus. 3ed. Mc Graw Hill. Mexico.
13. Ito, M., Y. Komodo, A. Nakatani, K. Hayashi and A. Naruse. 2001. Characterization of low dose streptozotocin-induced progressive diabetes in mice. *Env. Tox. and Pharm.* 9: 71-78.
14. Janeway, C., P. Travers, M. Walport, M. J. Shlomchik.2005.Inmunobiology. 6th. Garland Science. USA.

15. Junod, A., A. E. Lambert, W. Stauffacher and A. E. Renold. 1969. Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response. *The Journal of Clinical Investigation*. 48: 2129-2139.
16. Kahn, B.B. and J.S. Flier. 2000. Obesity and insulin resistance. *The journal of clinical investigation*. 106 (4): 473-481.
17. King H., R. E. Aubert and W. H. Herman. 1998. Global Burden of Diabetes, 1995-2025. *Diabetes care*. 21 (9): 1414-1431.
18. Klebanova, E.M., M.I. Balabolkin and V.M. Kreminskaia. 2007. The role of the fat tissue and its hormones in the mechanisms of insulin resistance and the development of type 2 diabetes mellitus. *Klin Med (Mosk)*. 85 (7); 20-27.
19. Konrad, R., I. Mikolaenko, J. Tolar, K. Liu and J. E. Kudlow. 2001. The potential mechanism of the diabetogenic action of streptozotocin: inhibition of pancreatic B-cell O-GlcNAc-selective N-acetyl-B-D-glucosaminidase. *Biochem. J*. 356: 31-41
20. Leal, R. E. 2009. Estudio del papel del Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF) en la Diabetes mellitus tipo 2 (un modelo murino). Tesis de licenciatura Biólogo. Tlanepantla, Edo. De Mex. UNAM. FES Iztacala.
21. Leech, M., C. Metz, P. Hall, P. Hutchinson, K. Gianis, M. Smith, H. Weedon, S. R. Holdsworth, R. Bucala and E. F. Morand. 1999. Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis. *Arthritis & Rheumatism*. 42 (8): 1601-1608.
22. LeRoith, D., S. I. Taylor and J. M. Olefsky. 2004. *Diabetes Mellitus: a fundamental and clinical text*. 3rd edition. Lippincott Williams & Wilkins. USA.
23. Mikulowska, A., C.N. Metz, R. Bucala and R. Holmdahl. 1997. Macrophage migration inhibitory factor is involved in the pathogenesis of collagen type II-induced Arthritis in mice. *Journal of immunology* 158:5514-5517.
24. Morand, E. F., M. Leech, H. Weedon, C. Metz, R. Bucala and M.D. Smith. 2002. Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: clinical correlations. *Rheumatology* 41: 558-562.
25. Moreira, P.I., M.S. Santos, A.M. Moreno, T. Proenca, R. Seica and C.R. Oliveira. 2004. Effect of Streptozotocin-Induced Diabetes on Rat Brain Mitochondria. *Journal of Neuroendocrinology*. 16: 32-38.
26. Pickup, J.C. and M.A. Crook. 1998. Is Type II diabetes mellitus a disease of the innate immune system?. *Diabetologia*. 41: 1241-1248.
27. Rahman, S. H., K. V. Menon, J. H. M. Holmfel, M. J. McMahon and P. Guillou. 2007. Serum macrophage migration inhibitory factor is an early marker of pancreatic necrosis in acute pancreatitis. *Annals of Surgery* 245 (2): 282-289.
28. Roger, T., Anne-Laure Chanson, M. Knaup-Reymond and T. Calandra. 2005. Macrophage migration inhibitory factor promotes innate immune responses by suppressing glucocorticoid-induced expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1. *Eur. J. Immunol* 35: 3405-3413.

29. Sakue, S., J. Nishihira, J. Hirokawa, H. Yoshimura, T. Honda, K. Aoki, S. Tagami and Y. Kawakami. 1999. Regulation of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression by glucose and insulin in adipocytes in vitro. *Mol. Med.* 5(6): 361-371.
30. Schnedl, W.J., S. Ferber, J.H. Johnson and C.B. Newgard. 1994. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes.* 43 (11): 1326-1333.
31. Stosic-Grujicic, S., I. Stojanovic, D. Maksimovic-Ivanic, M. Momcilovic, D. Popadic, L. Harhaji, D. Miljkovic, C. Metz, K. Mangano, G. Papaccio, Y. Al-Abed and F. Nicoletti. 2008. Macrophage Migration Factor (MIF) is necessary for progression of autoimmune Diabetes Mellitus. *Journal of Cellular Physiology.* 215: 665-675.
32. Tapia C., R. 2006. *El manual de Salud Publica.* 2 edición. Editores Intersistema. México.
33. Toso C., J. A. Emamaullee, S. Merani, A. M. J. Shapiro. The role macrophage migration inhibitory factor on glucose metabolism and diabetes. *Diabetologia.* DOI 10.1007/s00125-008-1063-3
34. Waeber, G., T. Calandra, R. Rodutt, J-A. Haefliger, C. Bonny, N. Thompson, B. Thorens, E. Telmer, A. Meinhardt, M. Bacher, C. N. Metz, P. Nicod and R. Bucala. 1997. Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet B cell macrophage migration inhibitory factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94 : 4782-4787.
35. Watanabe, H., K. Numata, T. Ito, K. Takagi and A. Matsukawa. 2004. Innate immune response in Th1- and Th2-domain mouse strains. *SHOCK.* 22 (5): 460-466.
36. Zhao F. and A. F. Keating. 2007. Functional Properties and Genomics of Glucose Trans. *Current Genomics.* 8, 113-128

XII.GLOSARIO

Cetosis: anormalidad que consiste en la producción excesiva de cuerpos cetónicos.

Citocina: proteína producida por una célula, que ejerce funciones sobre otra célula o sobre si misma, inicialmente de nominadas así por que se creía que solo eran producidas por células del sistema inmune, actualmente se conoce que son secretadas también por una gran variedad de tejidos no inmunes.

Hiperglucemia: Elevadas concentraciones de glucosa en sangre.

Glucosuria: glucosa en la orina, puede ser temporal o patológica.

Opsonización: proceso de fijación de las opsoninas, como IgG o fragmentos del complemento, a las superficies de los microorganismos lo que permite su marcaje para que sean fagocitados.

Polidipsia: aumento exacerbado en el consumo de agua

Polifagia: aumento exacerbado en el consumo de alimento

Poliuria: formación excesiva de orina

Th1: Tipo de respuesta inmune mediada por células como linfocitos Th1 que promueven una respuesta celular mediada por citocinas como IL-1b, IL-12, IL-6 y TNF- α .

Th2: Tipo de respuesta inmune mediada por linfocitos Th2 que promueven una respuesta humoral mediada por anticuerpos y citocinas como IL-4, IL-5 e IL-10.

XIII.APENDICES

APENDICE 1

SOLUCIONES Y REACTIVOS

Buffer de solución salina amortiguadora con fosfatos (PBS) para 10L y pH 7.4

80g NaCl (J. T Baker)
11.6g Na₂ HPO₄ (J. T Baker)
2g KH₂ PO₄ (J. T Baker)
2g KCl (ICN Biomedicals)

Buffer de lisis (Laird W. P. et al. 1991 Simplified mammalian DNA isolation procedure, Nucleic Acids Research Vol. 19 Num 15, 4293)

200mM NaCl (J. T Baker)
5mM de Ácido Etilenediaminatetraacético (EDTA) (J. T Baker)
0.2% Dodecil sulfato de sodio (SDS) (J. T Baker)
100mM Tris HCl, pH 8.5 (Biomedicals Inc.)
Aforar a 1L con agua estilada

Buffer TBE 10x

Tris base (890mM) (Sigma Chemicals)
Ácido Bórico (890mM) (J. T Baker)
40ml de 0.5M Ácido Etilenediaminatetraacético (EDTA) disódico (J. T Baker)
Se ajusta todo a pH 8.0 y se afora a 500ml. Con agua destilada

Buffer de pegado (ELISA)

0.1M de Na₂ HPO₄ (J. T Baker)
Para 1L con agua destilada

Solución de lavado (ELISA)

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

Solución de bloqueo (ELISA)

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

Sustrato ABTS para revelado (ELISA)

Adicionar 150mg de ABTS (ICN Biochemicals) en 500ml de 0.1M de ácido cítrico (tecsiquim) en agua destilada y con NaOH (Monterrey) llevar a un pH de 4.35, posteriormente se hicieron alícuotas de 11ml en tubos y se congelaron para su uso a -70°C.

Soluciones para la extracción de los islotes de Langerhans

A. Hanks completo (Hanks + BSA + Antibiótico)

500 mL de Hanks con rojo fenol
500 µL de Gentamicina o antibiótico/antimicótico (PEF)
12.5 mL de BSA (disuelta al 4% en sales de Spinner)

B. Ficoll al 27% (sirve para 2 gradientes)

10.8 g de Ficoll

29.2 mL de Hanks completo

Mezclar el Ficoll durante toda la noche en el cuarto frío (a velocidad 2-3) y esterilizarlo por 30 min bajo luz ultravioleta.

C. Diluciones de Ficoll en Hanks completo

23%: 8.5 mL de Ficoll + 1.5 mL de Hanks

20%: 7.4 mL de Ficoll + 2.6 mL de Hanks

11%: 4.0 mL de Ficoll + 6.0 mL de Hanks

APENDICE 2

Secuencias de los desoxioligonucleótidos para los PCR

Gen	Secuencias	Producto	T alineación	Ciclos
MIF	(F)AgACCACgtgCtTAgCTgAg (R)gCATCgCTACCggTggATAA	200pb	60°C	35
NEO	(F)ATTgAACAAgATggATTgCAC (R)CgTCCAaggATCATCCTgATC	500pb	60°C	35
GLUT-2	(F)TCACACCAgCATAACAACA (R)TACACTTCgTCCAgaCAATgA	230pb	95°C	35
Insulina	(F)ATTgTTCCAACATggCCTgT (R)TTgCAgTAgTTCTCCAgtTgg	350pb	94°C	20
RNAr 18s	(F)gggAgCCTgAgAAACggC (R) gggTCgggAgTgggTAATTT	93pb	95°C	20