



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

“ESTUDIO DEL FACTOR INHIBIDOR DE LA MIGRACIÓN DE MACRÓFAGOS Y STAT- 6 EN LA DIABETOGÉNESIS”

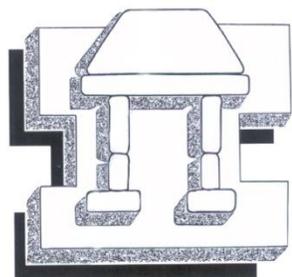
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

Yuriko Iztel Sánchez Zamora



IZTACALA

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA

TLALNEPANTLA, ESTADO DE MEXICO 2009



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.

A mi padre.

*Con todo mi amor y agradecimiento,
por ser un gran ejemplo de vida no
solo para mi si no para todas las
personas que lo rodean. Ejemplo de
amor, dedicación, perseverancia,
fortaleza y mil cosas más.*

*Mil gracias por todo tu apoyo, eres
el mejor hombre del mundo papi, te
amo y lo haré siempre!.*

A mi madre.

*Gracias por el gran ángel al que
dejaste a nuestro cargo, mi padre y
porque a pesar de que la vida te
apartó muy pronto de nuestro lado,
se que te sentirías feliz con nuestros
logros.*

A mi hermana.

*Por tomar el rol de madre desde
pequeña, por todo tu apoyo y amor.
Y por que no, también por todas las
aventuras compartidas. Gracias por
tu ayuda en todo momento. Te amo
hermanis!.*

Esto es por ustedes

Por su puesto, una mención especial a mis amigos por estar ahí en todo momento: Luis Uriel C. y Alfredo M. durante la carrera. Laura P, Alicia V. ejemplo de amiga y madre; Sergio, Elisa y Luis por su apoyo en OSU y por su puesto a la gran familia disfuncional Alex, Miguel y Erisch , a todos mis amigos de laboratorio y a esa persona especial que está conmigo en estos momentos LAM.

Por siempre estar ahí muchas gracias!.

Un agradecimiento enorme a la Dra. Miriam Rodríguez y al Dr. Ignacio Terrazas por la oportunidad que me dieron al formar parte de su equipo y al Dr. Abhay Satoskar por la enorme oportunidad de trabajar con él en OSU.

Gracias.

INDICE

I. RESUMEN.....	8
II. INTRODUCCIÓN.....	9
II.1 Diabetes mellitus (DM).....	9
Diabetes mellitus tipi 1 (DMT-1).....	10
Diabetes mellitus tipo 2 (DMT-2).....	10
II.2 Factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) y citocinas pro- inflamatorias.	12
II.3 Adipocitocinas.....	14
II.4 Traductor de señal y activador de la transcripción 6 (STAT- 6).....	16
II.5 Bloqueo sistémico del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) por medio de inhibidores sintéticos.	17
III. JUSTIFICACIÓN.....	18
IV. HIPÓTESIS.....	19
V. OBJETIVO GENERAL.....	19
VI.OBJETIVOS PARTICULARES.....	20
VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
VII.1 Animales experimentales.	21
VII.2 Genotipificación de los animales experimentales por PCR (Polimerase Chain Reaction).....	21

VII.3 Inducción de diabetes Mellitus.	23
VII.4 Determinación de peso, glucosa e insulina.....	25
VII.5 Citocinas en suero.....	25
VII.6 Prueba de tolerancia a la glucosa.....	25
VII.7 Histología.....	25
VII.8 Evaluación metabólica.....	25
VII.9 Proteína C reactiva (P- CR).....	21
VII.10 Inhibidos sintético anti-MIF y anti p38.....	21
VII.11 Estadística.....	21
VIII. RESULTADOS.....	27
VIII.1 La ausencia de MIF evita parcialmente el incremento de glucosa en sangre.....	27
VIII.2 El peso corporal está relacionado con los niveles de glucosa en sangre.....	28
VIII.3 Evaluación metabólica.....	30
VIII.4 Las citocinas pro-inflamatorias se encuentran relacionadas positivamente a DMT- 2.....	32
VIII.5 Citocinas anti- inflamatorias.....	37
VIII.6 Proteína C reactiva.....	38
VIII.7 Histología de páncreas.....	39
VIII.8 Curva de tolerancia a la glucosa.....	41
VIII.9 Enzimas hepáticas en suero.....	41
VIII.10 Bloqueo sintético de MIF por medio de	

inhibidores sintéticos vía i.p. y oral.	43
VIII.11 Bloqueo sistémico de p38 (citocinas pro-inflamatorias) por medio de inhibidores sintéticos vía i.p. y oral.....	50
IX. DISCUSIÓN.....	55
X. CONCLUSIONES.....	59
XI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	60
XII. GLOSARIO.....	64
APÉNDICE I. BORRADOR DE ARTÍCULO POR PUBLICAR.	67

I. RESUMEN

La diabetes Mellitus tipo 2 (DMT-2) es la primer causa de muerte en México y se está convirtiendo en un grave problema en todo el mundo. El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) es una citocina pro- inflamatoria involucrada en la patogénesis de varias enfermedades inflamatorias autoinmunes, en contraste, el traductor de señal y activador de la transcripción 6 (STAT-6) interviene en la transcripción de citocinas anti- inflamatorias como IL-4 e IL-13 que ayudan en el control de la inflamación. Aquí nosotros investigamos el papel de MIF y STAT-6 en la patogénesis de la DMT-2 usando ratones deficientes en MIF (MIF $-/-$) y STAT-6 (STAT-6 $-/-$) de fondo genético BALB/c usando un modelo de DMT-2 inducido con streptozotocina (STZ). Después de una inyección simple de STZ los ratones control positivo [WT (+/+) con STZ] mostraron un incremento significativo de glucemia, citocinas proinflamatorias, tuvieron cambios en la producción de enzimas hepáticas y presentaron una prueba positiva para proteína C reactiva, la cual es un marcador de inflamación. En contraste, los ratones [MIF ($-/-$) con STZ] y [STAT-6 ($-/-$) con STZ] no desarrollaron glucemias altas con respecto a los controles negativos [WT sin STZ] y mantuvieron controlados otros signos evaluados propios de la enfermedad. La administración oral de inhibidores anti MIF y anti p38 en ratones ICR diabéticos inducidos con STZ bajaron drásticamente los niveles de glucosa en sangre en la mayoría de los animales, los signos analizados cambiaron hacia la normalidad y no sucumbieron a la enfermedad con respecto a los controles positivos [ICR con STZ].

I. INTRODUCCIÓN

I.1 Diabetes Mellitus (DM)

El cuerpo requiere energía para funcionar correctamente, es por ello que las células utilizan glucosa para producir energía, ésta se puede obtener de tres fuentes diferentes: 1) a partir de la absorción intestinal de los carbohidratos consumidos en la dieta, 2) por medio de la glucogenólisis y 3) la gluconeogénesis. En cualquiera de los casos la glucosa es transportada hacia el interior de la célula por de proteínas transportadoras, puede ser almacenada como glucógeno en el hígado y ser sometida a glucogenólisis para regresar en forma de glucosa a la circulación y poder ser utilizada. Cuando consumimos alimentos, el cuerpo descompone una gran parte de ellos para formar glucosa, así que su concentración sanguínea aumenta y, en este estado, la absorción de glucosa es polarizada hacia la producción exógena de manera que la producción endógena (por degradación de glucógeno) es suprimida tanto en el hígado como en el músculo; una vez asimilada la glucosa proveniente de los alimentos, los concentración de glucosa en sangre se normaliza [1].

La glucosa es un importante combustible fisiológico para las células β del páncreas, para la producción de ATP y la secreción de insulina [2] . La insulina es una molécula llamada “hormona gluco-reguladora” ya que facilita la entrada de la glucosa a las células; la concentración de insulina circulante es mínima en periodos de ayuno, pero se incrementa en sangre con el consumo de alimentos y/o glucosa, de manera que su rápida aparición y acción previene la hiperglucemia prolongada [1] .

Cuando el cuerpo no tiene suficiente insulina, o no la puede utilizar adecuadamente, la glucosa no puede ingresar a las células y se mantiene alta en el torrente sanguíneo. Así, la deficiencia de insulina o la resistencia a la acción de la insulina, junto con otros factores, resulta en una patología conocida como diabetes mellitus (DM).

Por definición, la DM es un grupo de enfermedades caracterizadas por hiperglucemia como resultado de defectos en la secreción de insulina, o defectos en la acción de la insulina o una combinación de ambas [3].

La hiperglucemia crónica en la diabetes está asociada con daño, disfunción y fallas de varios órganos, especialmente a nivel del sistema nervioso, en riñones, en corazón y en vasos sanguíneos. Los procesos patológicos involucrados en el desarrollo de la diabetes son:

- La destrucción autoinmune de células β del páncreas, productoras de insulina (con la consecuente deficiencia de insulina).

- Anormalidades que resultan de la resistencia a la acción de la insulina.

Así, en la mayoría de los casos, la diabetes se divide en dos categorías dependiendo de su origen y características patogénicas:

La diabetes mellitus tipo I (DMT- 1), cuando el organismo no puede producir insulina, y en consecuencia hay una deficiencia absoluta de insulina y es necesaria la administración de insulina exógena. Este tipo de diabetes también es llamada diabetes juvenil porque generalmente se diagnostica en niños y adolescentes. La causa que genera este padecimiento es una deficiencia de insulina, debido a que las células β del páncreas son incapaces de producirla por un defecto genético o por un proceso de tipo autoinmune, éste es, que el sistema inmune de crea auto-anticuerpos que atacan y destruyen las células del páncreas productoras de insulina [3].

Diabetes mellitus tipo 2 (DMT- 2), la de mayor frecuencia (90-95 % de los casos), es una combinación de resistencia periférica a la acción de la insulina y una inadecuada respuesta secretora de insulina compensatoria. En esta categoría, un grado de hiperglucemia es suficiente para causar cambios patológicos y funcionales en varios tejidos blanco, sobretodo cuando está presente por largos periodos de tiempo, aún cuando no se presenten síntomas clínicos. Durante este periodo asintomático es posible demostrar una anormalidad en el metabolismo de carbohidratos, por

determinación de glucosa plasmática en ayuno o después de un reto con glucosa oral (tolerancia a la glucosa). Los individuos que caen en este grupo tienen resistencia a la insulina y generalmente tienen una relativa (más que absoluta) deficiencia de insulina, al menos inicialmente y frecuentemente a lo largo de su vida. Estos individuos no necesitan tratamiento de insulina exógena para sobrevivir y pueden presentar niveles anormales en la producción de enzimas hepáticas como GOT y GTP o incluso presentar niveles elevados de proteína C reactiva, lo cual es indicio de un grado de inflamación sistémico. Son muchas las posibles causas diferentes que generan este tipo de diabetes, y aunque la etiología específica no se conoce, se sabe que no hay destrucción autoinmune de células β pancreáticas y los pacientes no tienen ninguna otra causa aparente para el desarrollo de la diabetes. Lo que sí se sabe es que muchos pacientes con esta forma de diabetes son obesos, y la obesidad por sí misma causa algunos grados de resistencia a la insulina, y que el riesgo de desarrollarla se incrementa con la edad, la obesidad y la pérdida de actividad física. Esto ocurre con mayor frecuencia en individuos con hipertensión o dislipidemia, y la frecuencia de incidencia varía en diferentes subgrupos étnicos/raciales, se asocia con una fuerte predisposición genética. Sin embargo, la genética de esta forma de diabetes es compleja y no se ha definido claramente [3, 4].

En cualquiera de los dos casos (DMT-1 o DMT-2), la diabetes se caracteriza por anormalidades en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas. Estas alteraciones están basadas en la acción deficiente de la insulina sobre sus tejidos blanco. En consecuencia a la acción deficiente de insulina hay respuestas inadecuadas o disminuidas de los tejidos a la hormona en uno o más puntos en su compleja vía de señalización [3, 5].

Es de llamar la atención que, en el caso de la DMT-2 los defectos en la acción de la insulina y la secreción deficiente de la hormona regularmente coexisten en un mismo paciente, y con frecuencia no es claro cuál de las anormalidades fue la causa primaria de la hiperglucemia [6].

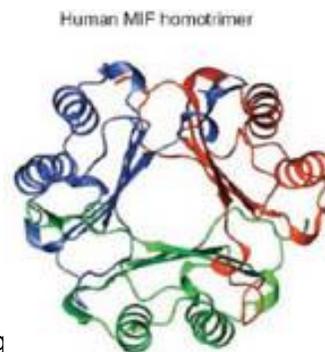
Datos recientes reportan que en el año 2000, había en el mundo 171 millones de personas con DMT-2, y se estima que esta cifra se incrementará a 366 millones para el año 2030 [5, 7]. En México, durante el año 2005, la DMT-2 fue considerada dentro de las tres primeras causas de muerte; cerca del 10.8% de los mexicanos la padecían junto con enfermedades del corazón y tumores malignos, provocando 62,243 muertes durante ese año [8].

Durante el año 2007, este padecimiento fue considerado la primera causa de muerte en México, según datos del Instituto Mexicano del Seguro Social [9].

Recientemente se ha propuesto una asociación directa entre DMT-2, obesidad y la resistencia a la insulina con una inflamación de bajo grado en tejido adiposo y células pancreáticas, reacciones que pudieran estar reguladas por citocinas pro-inflamatorias como $TNF-\alpha$, $INF-\gamma$, $IL-1\beta$, $IL-6$ y MIF; que son producidas por células del sistema inmune y otras células somáticas, entre las que se encuentran los adipocitos [10-13].

I.2 Factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) y citocinas Proinflamatorias

El Factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) fue reportado en los años 60's proteína capaz de inhibir la migración azarosa de macrófagos [14]; sorprendentemente por muchos desconoció la función fisiológica de esta proteína.



Fig

MIF

como una
los
años se

Estudios recientes han demostrado una asociación directamente proporcional entre la expresión de MIF y el grado de obesidad [15].

Adipocitos maduros murinos y humanos expresan MIF de manera constitutiva [16]. En humanos, la expresión constitutiva de MIF fue positivamente correlacionada

con el índice de masa corporal en sangre de donadores, lo cual sugiere que MIF podría ser un mediador de la infiltración de macrófagos en los tejidos adiposos de pacientes obesos [17, 18]. Esto ha sido reforzado por las observaciones de Ghanim y col., quienes reportaron un incremento significativo en la concentración plasmática de MIF y RNAm de MIF elevado en células periféricas mononucleares en pacientes obesos. La concentración elevada de MIF en plasma podía ser disminuido por metformina, un medicamento antidiabético [19]. Más aún, un estudio realizado por Herder y col., demostraron que pacientes asintomáticos, pero con alteraciones en el metabolismo de glucosa (prueba de tolerancia a la glucosa fallida) y pacientes con diagnóstico de DMT-2 presentaban niveles incrementados de MIF en suero. Siendo MIF un predictor con mayor índice de correlación que la IL-6 y proteína C reactiva (PCR [20]).

Por otro lado, es bien conocido que la expresión de MIF puede ser regulada por insulina, y se ha sugerido que la sobre-expresión de MIF podría asociarse con resistencia a la insulina. Sin embargo, hasta ahora son muy pocos los datos para establecer esta posible asociación entre MIF y DMT-2 [15, 21, 22].

MIF es una molécula de gran jerarquía en la inmunidad innata en la defensa antimicrobiana, también funciona como un mediador importante para estimular las respuestas de hipersensibilidad de tipo retardada (DTH). MIF favorece de manera importante la expresión de otras citocinas inflamatorias y mediadores solubles, tales como TNF- α , IL-1 β y óxido nítrico (NO), y está presente en la respuesta por “stress” [23]. Es de llamar la atención que las citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IFN- γ) y endotoxinas favorecen la producción de óxido nítrico, a través del incremento en la expresión de la sintasa inducible de óxido nítrico (iNOS- [24, 25]). Esta última molécula (iNOS) ha sido reportada sobreexpresada en músculo y tejido adiposo en modelos de roedores con obesidad y alteraciones en la sensibilidad a la insulina y el transporte de glucosa, tanto en ratones genéticamente obesos, *ob/ob*, como en ratones obesos por ingesta de dieta grasa. Curiosamente, los ratones deficientes para iNOS pueden desarrollar obesidad inducida por dieta grasa, sin presentar anomalías en la

sensibilidad a la insulina y transporte de glucosa en músculo [26]. Esta observación se confirmó utilizando ratones *ob/ob* tratados con inhibidores de iNOS, en los cuales se revirtió la hiperglucemia e hiperinsulinemia en ayuno y mejoró notablemente la sensibilidad a la insulina. El inhibidor de iNOS también incrementó la expresión de las proteínas IRS-1 e IRS-2, lo que aumentó la señalización para la insulina mediada por IRS-1 e IRS-2 en hígado de ratones *ob/ob* [25]. Entonces, iNOS podría representar otro mecanismo molecular de inflamación mediada por citocinas, ligado a resistencia a la insulina.

Como se mencionó anteriormente, la obesidad ha sido relacionada con inflamación y resistencia a la insulina, las citocinas pro-inflamatorias que han sido involucradas son TNF- α , IL-6, IL-1 β , así como MIF [20, 27, 28]. Estas citocinas son producidas por células del sistema inmune y por células somáticas, dentro de las cuales se encuentran los adipocitos, por tanto, los adipocitos representan una importante fuente secretora de factores con efectos importantes en el sistema inmune capaces de intervenir en la inflamación.

I.3 Adipocitocinas

Los factores secretados por los adipocitos son llamados adipocitocinas, en relación al tejido del cual provienen, y los más representativos son: leptina, adiponectina y resistina, así como las citocinas TNF- α , IL-6 que contribuyen a la posibilidad de infiltrado de células inflamatorias en tejido adiposo [28]. Estas adipocitocinas representan una importante conexión entre obesidad, resistencia a la insulina y desórdenes inflamatorios [29].

Recientemente se ha sugerido que los niveles altos o bajos de las adipocitocinas podrían determinar el grado de resistencia a la insulina y el posible desarrollo de la DMT-2. La resistencia a la insulina se encuentra estrechamente relacionada con factores y citocinas pro-inflamatorias, por lo que ha crecido el interés por estudiar éstas

últimas para conocer su acción en el tejido adiposo, en relación al desarrollo de la resistencia a la insulina característica de la DMT-2.

•**TNF- α** . Entre las citocinas de mayor interés se encuentra el Factor de Necrosis Tumoral- α (TNF- α), el cual está sobrepresado en el tejido adiposo. TNF- α es una citocina pro-inflamatoria que activa varias cascadas de señalización y es un posible candidato para inducir la resistencia a la insulina [39]. Se ha observado que en ratones obesos la ausencia de TNF- α resulta en sensibilidad normal a la insulina y correcta homeostasis de la glucosa, confirmando su participación en la respuesta inflamatoria y su importante función en la acción de la resistencia a la insulina [40] Por el contrario se ha demostrado que los tratamientos con TNF- α recombinante conllevan a la reducción de la auto-fosforilación del receptor de insulina, e inhiben subsecuentemente la fosforilación del receptor de insulina por medio de la molécula IRS-1, de esta manera la insulina no puede ejercer su efecto normal [39, 41].

•**IL-6**, es otra citocina involucrada en la patología de la DMT-2, ésta se encuentra en concentración elevada a nivel sistémico. En estudios *in vivo* se ha demostrado que induce alteraciones metabólicas, usualmente encontradas en estados catabólicos, aumentando las concentración plasmática de insulina. En ese contexto, se ha sugerido que quizá la IL-6 represente un factor hormonal que causa resistencia a la insulina [28, 33, 39, 42].

•**Resistina**. La resistina es llamada así por ser un factor que conlleva a la resistencia a la insulina [30, 31]. Es una molécula proteínica circulante de 114 aminoácidos producida por los adipocitos, está aumentada en la obesidad y es capaz de disminuir el transporte de glucosa en los adipocitos [32]. En estudios murinos se ha observado que la administración de resistina a ratones sanos provoca resistencia a la insulina [22]; por el contrario, con la administración de anticuerpos anti-resistina en ratones diabéticos los niveles de azúcar en sangre se normalizan [28]. Se sabe que la resistina aumenta la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-2, IL-12 e IL-1 β [29, 33].

•**Adiponectina.** Por el contrario la adiponectina, es una proteína monomérica de 247 aminoácidos que a diferencia de la resistina tiene efectos vasculoprotectores, anti-inflamatorios y efectos anti-diabéticos. La concentración de ésta es baja en sujetos que presentan resistencia a la insulina y DMT-2. En ratones deficientes de adiponectina se desarrolla resistencia a la insulina y DMT-2, éstos ratones vuelven a la “normalidad” con la administración de adiponectina exógena [29].

I.4 Traductor de señal y activador de la transcripción 6 (STAT-6).

Las citocinas ejercen su acción al ser reconocidas por receptores específicos en la membrana de las células, con la consecuente activación de factores de transcripción [34]. La omisión de alguno de estos genes, que codifican para los factores de transcripción de las citocinas, conocidos como STAT (del inglés- Signal Transducer and Activators of Transcription), ha brindado información directa (*in vivo*) de la participación de las citocinas en la respuesta inmune en diversas patologías [35, 36]. STAT-6 forma parte de esta familia de factores, el complejo ligando-receptor-STAT-6 constituye una cascada de señales que actúan sobre la expresión del gen que codifica para las interleucinas 4 y 13 (IL-4 e IL-13). Se ha observado que la interacción IL-4/STAT-6 representa un factor clave en enfermedades inflamatorias como la hepatitis, en donde su expresión induce infiltración de eosinófilos y neutrófilos al hígado [37].

En los modelos murinos de diabetes inducida con múltiples dosis de estreptozotocina (diabetes tipo 1), se ha observado que ratones deficientes para el gen que codifica para STAT-6 (-/-) de fondo genético C57BL/6 registran niveles estadísticamente menores de glucosa en sangre, así como un porcentaje menor de diabetes, comparados con el grupo silvestre [38]. Si STAT-6 está involucrado en la patología de la DMT-2 aún no se sabe; sin embargo, por ser un factor de transcripción de citocinas anti-inflamatorias como IL-4, podría estar relacionado con la regulación de la resistencia a la insulina, característica de la DMT-2.

I.5 Bloqueo Sistémico del Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos, MIF por medio de inhibidores sintéticos.

En este trabajo probamos dos inhibidores proporcionados por los laboratorios Cytokine harmaScience Inc.

• **Inhibidores Anti-MIF.** El Factor Inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) es una citocina pro-inflamatoria que estimula la respuesta inflamatoria en presencia de esteroides y otros supresores inmunes. MIF también juega un papel importante en enfermedades inflamatorias e inhibe la actividad de p53, un importante supresor de tumores. Numerosos estudios en roedores han demostrado que anticuerpos Anti-MIF pueden ser benéficos al disminuir la patología de enfermedades como artritis reumatoide, choque séptico, cáncer, glomerulonefritis y colitis. El bloqueo de la producción o bioactividad de MIF podría ser usado en un amplio espectro de enfermedades inflamatorias o autoinmunes.

El inhibidor utilizado en éste trabajo de tesis fue diseñado empleando tecnología basada en un antagonista soluble para el receptor de MIF (CD74).

• **Semapimod** es otro inhibidor utilizado en éste trabajo, es una guanilhidrozoona que:

1. Inhibe las vías de transducción de señales para la prevención de la fosforilación de MEK, p38, MAP cinasa and JNK;
2. Inhibe la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, MIP-1 α , MIP-1 β .
3. Inhibe la producción de Oxido Nítrico.

Estas vías de transducción de señales y moléculas pro-inflamatorias son activas en varias enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Por tanto, el efecto del Semapimod en éstas enfermedades puede ser aplicado. En estudios con animales,

este medicamento ha mostrado actividad protectora ante una amplia variedad de condiciones, que van desde un accidente cerebro vascular hasta enfermedades inflamatorias intestinales.

Diversos estudios clínicos han mostrado una actividad benéfica en varias patologías como la enfermedad de Corhn y pancreatitis. Nuevos estudios en animales han demostrado una eficacia mayor en administraciones orales.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus tipo 2 (DMT-2) se está convirtiendo rápidamente en una enfermedad distribuída a nivel mundial. La obesidad y la vida sedentaria son la principal causa ambiental para el desarrollo de la resistencia a la insulina observada en la DMT-2. En la pasada década, se aceptó que la resistencia a la insulina está fuertemente asociadas con una inflamación crónica moderada [43].

Por otro lado, se ha reconocido a MIF como una molécula que favorece la expresión de otras citocinas inflamatorias y mediadores solubles implicados en la patogénesis de la enfermedad, tales como TNF- α , IL-1 β y óxido nítrico (NO) [24]. En contraste, la asociación de IL-4 al factor de transcripción STAT-6 favorece el desarrollo de la respuesta anti-inflamatoria mediada por IL-4 e IL-10. Basados en éstos conocimientos de regulación de la respuesta inflamatoria, y con el propósito de contribuir al establecimiento de cómo la respuesta inflamatoria estaría participando en la resistencia a la insulina en la DMT-2, en este trabajo exploramos la respuesta pro-inflamatoria y anti-inflamatoria en un modelo murino de DMT-2, en ratones deficientes para los genes MIF y STAT-6.

III. HIPÓTESIS

Dado que MIF es una molécula inductora de citocinas pro-inflamatorias involucradas en la resistencia a la insulina en la DMT-2; y STAT-6 es un factor de transcripción que ayuda al control de la inflamación a través de la señalización de citocinas anti-inflamatorias, se propone que:

“Un estado de inflamación crónica mediada por MIF, independiente de los mecanismos anti-inflamatorios de STAT-6, favorecen la DMT-2”.

IV. OBJETIVO GENERAL

La expresión de MIF puede ser regulada por glucosa e insulina, pero son escasos los datos que lo asocian con DMT-2. Así, el objetivo central en este estudio fue probar si existe alguna asociación de MIF con procesos inflamatorios que faciliten la génesis de la DMT-2 y si este fenómeno es independiente de la vía de señalización STAT-6 (respuesta anti-inflamatoria).

V. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer la dosis adecuada de STZ en ratones con fondo genético BALB/c e ICR, basados en el modelo de Hayashi [44].
2. Inducir la DMT-2 en ratones deficientes para el gen que codifica para STAT-6 (STAT-6 -/-), MIF (MIF -/-) y en los controles WT (MIF y STAT-6 +/+), así como en ratones con fondo genético ICR, con una dosis única de streptozotocina (STZ).
3. Evaluar los posibles cambios en peso, concentración de glucosa e insulina plasmática en los animales durante 7 semanas.
4. Determinar si hay cambios en producción de Proteína C-Reactiva (P-CR) en los grupos MIF (-/-), STAT-6 (-/-) y WT después de la inducción con STZ.
5. Determinar la tolerancia a la glucosa, antes y después de la inducción de diabetes con STZ en los animales experimentales.
6. Cuantificar las citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-4 e IL-10 y MIF) y resistina en los animales experimentales.
7. Determinar si existen cambios en la morfología en los islotes de células β pancreáticas entre los diferentes grupos de animales.
8. Realizar una evaluación metabólica que incluya consumo de agua y alimento, así como producción de orina y urobilinastix (densidad, pH, leucocitos, nitrito, proteínas, glucosa, cuerpos cetónicos, urobilinógeno, bilirrubina y sangre en orina).
9. Evaluar la de glucosa en sangre y citocinas pro y anti-inflamatorias de ratones con fondo genético ICR después de la inducción con STZ y en presencia de inhibidores sintéticos para MIF y p38.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 Animales experimentales. Se utilizaron ratones machos de 7-8 semanas de edad deficientes en STAT-6 (-/-) y MIF (-/-) como controles se usaron ratones de la misma edad y sexo silvestres (WT) todos con fondo genético BALB/c. Estos ratones se encuentran en reproducción en el bioterio de la FES-Iztacala, los cuales se mantienen a $23 \pm 1^\circ\text{C}$ con libre acceso a comida y agua. También se utilizaron ratones de la cepa ICR, hembras de 5 a 7 semanas. Cada grupo con un mínimo de 5 ratones; los cuales se mantuvieron con libre acceso a comida y agua en instalaciones especiales de Aronoff Laboratory de Ohio State University.

VI.2 Genotipificación de los ratones por PCR (Polimerase Chain Reaction). Los diferentes grupos experimentales fueron sometidos a un análisis de ADN con el fin de corroborar la presencia o ausencia de los genes de interés, de manera que los genes que codifican para MIF, STAT-6 y NEO (gen de selección neomicina) fueron determinados en los grupos de estudio. Brevemente, se obtuvo una muestra de la cola (0.5cm) de los animales experimentales, se digirió en tubos de 1.8 μl (Eppendorf ®) con buffer de lisis y 20 μl de Proteinasa K [100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Invitrogen ®)] durante toda la noche a 56°C . Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm durante 10 minutos, se tomó el sobrenadante y se adicionaron 500 μl de isopropanol frío, se homogenizó hasta la precipitación del DNA. Nuevamente se centrifugó a 14000 rpm durante un minuto para después lavar el botón de DNA con etanol frío al 75%, se disolvió la pastilla y se centrifugó a 14000 rpm por 5 minutos. Se dejó evaporar el etanol a temperatura ambiente por lo menos 1 hora. El botón de DNA se resuspendió con 200 μl de agua (grado biología molecular – Sigma ®) toda la noche a 56° . Posteriormente se determinó la cantidad y pureza extraída, utilizando una dilución 1:200 de muestra de DNA en agua, y se analizaron las muestras en un espectrofotómetro (Jenwey, Genova) a 260 nm. La concentración final se obtuvo con el factor 1 D.O.=40 μg . Para la PCR se utilizaron tubos nuevos libres de DNAsas y RNAsas con capacidad de 0.2ml, con un volumen final de reacción de 25 μl se colocaron los siguientes reactivos (kit taq Platinum polimerase, Invitrogen ®), en el siguiente orden: Buffer 10x (2.5 μl), MgCl_2 (50

mM; 0.75 μ l), DNTPMix (5 mM; 0.5 μ l), Primers (50 pM), DNA Taq polimerasa (5 U/ μ l; 0.25 μ l), muestras de DNA 1.25 μ l, agua grado biología molecular (todo marca Sigma $\text{\textcircled{R}}$) suficiente para llegar a un volumen de 25 μ l. La secuencia de los primers usados fueron:

MIF, (F) AgA CCA CgT gCT TAg CTg Ag; (R) gCA TCgCTA CCg gTg gAT AA (200pb); NEO (F) ATT gAA CAA gAT ggA TTg CAC, (R) CgT CCA gAT CAT CCT gAT (500pb).

STAT-6 (F) CTg GaC CTC ACC AAA CgC; (R) CCC ggA TgA CgT gTg C (275 pb); NEO (F) CTg AAT GAA CTg CAg gAC gA; (R) ATA CTT TCT Cgg CAg gAg CA (172 pb).

Una vez con los reactivos respectivos, los tubos para la PCR se sometieron a diferentes temperaturas de reacción: para la amplificación del gen de MIF 94°C por 30 seg., 58°C por 30 seg. y 72°C por 30 seg., con 35 repeticiones en el termociclador; para la amplificación del gen de STAT-6 94°C por 30 seg., 54°C por 30 seg. y 72°C por 30 seg., con 35 repeticiones en el termociclador (Corbett Research $\text{\textcircled{R}}$).

Para la electroforesis, se preparó un gel de agarosa 1% (ICN Biochemicals $\text{\textcircled{R}}$) en Buffer TBE 1x, sobre una cámara molde y un peine de 12 pozos que se mantuvo a 4°C por 30 minutos para que se solidificara.

Una vez hecho el gel, se hizo una dilución 1:4 de DNA y se colocó, por pozo, 2 μ l de muestra diluida en 8 μ l buffer de carga blue juice (In vitrogen $\text{\textcircled{R}}$) a partir del segundo pozo, ya que en el primero se colocaron 3 μ l del marcador de peso molecular 1 Kd. (In vitrogen $\text{\textcircled{R}}$). Se corrió el gel a 80 Volts, 45 Amperes durante 50 minutos. MIF tiene un peso de 200 pb y Neomicina de 500 pb. En el caso de STAT-6 la banda tiene un peso de 275 pb y Neomicina 172 pb. El resultado se observó en un transiluminador con luz UV (Fuji Film $\text{\textcircled{R}}$) y se capturó la imagen utilizando el programa Alphaimagen.

Como se observa en la fotografía (Figura 2-A), los ratones deficientes para el gen de MIF presentan la banda cuyo peso molecular denota el gen para NEO. Éste es el mismo caso para los ratones deficientes en STAT-6 y los ratones silvestres presentan las dos bandas de los genes de interés (Figura 2-B).

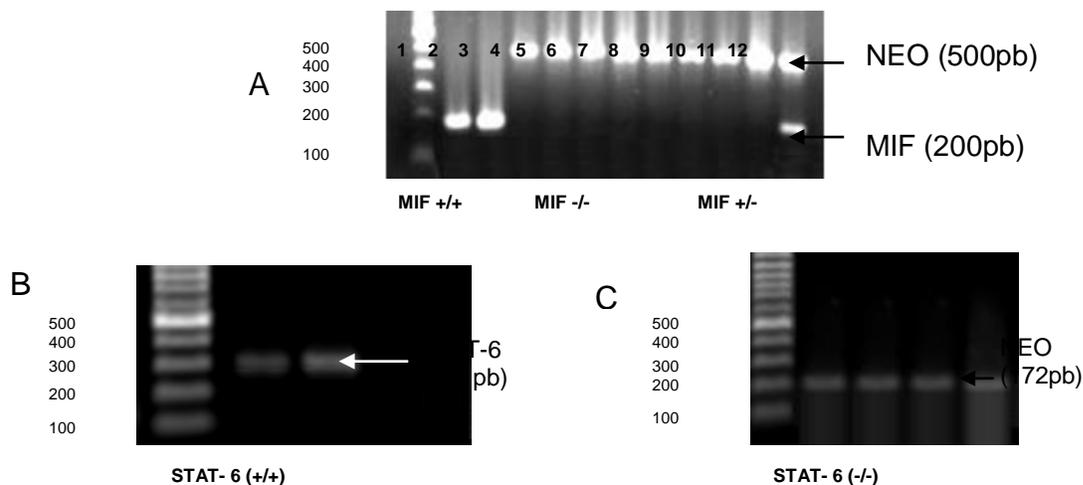


Figura 2. A) El gen de MIF corresponde a un peso de 200 pb, el cual se observa en las bandas correspondientes a los ratones silvestres (carriles 2 y 3). Al deletarse este gen, se inserta el gen de selección neomicina cuyo peso es de 500 pb, banda que presentan los ratones MIF (-/-) carriles 4-10. En ocasiones el gen de MIF y Neo pueden aparecer en el mismo animal (MIF +/-), significa que son ratones heterocigotos con un alelo deletado y otro no en el gen de interés, los cuales no son adecuados para experimentación (carriles 11y12). B)Ampliación correspondiente al gen STAT-6, con un peso molecular de 275 pb, el cual no se encuentra presente en la figura C), ya que esta corresponde a los ratones deficientes para este gen y por tanto presentan el gen de selección neomicina (NEO 172 pb).

VI.3 Inducción de diabetes. La estreptozotocina, (STZ, 2-deoxy-2-(3-(metil-3-nitrosoureido)-D-glucopiranos) (Figura 3) es sintetizada por el hongo *Streptomyces achromogenes* [44]. Es un antibiótico antitumoral que ha sido ampliamente utilizado para establecer diversos modelos de diabetes murina, ya sea DMT-1 o DMT-2 dependiendo de la dosis de STZ empleada [8, 44, 47, 48].

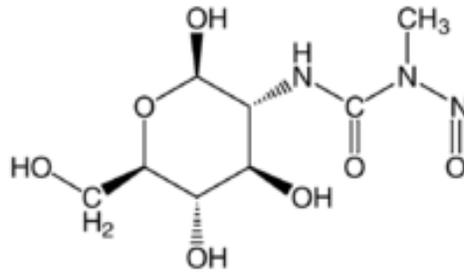


Figura 3. Estructura molecular de la estreptozotocina (STZ), 2-deoxy-2-(3-(metil-3-nitrosoureido)-D-glucopiranososa

Y aún cuando no se conoce el mecanismo preciso de acción de la STZ, se sabe que la STZ es captada por las células β del páncreas a través del transportador de glucosa 2 (GLUT-2), el cual es sobre expresado en periodo de ayuno; la STZ actúa a nivel intracelular generando especies reactivas de oxígeno que son los responsables finales de la fragmentación del DNA y por tanto de la muerte celular [45, 46].

Hayashi [44] estableció que con una dosis única de entre 150 a 200 mg/kg de STZ en ayuno, en ratones con fondo genético BALB/c induce glucemia superior a 200 mg/dl en una semana posterior a la administración de la droga. De acuerdo con esto, nosotros establecimos después de varios experimentos, una dosis de **165 mg/kg** de peso para inducir glucemias constantes por arriba de 300 mg/dl en ratones Balb/c; en el caso de los ratones ICR se utilizaron diferentes dosis: 200, 165, 125, 100, 90, 75, y 50 mg/kg dependiendo del experimento, siguiendo el protocolo reportado recientemente por Junod *et al* [49]. Brevemente, en cualquiera de los casos, los ratones de los grupos experimentales fueron puestos en ayuno 5 hrs antes de la inducción de diabetes con estreptozotocina (STZ). Posteriormente se les administró, vía intraperitoneal la STZ, la cual se preparó al momento de la inyección en buffer de citrato 0.05M, pH 4.5. Como controles se utilizaron ratones con las mismas características genéticas a los grupos experimentales, pero recibieron únicamente buffer de citratos vía i.p. [44].

VI.4 Determinación de peso, glucosa e insulina. En las semanas 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 posteriores a la inducción con STZ se determinó el peso y la glucemia con glucómetro (Accu-Chec sensor ®), la insulina fue determinada por medio de ELISA (Insulin ELISA Kit, Linco Research, Inc. St Charles, MO).

VI.5 Citocinas en suero. Se obtuvieron muestras de suero, a las semanas 1, 2, 3, 4, 5, 6 y 7 para determinar, por técnica de ELISA-Sandwich y de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Peprotech ®), citocinas pro-inflamatorias (MIF, TNF- α , INF γ , IL-6 e IL1 β) y anti-inflamatorias (IL-4 e IL-10), así como resistina.

VI.6 Prueba de tolerancia a la glucosa. Con esta prueba se determinó la capacidad de respuesta de insulina tras una carga de glucosa oral. Esta prueba fue realizada a todos los grupos experimentales al inicio y al final del experimento. Se prepararon a los ratones con ayuno de, al menos 18 hrs, se les tomó una muestra sanguínea 30 minutos antes de la prueba, entonces se administró 2 g/kg de glucosa en solución, vía ip. Por último se les volvió a tomar muestras sanguíneas a los 30, 60, 90 y 120 min después de la administración de glucosa en solución. Con las muestras sanguíneas se realizaron pruebas de glucosa en suero y se midió la insulina de cada uno de los ratones.

VI.7 Histología. Se extrajo el páncreas de algunos ratones de cada grupo en las semanas 0 y 6, posteriores a la administración de la STZ. Los órganos se fijaron con paraformaldehído al 4% y fueron embebidos en parafina, se cortaron en secciones consecutivas de 0.5- μ m de grosor y se analizaron al microscopio. Los cortes se tiñeron con Hematoxilina – Eosina (HE) para observar la integridad de los islotes β pancreáticos.

VI.8 Evaluación metabólica. A las semanas 0 y 3 post-inducción, los diferentes grupos de ratones fueron colocados en cajas metabólicas; en las cuales se colocó inicialmente 100 ml de agua y 75 gr de alimento, ambos a libre acceso. Permanecieron 24 horas, al término de las cuales se cuantificó el consumo de alimento, consumo de agua y volumen de orina. Ésta última se analizó mediante una tira reactiva para

determinar los siguientes parámetros: densidad, pH, leucocitos, nitrito, proteínas, glucosa, cuerpos cetónicos, uribilinógeno y bilirrubina (Combur 10 test ® M, Roche).

VI.9 Proteína C reactiva (P-CR). Una prueba positiva de proteína C- reactiva es un indicador de inflamación sistémica que ayuda al diagnóstico de enfermedades inflamatorias, como la DMT-2. Por esa razón se evaluó la presencia de P-CR en suero obtenido semanalmente, por el método de placa, con partículas en látex siguiendo las instrucciones del fabricante (PROTEX-CR ® Lab. Lafon, Méx.).

VI.10 Inhibidor Sintético Anti-MIF y anti p38. Los inhibidores anti-MIF, fueron identificados de la siguiente manera: 155 F Black (del inglés First, primero); 155 S Black (del inglés Second, segundo), 156 F Blue y 156 S Blue. Estos se usaron a una dosis i.p. de 10 mg/kg y vía oral a una dosis de 25, 10, 1, 0.1, 0.01 y 0.01 mg/kg. En el caso del Semapimod (anti p38) se utilizaron dosis de 1 mg/kg i.p. y 10, 1, 0.1 y 0.01 mg/kg vía oral. Para la administración i.p., la droga fue diluida en una solución 25% DMSO (Dimetilsulfoxido), 75% H₂O, debiendo ser el volumen final 100 µl por ratón. Para la administración oral, la droga fue disuelta en una solución 15% DMSO, 85% Metil celulosa (0.5% en agua).

VI.11 Estadística. Los resultados fueron analizados usando las pruebas estadísticas “t” de Student, U de Mann Witney según se requirió en los diferentes casos, una $p < 0.05$ fue considerada estadísticamente significativa.

VII. RESULTADOS.

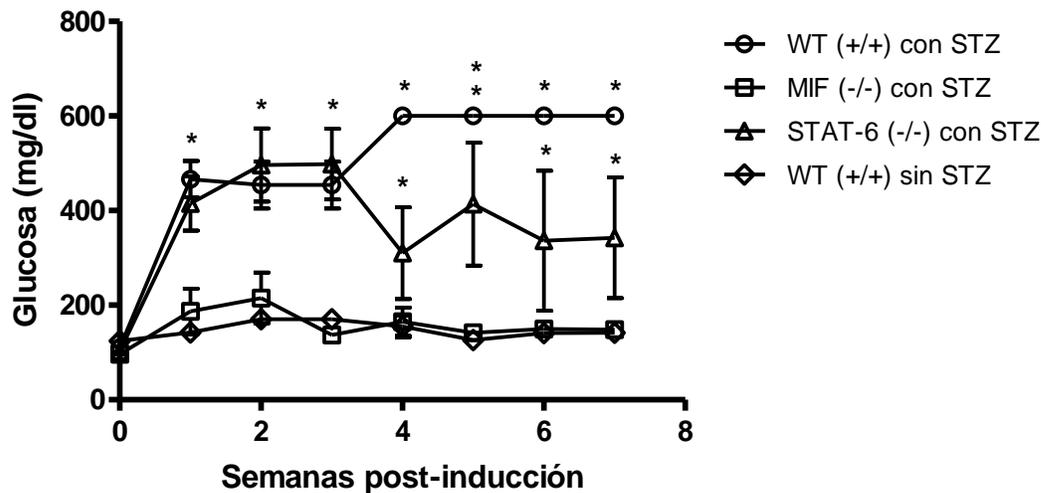
VII.1 La ausencia de MIF evita parcialmente el incremento de glucosa en sangre.

La diabetes se caracteriza por anomalías en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas. Estas alteraciones están basadas en la acción deficiente de la insulina sobre sus tejidos blanco. Cuando la insulina no es captada por las células (resistencia a la insulina) la glucosa no puede entrar a la célula y por tanto se mantiene en los fluidos circulantes, expresándose así en alta glucosa en sangre.

Como se muestra en la gráfica; en nuestro modelo experimental encontramos que los ratones control positivo [WT (+/+) con STZ] incrementaron la glucosa por arriba de los 400 mg/dl durante las primeras 3 semanas y a partir de la semana 4 y hasta la semana 7, la concentración de glucosa se disparó hasta alcanzar los 600 mg/dl en sangre, a partir de la primer semana post- inducción, comparados en todo momento con los ratones control negativos [WT (+/+) sin STZ], los cuales se mantuvieron en niveles oscilantes de glucosa en sangre de entre los 80 y 120 mg/dl durante las 7 semanas evaluadas (Grafica 1).

En cuanto a los grupos experimentales que no expresan el gen de MIF inducidos con STZ [MIF (-/-) con STZ] no mostraron diferencia significativa con el grupo control negativo [WT (+/+) sin STZ], ya que a diferencia de las dos primeras semanas en las que alcanzaron concentraciones cercanas a los 200 mg/dl de glucosa en sangre (no fueron estadísticamente significativas), durante la mayoría del experimento mantuvieron glucemia con valores de entre 100 y 150 mg/dl (Grafica 1).

Por otro lado, los ratones [STAT-6 (-/-) con STZ] desarrollaron glucemias altas durante las primeras 3 semanas del experimento presentando, de manera similar a los controles positivos, concentraciones de alrededor de 500 mg/dl de glucosa en sangre. Después de la cuarta semana y hasta el final del experimento la glucosa en sangre descendió a una concentración de entre 300 y 400 mg/dl (Grafica 1).



Gráfica

1. Valores de glucosa en sangre (mg/dl) de los diferentes grupos experimentales a diferentes tiempos. Ésta gráfica muestra el patrón observado en 4 experimentos independientes, con un número de 5 ratones en cada grupo por experimento. * $p < 0.05$ "t" de Students (Graphpad Prism).

VII.2 El peso corporal está relacionado con la concentración de glucosa en sangre

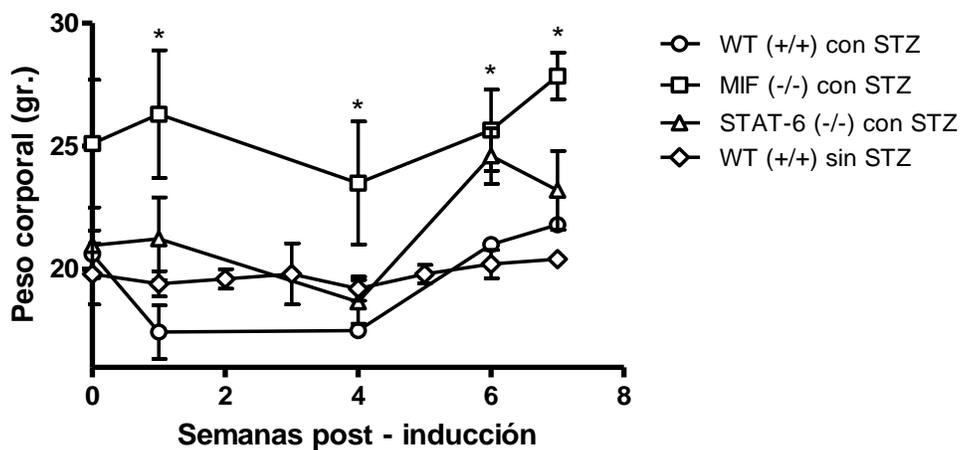
En el caso de los ratones experimentales a los cuales se les indujo DMT-2, se encontró que hay una relación entre la glucemia y el peso corporal; de manera que los ratones que conservan niveles normales de glucosa mantuvieron un peso normal. Por el contrario, aquellos ratones cuya glucemia alcanzó niveles de hasta 600 mg/dl [WT (+/) con STZ] bajaron drásticamente de peso. (Gráfica 2).

Durante las 7 semanas que duró el experimento (posteriores a la inducción) se pudo observar que la diferencia de peso corporal entre los tres diferentes grupos experimentales se mantuvo constante. Los ratones control positivo [WT (+/)] con STZ] tuvieron una disminución de peso durante las primeras 3 semanas en comparación con los ratones sanos [WT (+/) sin STZ], con los ratones deficientes de MIF [MIF (-/-) con STZ] y en comparación con los ratones que no expresan STAT-6 [STAT-6 (-/-) con STZ] (Gráfica 2 y Figura 4).

En cuanto a los ratones [MIF (-/-) con STZ] no sufrieron un incremento significativo en peso durante el experimento, manteniéndose relativamente constante a lo largo del experimento y con un ligero aumento en la semana 7 presuntamente propio de la edad, lo anterior tomando en cuenta que el peso promedio de un ratón de 10 a 11 semanas es de 25 ± 5 gr.

Los ratones [STAT-6 (-/-) con STZ] tuvieron un ligero aumento de peso curiosamente a partir de la semana 4 (justo cuando las concentraciones de glucosa comienzan a descender).

Los datos anteriores muestran claramente una relación entre la pérdida de peso y los niveles de glucosa en glucosa en sangre.



Gráfica 2. Peso de los diferentes grupos experimentales durante las siete semanas de experimentación. Comportamiento observado en 4 experimentos independientes con un número de 5 ratones en cada grupo por experimento. * $p < 0.05$ "t" de Students (Graphpad Prism).



Figura 4. Aspecto físico de los ratones experimentales a las 4 semanas post-inducción con STZ. Los ratones WT (+/+) con STZ tuvieron una pérdida de peso mayor en comparación a los demás grupos.

VII.3 Evaluación Metabólica

En la semanas 0 y 3 post-inducción se colocaron los diferentes grupos experimentales en cajas metabólicas (5 ratones por grupo), pasadas 24 horas los ratones se retiraron y fueron recuperados tanto el alimento como el agua sobrante, así como la orina producida para su posterior análisis (Figura 3). Esto nos ayudó a evaluar clínicamente el nivel de desarrollo de la DMT-2, en los diferentes grupos experimentales. Los síntomas a evaluar fueron: poliuria, polifagia y polidipcia así como daño renal a través del análisis de los componentes de la orina. (Tabla 1).



Figura 5. Cajas metabólicas. Estas cajas están diseñadas para monitorear todos los consumos y deshechos de los animales, en un periodo de 24 hrs. Cuentan con un compartimiento para el alimento

(a) y bebedero (b). En la base de la jaula se encuentra una red recolectora de heces (c) y una charola tipo embudo (d) cuya función es llevar la orina hacia un recipiente colector (e).

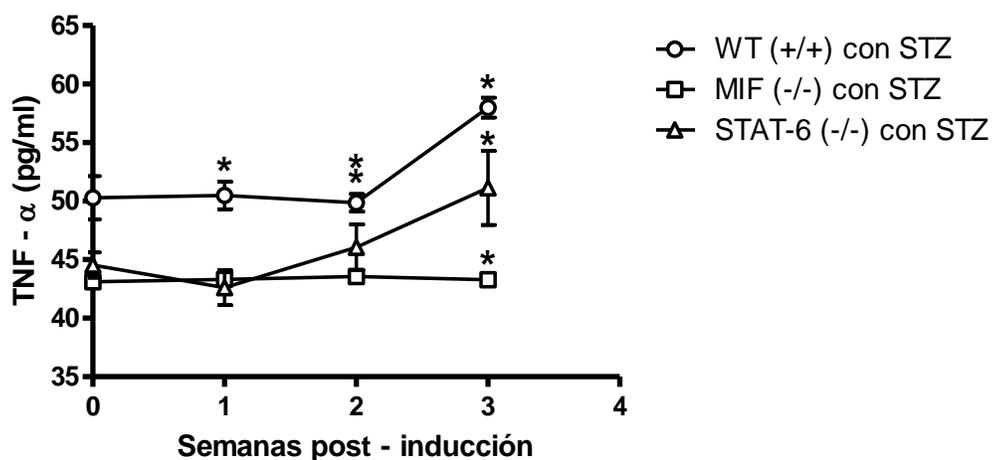
	WT (+/+) sin STZ	MIF (-/-) sin STZ	STAT-6 (-/-) sin STZ	WT (+/+) con STZ	MIF (-/-) con STZ	STAT-6 (-/-) con STZ
Consumo de agua (ml / ratón)	6.8	7	6.4	30	20	19.8
Consumo de alimento (gr / ratón)	5.96	5.76	5.6	10	6.8	4.8
Volumen de orina (ml / ratón)	2	2	2	16	12	11.8
Densidad *	1.020	1.020	1	1.020	1	1.010
pH	6	6	6	6	9	5
Leucocitos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Nitrito	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Proteínas	Negativo	Negativo	Negativo	4+	1+	4+
Glucosa	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Cuerpos cetónicos	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
Urobilinógeno	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal	Normal
Bilirrubina	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Tabla 1. Resultado del análisis de orina realizado a los diferentes grupos experimentales en las semanas 0 y 3 post-inducción con STZ.

De acuerdo con los resultados, el consumo de agua fue mayor en los controles positivos [WT (+/+) con STZ] cuyos niveles de glucosa en sangre estaban elevados, al igual que el consumo de alimento; aunque este último no fue estadísticamente significativo. El volumen de orina fue claramente mayor en los ratones diabéticos en donde los controles positivos [WT (+/+) con STZ] tuvieron el volumen mas grande, seguido por los ratones [STAT-6 (-/-) con STZ], con 11.8 ml y [MIF (-/-) con STZ] con 12 ml por ratón. Los ratones [STAT-6 (-/-)] y los controles diabéticos obtuvieron un pH menor, esto quiere decir que la orina de estos animales fué más ácida; por lo tanto, se puede inferir que estos animales ya habían desarrollado cetoacidosis. Por último, se sugiere que el daño renal parece estar en los ratones [WT (+/+) con STZ], seguido por los [STAT- 6 (-/-) con STZ] y por último el correspondiente a [MIF (-/-) con STZ]. El daño renal se puede inferir de acuerdo a la cantidad de proteínas presentes en la orina.

VII.4 Las citocinas pro-inflamatorias se encuentran relacionadas positivamente a DMT2

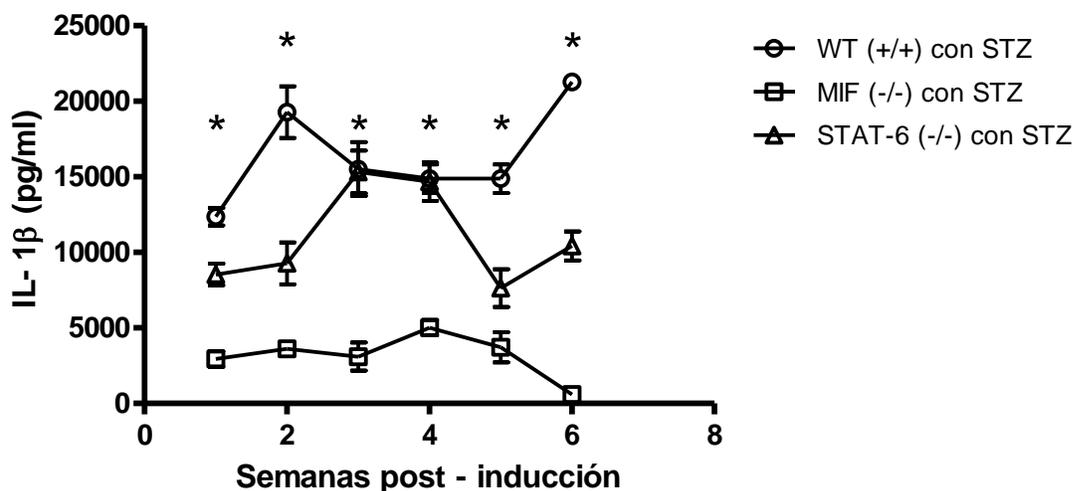
• **TNF- α** . La relación entre las citocinas pro-inflamatorias y la acción de la insulina en estados de obesidad y DMT-2, fue establecida inicialmente con el incremento del factor de necrosis tumoral- α (TNF- α) [28]. En nuestro estudio, los resultados reflejaron que el TNF- α se produce en mayor cantidad en los controles positivos [WT (+/+) con STZ], mientras que los ratones deficientes de STAT-6 [STAT-6 (-/-) con STZ] y MIF [MIF (-/-) con STZ] se mantuvieron por debajo hasta la semana 2 post-inducción (Gráfica 3). Sin embargo, se puede observar que en la semana 3 las diferencias de los ratones [STAT-6 (-/-) con STZ] y [MIF (-/-) con STZ] se hicieron mayores con respecto al grupo de ratones [MIF (-/-) con STZ], siendo éste último el que presentó niveles más bajos de TNF- α . Estos resultados concuerdan con las glucemias más altas observadas y con la literatura, en la cual el alto TNF- α está asociado con hiperglucemia.



Gráfica 3. Niveles de TNF- α en suero Comportamiento observado en 4 experimentos independientes con un número de 5 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ "t" de Student (Graphpad Prism).

• **IL-1 β** . Otra citocina pro-inflamatoria evaluada en éste trabajo fue la interleucina 1 β (IL-1 β), la cual modula la secreción de insulina (6). Como se observa en

la gráfica 4, la producción de IL-1 β en el grupo [MIF (-/-) con STZ] fue baja durante todo el experimento, incluso, la producción fue casi nula en la semana 6; además la diferencia del grupo en cuestión fueron significativas con respecto a los ratones [STAT-6 (-/-) con STZ] y controles [WT (+/+) con STZ]. Estos dos últimos grupos presentan, de igual manera, diferencias significativas entre ellos excepto en las semanas 3 y 4, en donde la producción de IL-1 β fue casi igual en ambos grupos; alrededor de 15000 pg/ml (Gráfica 4).



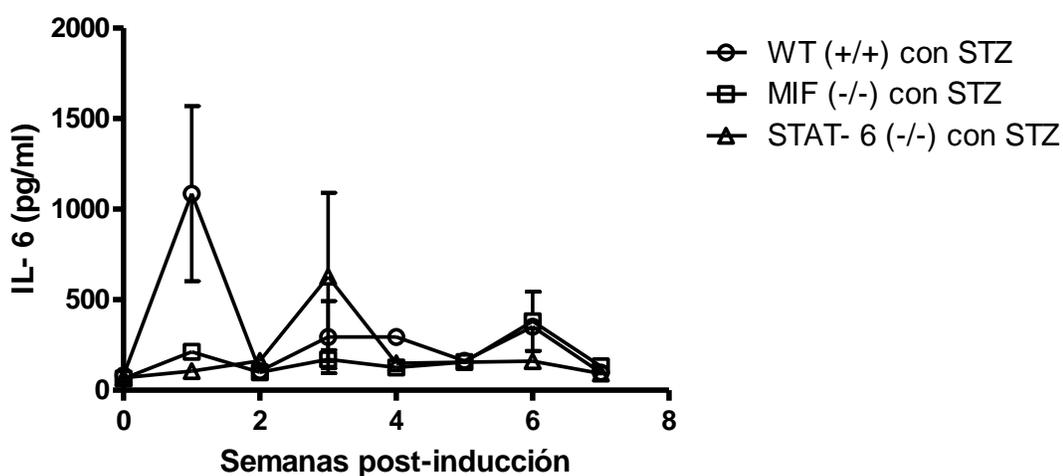
Gráfica 4. Niveles de IL-1 β en suero. Tendencia observada en 4 experimentos independientes con un número de 5 ratones en cada grupo. $p < 0.05$ "t" de Student (Graphpad Prism).

De nuevo observamos la tendencia de las citocinas anteriores, en la cual los ratones con mayor concentración sérica de IL-1 β fueron los controles positivos [WT (+/+) con STZ], seguidos por los ratones [STAT-6 (-/-) con STZ]; mientras que los ratones [MIF (-/-) con STZ] presentaron la menor concentración.

•**IL-6.** Considerada como potente inductor de la inflamación aguda [42]. En nuestros grupos experimentales observamos que se mantiene constante y sin incrementos a lo largo del experimento, en menor concentración en los ratones [MIF (-/-) con STZ]. Sin embargo, durante la semana 6 se pudo observar una producción mayor sin diferencia significativa respecto a los otros grupos experimentales.

Para el caso de los ratones control [WT (+/+) con STZ], se pudo observar un pico de producción de IL-6 durante la primer semana post- inducción, a partir de la segunda semana y hasta el final del experimento; los ratones [WT (+/+) con STZ] no presentaron diferencias significativas con respecto a los demás grupos experimentales.

El grupo experimental [STAT- 6 (-/-) con STZ] mantuvo una producción oscilante, por lo que no se observaron diferencias significativas (Gráfica 5).

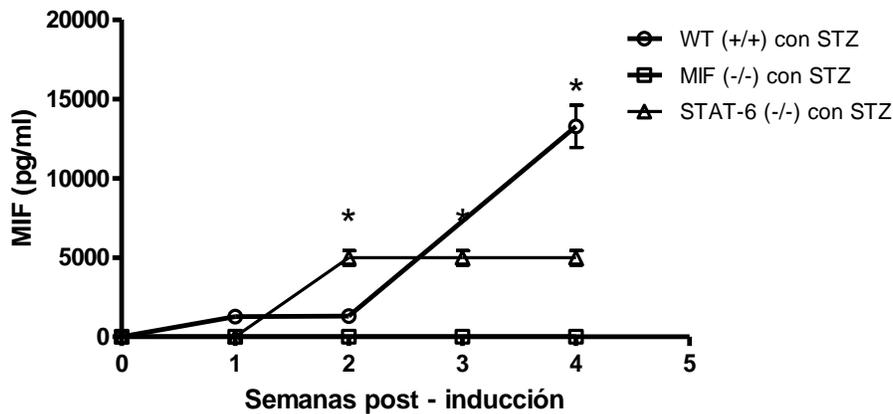


Gráfica 5. Concentración de IL-6 en suero. Comportamiento observado en 4 experimentos independientes con un número de 5 ratones en cada grupo por experimento. * $p < 0.05$ "t" de Student (Graphpad Prism).

•**MIF**. Como se mencionó, en estudios anteriores se ha relacionado a MIF con la DMT-2. En nuestro experimento podemos observar que el grupo con mayor producción de esta citocinas es el control [WT (+/+) con STZ] durante las semanas 1, 3 y 4.

Los ratones deficientes para el gen STAT- 6 [STAT- 6 (-/-) con STZ] tuvieron una mayor producción de MIF durante la semana 2, a partir de la cual la concentración de esta citocina se estabilizaron sin que tuviera cambio en las semanas siguientes.

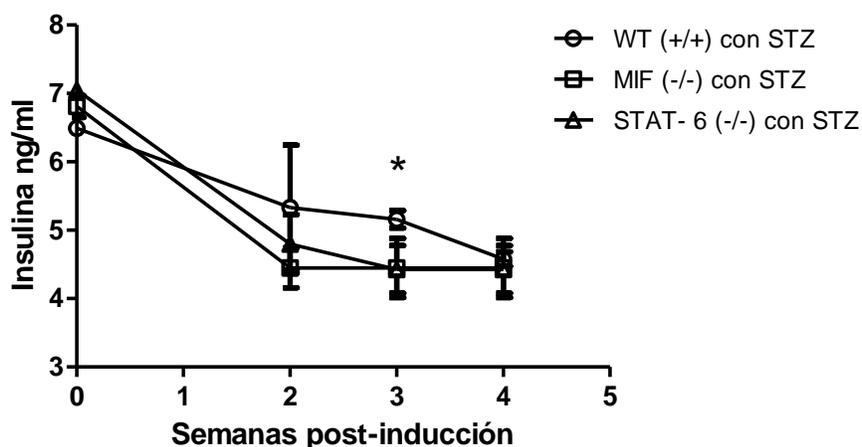
Evidentemente, la concentración en sangre de MIF en los ratones [MIF (-/-)] con STZ fue nula.



Gráfica 6. Concentración sistémica del Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos. Los datos representan 4 experimentos independientes con un número de 5 ratones en cada grupo por experimento. * $p < 0.05$ "t" de Student (Graphpad Prism).

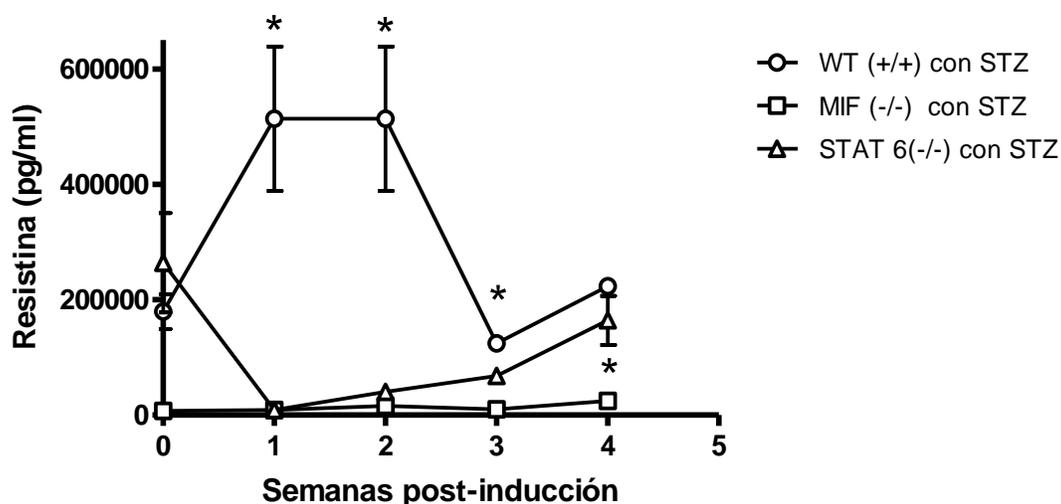
•**Insulina.** En la DMT2 la acción de la insulina está disminuida, esta alteración es detectada por las células β del páncreas, las cuales responden con una secreción mayor de insulina a la circulación, produciendo el fenómeno de hiperinsulinemia para forzar la captación de la glucosa y la respuesta en el hígado [50]. Entonces, si $IL-1\beta$ modula la secreción de la insulina podemos inferir que los ratones control positivo [WT (+/+) con STZ] cuya producción de $IL-1\beta$ fue mayor, podrían tener niveles más elevada la insulina. Sin embargo, la producción de insulina, en los diferentes grupos experimentales, no presentó diferencias significativas durante el experimento. Excepto en la semana 3 en donde encontramos diferencias significativas en el grupo [MIF (-/-) con STZ], (Gráfica 7).

Por otro lado, el hecho de que no haya diferencia entre los grupos en la producción de insulina también es indicativo de que no hubo daño diferencial entre los grupos a nivel de las células β pancreáticas por la administración de la STZ.



Gráfica 7. Insulina en suero. Tendencia observada en 4 experimentos independientes con un número de 5 ratones en cada grupo por experimento. * $p < 0.05$ "t" de Student (Graphpad Prism).

• **Resistina.** Dentro de las adipocitocinas pro-inflamatorias se encuentra la resistina (Gráfica 8). La resistina es la adipocitocina más relacionada con la resistencia a la insulina y DMT-2. En nuestro experimento los ratones control positivos [WT (+/+) con STZ] tuvieron resistina sérica por arriba de los demás grupos, las diferencias fueron mayores durante las primeras 3 semanas. Los ratones [STAT-6 (-/-) con STZ] y [MIF (-/-) con STZ] presentaron niveles menores a los controles positivos durante todo el tiempo experimental.



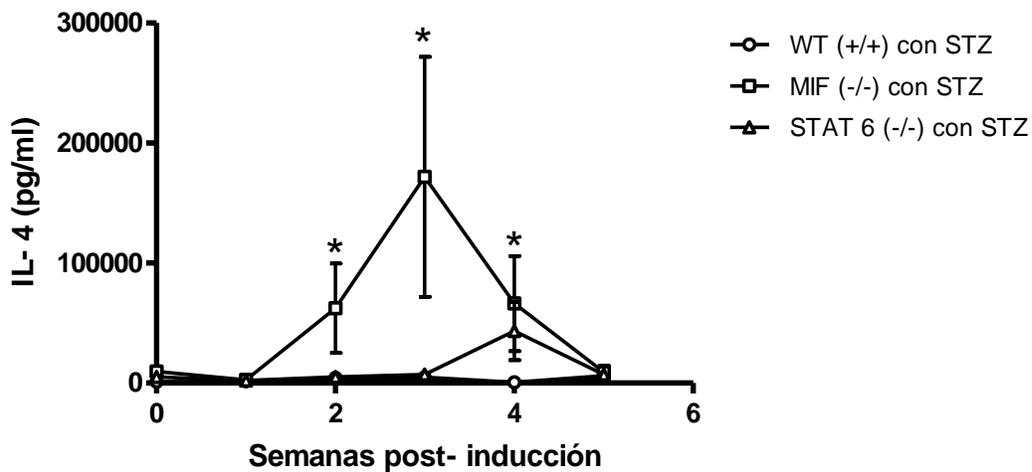
Gráfica 8. Concentración en suero de resistina en los grupos experimentales. Patrón observado en 4 experimentos independientes con un número de 5 ratones en cada grupo por experimento. * $p < 0.05$ "t" de students (Graphpad Prism).

VII.5 Citocinas anti-inflamatorias.

Las citocinas anti-inflamatorias funcionan como moléculas inhibidoras de la respuesta inflamatoria, un mecanismo de autocontrol, ya que una inflamación exacerbada sostenida puede producir daños al individuo. En el caso de la resistencia a la insulina ocasionada por la obesidad e inflamación, que deriva en DM2 es sabido que la IL-4 tiene una importante participación en éste proceso regulatorio.

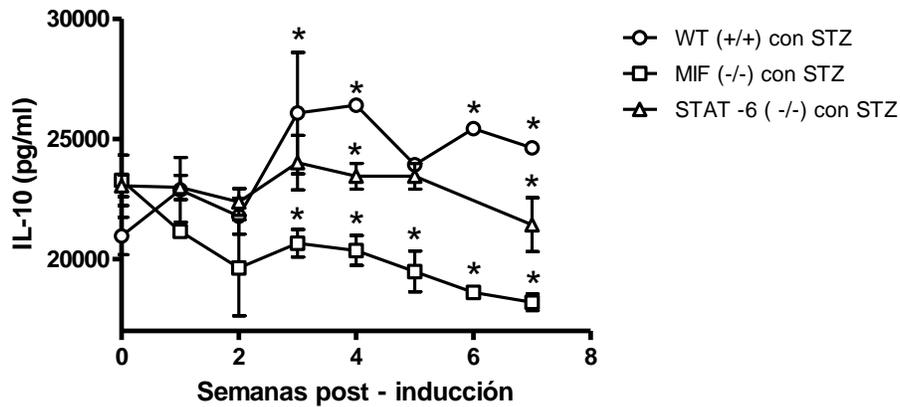
El factor de transcripción STAT- 6 es el factor encargado de comenzar la señalización intracelular, que da como resultado final la transcripción y por tanto producción de IL-4. Nosotros determinamos en el suero de los ratones tratados con STZ y sus controles respectivos por medio de ELISA, IL-4 e IL-10.

•**IL-4.** En la gráfica 9 se puede apreciar que la concentración de IL-4 mayor se encontró en los ratones [MIF (-/-) con STZ], con un pico de producción en la semana 3; mientras que la concentración menor pertenecen al grupo control positivo [WT (+/+) con STZ], en donde prácticamente no hubo producción de esta citocina durante el experimento. Como se esperaba, el grupo [STAT- 6 (-/-) con STZ] presentó una producción disminuida, con un pico en la semana 4 donde no hubo diferencias significativas con respecto al control positivo.



Gráfica 9. Producción de IL-4. Patrón observado en 4 experimentos independientes con un número de 5 ratones en cada grupo por experimento. *p<0.05 "t" de Student (Graphpad Prism).

• **IL-10.** La IL-10 fue, de igual manera, alta para los ratones control positivo [WT (+/+) con STZ], en los cuales se observaron diferencias significativas durante las semanas 4, 6 y 7 respecto a los otros dos grupos. Los ratones [MIF (-/-) con STZ] presentaron una producción baja, con diferencia significativa a partir de la semana 3 con respecto a los controles positivos [WT (+/+) con STZ] y hasta el término del experimento; mientras que los valores correspondientes al grupo [STAT- 6 (-/-) con STZ] fueron significativamente mayores, prácticamente en todos los puntos a partir de la segunda semana post inducción. Cabe hacer notar que aún cuando la IL-10 en éste grupo fue mayor que los observados para [MIF (-/-) con STZ], fue menor que los del grupo control positivo [WT (+/+) con STZ], siendo significativa esta diferencia en las semanas 4 y 6 (Gráfica 10).



Gráfica 10. Concentración sérica de IL-10. Comportamiento observado en 4 experimentos independientes con un número de 5 ratones en cada grupo por experimento. * $p < 0.05$ "t" de Student (Graphpad Prism).

VII.6 Proteína C- reactiva

La proteína C- reactiva (C-reactive protein; CRP) fue descubierta en 1930 por Tillet y Francis, durante sus estudios con pacientes con neumonía [51]. La proteína C reactiva es producida por el hígado y se eleva cuando hay inflamación sistémica. La concentración sistémica de CRP se relaciona con la IL-6 incrementada [52, 53].

Como una forma más de corroborar la presencia de inflamación en los diferentes grupos experimentales, fue determinada la presencia de CRP en suero de los diferentes grupos experimentales, semanalmente. De acuerdo con los datos obtenidos, los ratones sanos de los diferentes grupos experimentales no presentaron reacción positiva a CRP. Por el contrario, los ratones silvestres control positivo [WT (+/+) con STZ], fueron positivos en la prueba a partir de la segunda semana posterior a la inducción de la enfermedad; los ratones [MIF (-/-) con STZ] resultaron positivos a partir de la 4 semana mientras que los ratones [STAT-6 (-/-) con STZ] presentaron reacción positiva hasta la séptima semana del experimento, lo cual indica distintos grados de inflamación sistémica en cada grupo (Tabla 2).

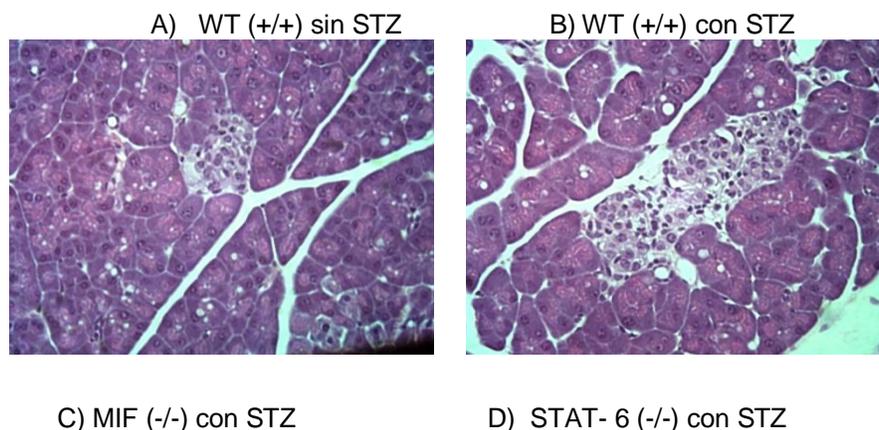
Semana	WT (+/+) sin STZ	MIF (-/-) sin STZ	STAT 6 (-/-) sin STZ	WT (+/+) con STZ	MIF (-/-) con STZ	STAT 6 (-/-) con STZ
0	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
1	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

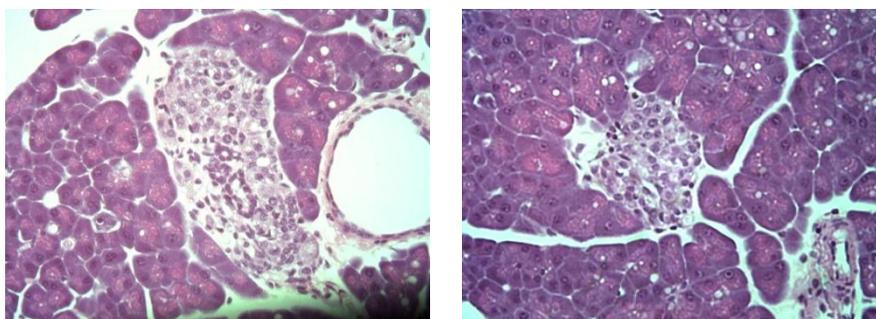
2	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
3	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo
4	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
5	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
6	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo
7	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo

Tabla 2. Determinación de CRP en suero. Tabla representativa del patrón observado en 4 experimentos independientes con un número de 5 ratones en cada grupo por experimento.

VII.7 Histología de páncreas.

A continuación se muestran cortes histológicos de páncreas de los diferentes grupos experimentales. Se puede observar en la figura 6) A, correspondiente a un control sano [WT (+/+) sin STZ], que los islotes pancreáticos están bien formados, sin daño. En la figura 6) B se muestra un control inducido [WT (+/+) con STZ], el cual tampoco mostró un daño aparente y, lo más importante para nuestro modelo, no se encontró infiltrado celular. En el grupo [MIF (-/-) con STZ] (figura 6) C), tampoco se observó infiltrado celular; al igual que en el grupo [STAT- 6 (-/-) con STZ], correspondiente al corte D. Todas éstas imágenes correspondientes a un modelo de DMT-2 fueron comparadas con imágenes obtenidas de modelos en ratones Balb/c de DMT-1, obtenidas en el mismo grupo de trabajo, cuya apariencia general corresponde a la imagen mostrada en el corte E. Esto demuestra que en nuestro modelo de DMT-2 no hubo en ninguno de los casos destrucción de los islotes pancreáticos y que el modelo de DMT-2 es viable.





E) Balb/c DMT-1*

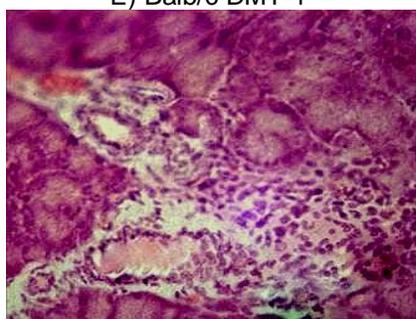


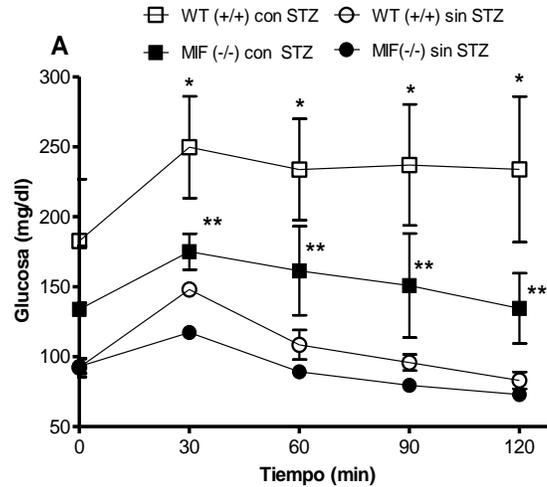
Figura 6. Fotos seleccionadas de cortes pancreáticos del total de 4 experimentos independientes, vistos a un aumento de 40 X. Tinción Hematoxilina- Eosina (HE). Imagen proporcionada por la M. en C. Arlett F. Espinoza.

VII.8 Curva de Tolerancia a la Glucosa

En la gráfica 11 (A) se muestra el patrón de tolerancia a la glucosa en los ratones controles sanos, se puede observar que después de administrar por vía oral una solución de 2 mg/kg de glucosa: la glucemia alcanzo un pico de 100 mg/dl después de 30 minutos de la administración de la solución, posteriormente disminuyó gradualmente con el transcurso del tiempo hasta que alcanzaron los valores iniciales, pasados 120 minutos posteriores a la administración.

Como se observa en la gráfica 11 (B), en los grupos con STZ a las 3 semanas posteriores a la inducción y bajo las mismas condiciones que los controles la glucosa en sangre no es regulada de manera total; así en el transcurso de los 120 min la concentración de glucosa en sangre permaneció alta, comparado con los controles, en

los cuales pasados los 120 min posteriores a la administración de la solución de glucosa (2 mg/gk) los valores de glucosa regresan a los niveles basales.

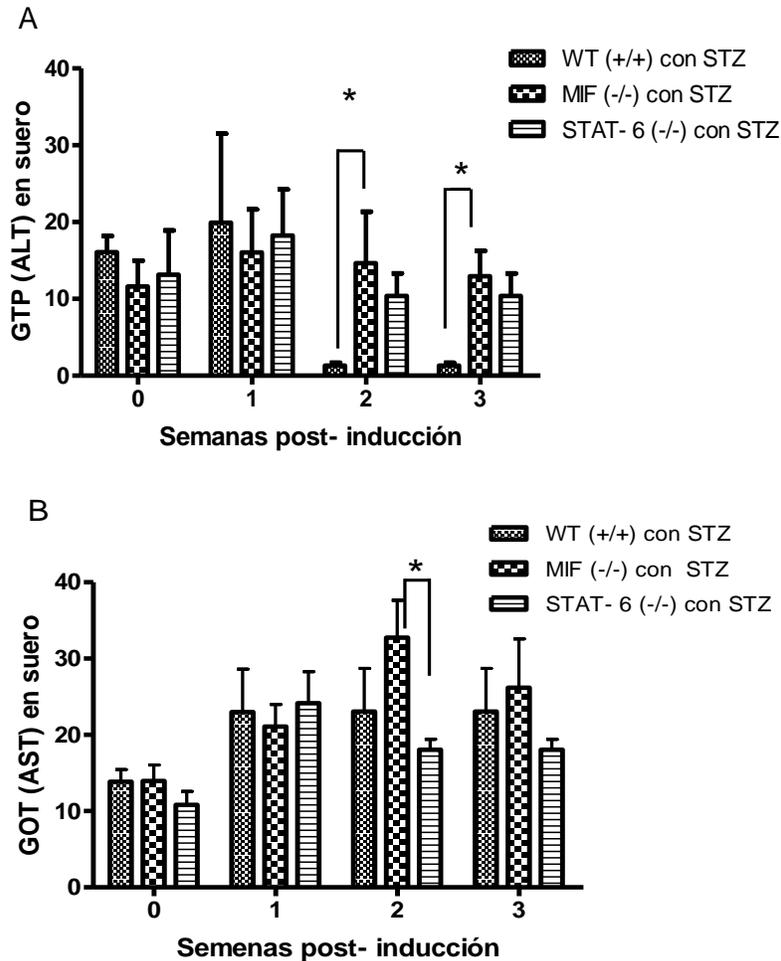


Gráfica 11. Curva de tolerancia a la glucosa en ratones BALB/c sanos [WT sin STZ] y con DMT-2 en la semana 3 posterior a la inducción. Patrón observado en 4 experimentos independientes con un número de 5 ratones en cada grupo por experimento. * $p < 0.05$ "t" de Student (Graphpad Prism).

VII.9 Enzimas hepáticas en suero.

En los procesos de análisis clínicos que involucran directamente al tejido hepático, resulta de gran utilidad determinar los valores séricos de transaminasas; como la alanina aminotransferasa (ALT o GTP) y la aspartato aminotransferasa (AST o GOT), dos enzimas que se expresan cuando hay daño en el hígado.

En este trabajo se determinaron estas dos enzimas en los diferentes grupos experimentales. En cuanto a la GTP (ALT), se observa que en las semanas 2 y 3 el grupo control positivo [WT (+/+) con STZ], presentaron una disminución con respecto al tiempo 0, correspondiente al basal de ALT en ratones sanos; gráfica 12 A).



Gráficas 12. Enzimas hepáticas indicadoras de inflamación. Patron observado en 4 experimentos independientes con un número de 5 ratones en cada grupo por experimento. * $p < 0.05$ "t" de Student (Graphpad Prism).

De acuerdo con la determinación de la enzima GOT (AST), esta muestra diferencias solo en la semanas 2 y 3 entre los grupos [MIF (-/-) con STZ] y [WT (+/+) con STZ] con respecto al tiempo 0 correspondiente a los niveles basales de AST en ratones sanos; (gráfica 12 B).

VII.10 Bloqueo sistémico del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) por medio de inhibidores sintéticos vía i.p. y oral.

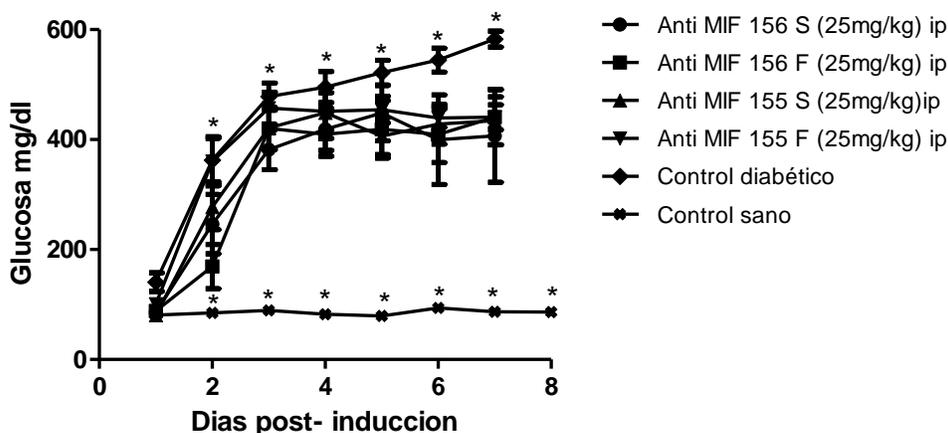
Con base en los resultados anteriores, podemos establecer que la ausencia de MIF aminora el impacto en el desarrollo de DMT-2. Con el propósito de comprobar lo anterior por otros medios, se usó otra vía para bloquear MIF probando cuatro diferentes

inhibidores sintéticos (156 S, 156 F, 155 S y 155F), administrados diariamente por una semana y hasta 30 días, según el experimento vía i.p. y oral a diferentes dosis.

•Glucosa en sangre.

De acuerdo a la gráfica 13, con los 4 diferentes inhibidores observamos que a la dosis de 25 mg/kg todos los grupos de ratones tratados presentan diferencias significativas en la glucemia, en comparación con los controles sanos a partir del segundo día post inducción, lo cual mostró que nuestro modelo es efectivo en ratones ICR. En cuanto a la efectividad de los inhibidores, el identificado como 156 S sólo produjo diferencias significativas en los días 1 y 6; mientras que con el inhibidor 156 F se obtuvieron diferencias significativas con respecto a los controles diabéticos, en los días 1, 2, 6 y 7. Los ratones tratados con el inhibidor 155 S, presentaron diferencias con respecto a los controles en el día 1, 5, 6 y 7.

Gráfica 13. Glucosa en sangre en ratones ICR inducidos con 200 mg de STZ, tratados con los primeros 4 tipos diferentes de inhibidor de MIF. Gráfica representativa de 3 experimentos



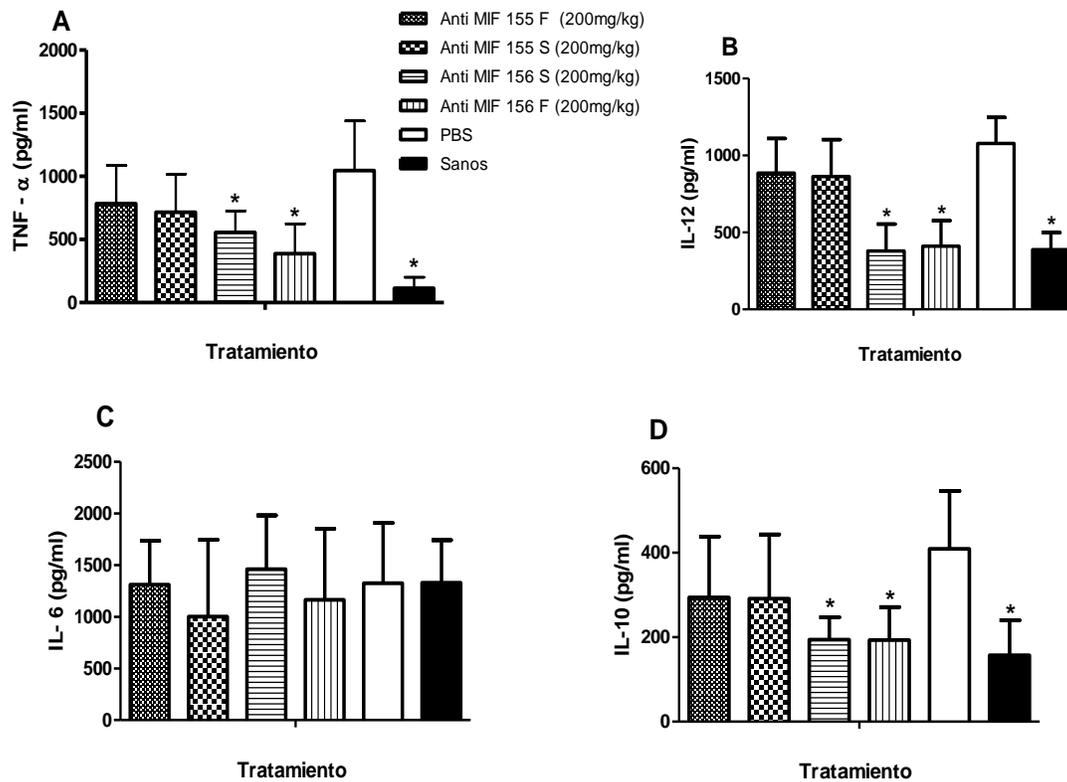
independientes con un número de 5 ratones en cada grupo por experimento. * $p < 0.05$ “t” de Student (Graphpad Prism).

•**TNF- α** . El efecto hipoglucémico del inhibidor se vio reflejado en las citocinas inflamatorias, tal es el caso de TNF- α , como se muestra en la gráfica 14 A, en donde se observa que los ratones tratados con los inhibidores 156 S y 156 F tuvieron una producción menor con respecto a los controles diabéticos. Los otros inhibidores (155 F y 155 S) no presentaron diferencias significativas respecto a los controles diabéticos en la producción de ésta citocina.

- **IL-12.** En cuanto a la producción de IL-12, las diferencias se encontraron en los ratones tratados con los inhibidores 156 S y F, en los cuales la producción de ésta citocina no presenta diferencias con los controles sanos pero sí con los controles diabéticos (Gráfica 14 B).

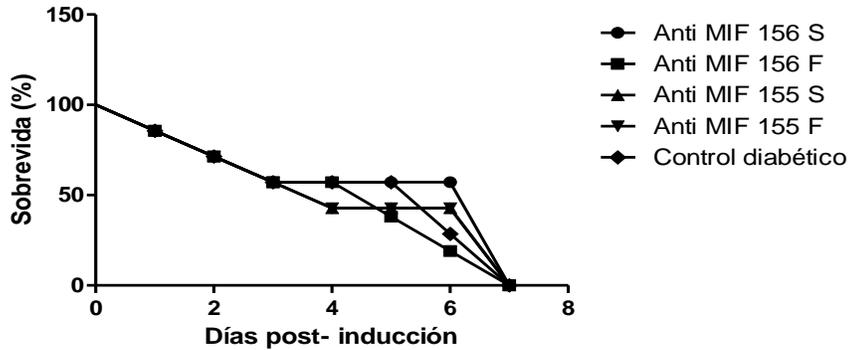
- **IL-6.** Como se ve en la gráfica, la producción de ésta citocina no cambia significativamente entre los diferentes grupos (Gráfica 14 C).

- **IL-10.** La producción de IL-10 se vio disminuida en comparación con los controles diabéticos (con una producción de 400 pg/ml), en los grupos tratados con el inhibidor 156 S y F, en los cuales se detectó una producción alrededor de 200 pg/ml; éstos últimos no muestran diferencias significativas con respecto a los controles sanos (Gráfica 14 D).



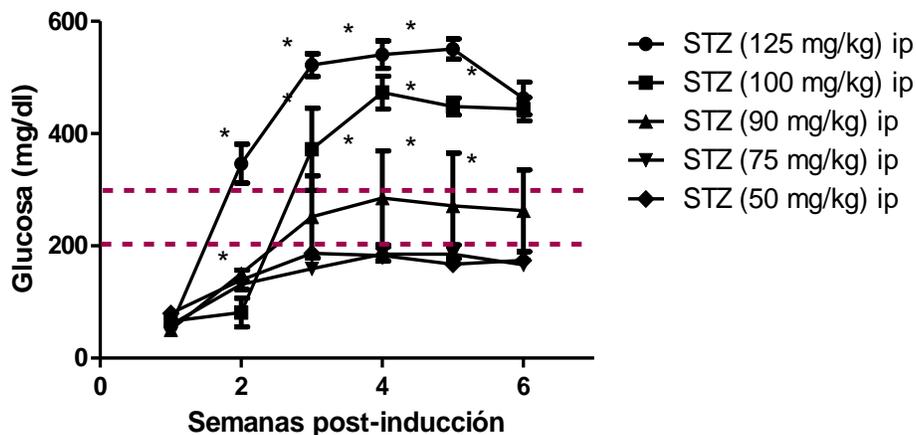
Gráfica 14. Producción de citocinas con inhibidores de MIF. Resultados obtenidos de 3 experimentos diferentes con una n de 5 ratones por grupo, * $p < 0.05$ "t" de Student (Graphpad Prism).

El efecto de los inhibidores en el control de la hiperglucemia fue significativo desde el segundo día posterior a la administración de STZ, lo que sugiere una acción inmediata. Sin embargo, la mortalidad fue bastante alta (Gráfica 15), incluso en el grupo control diabético, por lo que se decidió buscar una dosis de STZ con la que se pudiera obtener niveles glicemia entre 200 y 300 mg/dl.



Gráfica 15. Sobrevida. Experimento con inhibidores sintéticos anti-MIF y 200mg/kg de STZ. Como se puede observar, la mortalidad es alta en un tiempo corto, incluso en el grupo control; lo que sugiere que la dosis de STZ es bastante alta. Representativo de 2 experimentos independientes con un número de 5 ratones en cada grupo por experimento, * $p < 0.05$ "t" de Student (Graphpad Prism).

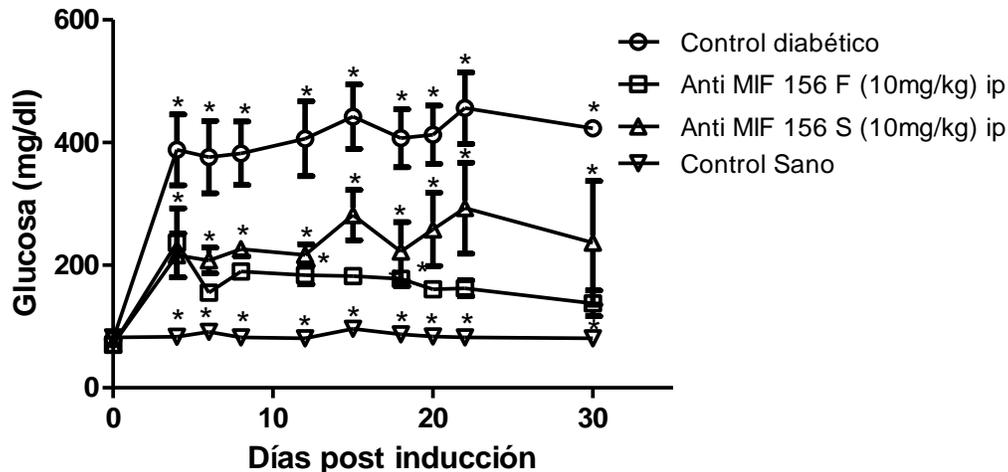
Para ello, con base en el conocimiento de la glucemia alcanzada con las dosis utilizadas anteriormente, se propusieron 5 nuevas dosis a probar: 125mg/dl, 100mg/dl, 90mg/dl, 75mg/dl y 50mg/dl; obteniéndose los resultados mostrados en la gráfica 16.



Gráfica 16. Glucemia obtenida con las diferentes dosis de STZ. Datos de 3 experimentos independientes con un número de 5 ratones en cada grupo por experimento. * $p < 0.05$ "t" de Student (Graphpad Prism).

Mientras las dosis de 125 y 100 mg/kg alcanzaron glucemias de hasta 500 mg/dl, la dosis de 90 mg/kg produjo glucemias entre 200 y 300 mg/kg. Con ésta dosis se probó con la administración de los inhibidores anti MIF 156 F y S vía i.p., los cuales resultan efectivos en disminuir la concentración de glucosa sanguínea, con respecto a los

controles diabéticos a partir del tercer día post-inducción y hasta la conclusión del experimento. Por otro lado, comparando a los dos grupos tratados con los diferentes inhibidores, el medicamento identificado como 156 F mostró mayor eficacia, reduciendo la glucemia de manera significativa, respecto al grupo tratado con 156 S en los días 7-10,15, 19- 30; alcanzando glucemia por debajo de los 200mg (Gráfica 17).



Gráfica 17. Glucosa en sangre determinada con una dosis de 90 mg/kg de STZ y la administración de 10mg/kg de los inhibidores anti MIF 156 F y S. Ambos inhibidores logran controlar la glucosa en sangre, en comparación con el grupo control diabético. Esta gráfica representa el promedio de 3 experimentos con más de 5 ratones en cada grupo. * $p < 0.05$ "t" de Student (Graphpad Prism).

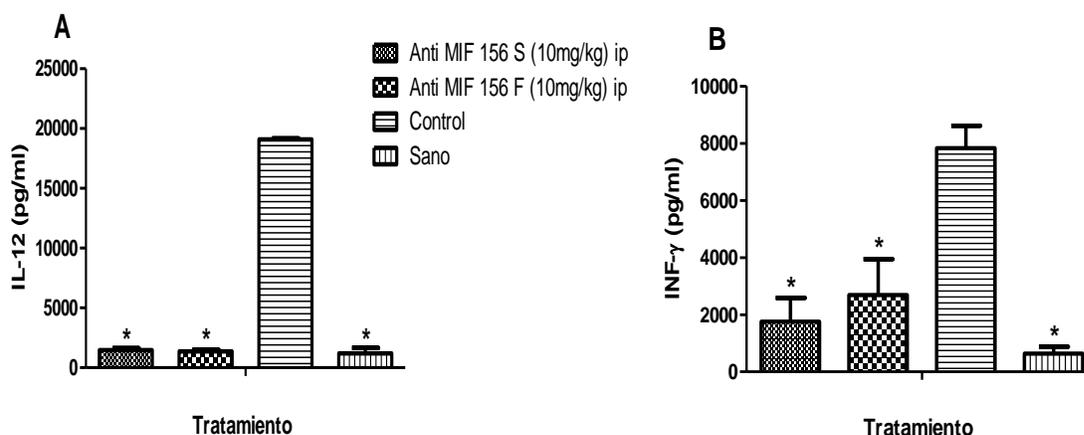
Con la administración de los inhibidores anti-MIF, la producción de citocinas también se vió alterada.

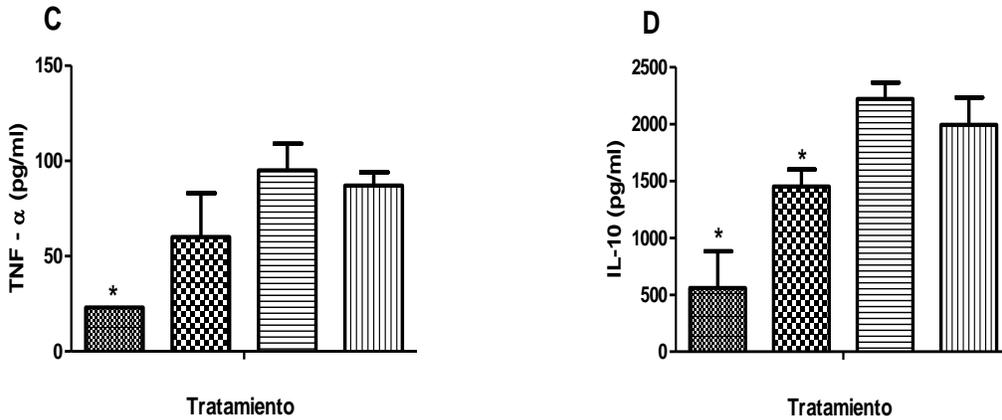
- **IL-12.** Como se observa en la gráfica 18 (A), la producción de IL-12 disminuyó en los grupos tratados con ambos inhibidores (con una producción alrededor de los 1000 pg/ml), los cuales fueron significativamente diferentes con respecto a los controles diabéticos, que alcanzaron la producción al rededor de los 20 000 pg/ml. La producción de IL-12 bajo el efecto de los inhibidores Anti MIF 156 S y F no representa valores significativamente diferentes, con respecto a los controles sanos.

- **INF- γ** . Otra citocina importante dentro de la respuesta inflamatoria es INF- γ , el cual bajo una dosis de inhibidor Anti MIF 156 S y F de 10mg/kg vía i.p. disminuyo de manera significativa con respecto a los controles diabéticos, con producción menor a los 2000 pg/ml en el grupo tratado con el inhibidor anti MIF 156 S y alrededor 3000 pg/ml para el grupo tratado con el inhibidor Anti MIF 156 F; contra una producción promedio de 8000 pg/ml registrada por el grupo control diabético (Gráfica 18 B).

- **TNF- α** . A pesar de observarse una diferencia en producción de TNF- α en el grupo tratado con el inhibidor anti MIF 156 F con respecto al control, ésta no resultó significativa; en cambio, el grupo tratado con el inhibidor 156 S si produjo significativamente menos con respecto a los controles diabéticos, e inclusive menores con respecto al control sano (Gráfica 18 C).

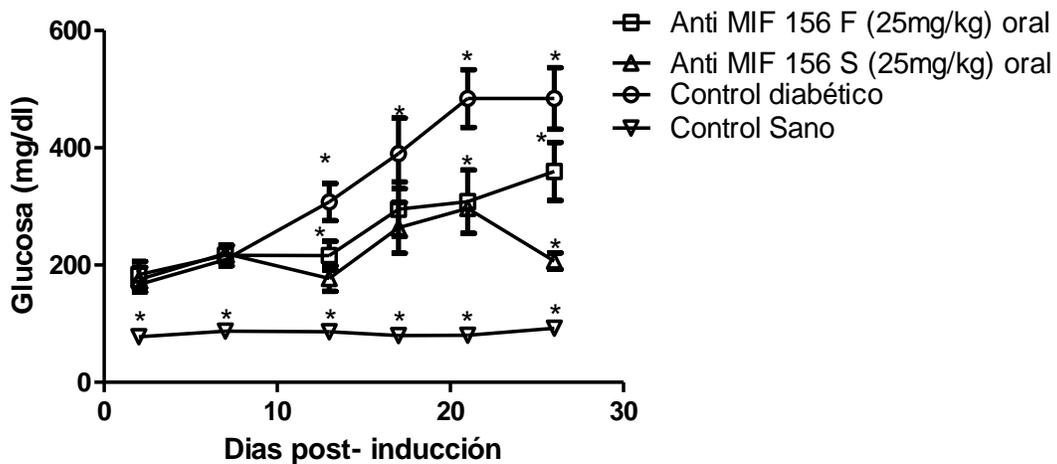
- **IL-10**. A pesar de que MIF no parece estar implicado directamente con citocinas anti- inflamatorias, al bloquear ésta citocina con los inhibidores Anti MIF 156 F y S, la producción de IL-10 disminuyo, alcanzando éstos últimos grupos una producción por debajo de los controles (sanos y diabéticos) y resultando con un mayor efecto inhibitorio el grupo tratado con el inhibidor 156 S (Gráfica 18 (D)).





Gráfica 18. Producción de IL-12 (A), INF- γ (B), TNF- α (C) e IL-10 (D) con la administración del inhibidor anti MIF a una dosis de 10 mg/kg. Promedio de 3 experimentos diferentes con 5 organismos por grupo, * $p < 0.05$ "t" de Student (Graphpad Prism).

Los inhibidores anti MIF 156 F y S mostraron mayor efectividad, vía oral, con una dosis de 25mg/kg, como se muestra en la gráfica 19. El grupo tratado con el inhibidor anti MIF 156 F presenta diferencias significativas con respecto a los controles diabéticos, a partir del decimo día post inducción; sin embargo, la diferencia es mayor en el grupo tratado con el inhibidor 156 S con respecto a los controles diabéticos. Todos los grupos desarrollaron glucemia mayor respecto a los controles sanos y el grupo control diabético alcanzó glucemia promedio de 500 mg/dl.



Gráfica 19. Glucosa en sangre determinada con una dosis de 90 mg/kg y la administración de 25mg/kg de los inhibidores anti MIF 156 F y S. Promedio de 2 experimentos independientes con un número de 6 ratones en cada grupo por experimento. * $p < 0.05$ "t" de Student (Graphpad Prism).

II.11 Bloqueo Sistémico del p38 (Citocinas pro-inflamatorias) por medio de inhibidores sintéticos.

La molécula p38 pertenece a la familia de las MAPK (mitogen activated protein kinase) y tiene 4 isoformas conocidas (α, β, γ y δ - 31). En células de mamíferos, las isoformas de p38-MAPK están fuertemente activados por el estrés ambiental, por citocinas inflamatorias y por otros estímulos [54]. Algunos estudios sugieren que p38 es importante para una respuesta inflamatoria normal. p38 es activado en macrófagos, neutrófilos y células T por numerosos mediadores intracelulares de inflamación, incluyendo quimo-atrayentes, citocinas, quimiocinas y lipopolisacáridos bacterianos [55]. Participa en la función de macrófagos y neutrófilos mediante la producción de INF- γ . En estudios donde se ha inhibido p38, se ha observado que, esta molécula regula la expresión de muchas citocinas, factores de transcripción y receptores en la membrana celular [56].

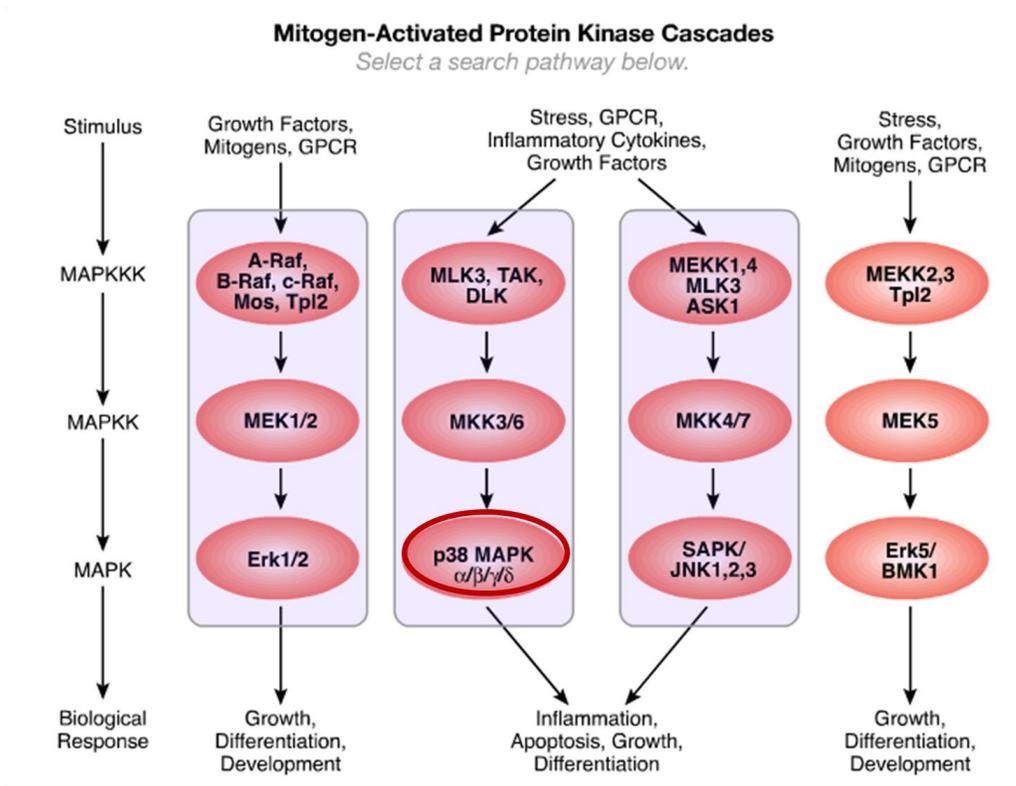
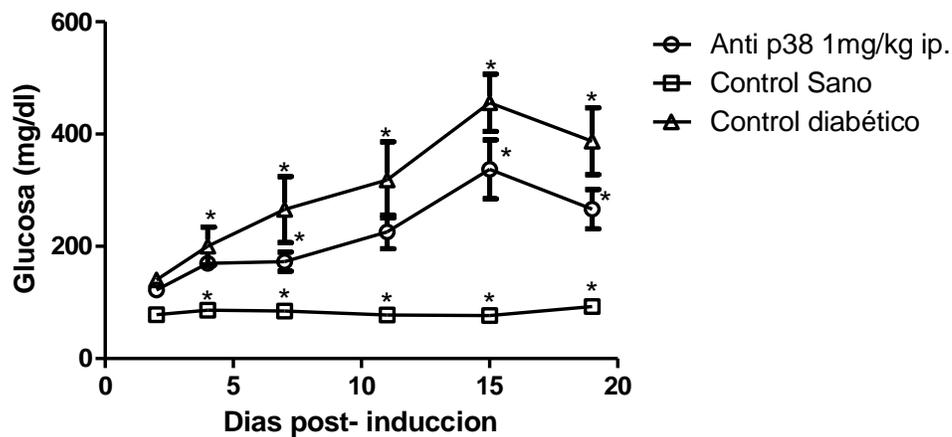


Figura 7. Factores de activación y funciones generales de las diferentes isoformas de p38. Tomado de cell signaling technology <http://www.cellsignal.com/pathways/map-kinase.jsp>

II.11.1 Inhibidor p38 i.p.

En nuestro estudio, la glucemia obtenida con dosis de 1mg/kg del inhibidor de p38 fue menor en comparación con el grupo control diabético a partir del día 7 post inducción excepto en el día 11, a partir del cual las diferencias entre los dos grupos se hacen mas evidentes hasta el día 19 (Gráfica 20).



Gráfica

20. Glucosa en sangre determinada con una dosis de 90 mg/kg y la administración del inhibidor de p38 a una dosis de 1 mg/kg i.p. Promedio de 2 experimentos independientes con un número de 6 ratones en cada grupo por experimento. * $p < 0.05$ "t" de Student (Graphpad Prism).

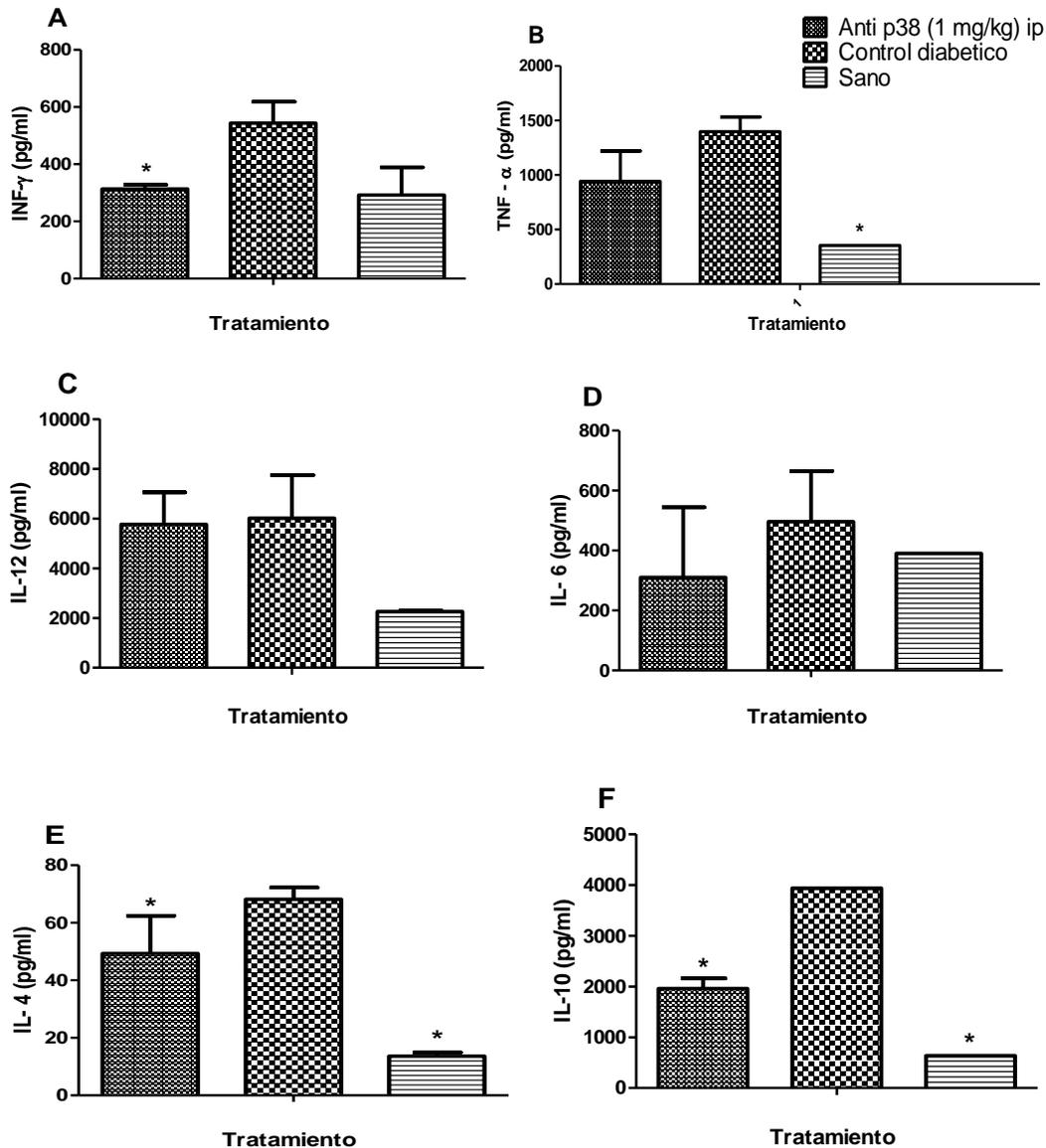
Como se mencionó, la inhibición de p38 produce cambios en la producción de citocinas, en nuestro estudio las citocinas también se vieron disminuidas al inhibir la molécula p38 a una dosis de 1 mg/kg.

- **INF- γ .** La producción de esta citocina es reducida significativamente con respecto a los controles diabéticos, no presenta diferencias con respecto a los controles sanos (grafica 21 A).

- **TNF- α , IL-12 e IL-6.** La cuantificación de estas citocinas (Gráfica 21 B,C y D respectivamente) reveló que éstas no fueron producidas a niveles diferentes por parte del grupo tratado con el inhibidor anti p38, con respecto a los controles diabéticos.

- **IL-4 e IL-10.** Contrariamente a lo que podría pensarse, la producción de las citocinas anti-inflamatorias se vieron reducidas significativamente con respecto a los controles diabéticos, quedando por arriba de los controles sanos (Gráfica 21 E y F).

Estos valores corresponden a muestras tomadas antes de la inducción con STZ y al término del experimento.

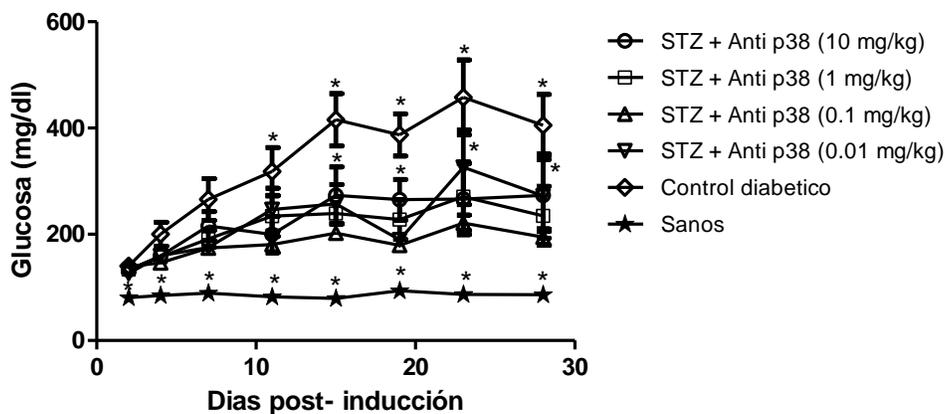


Gráfica 21. Producción de INF- γ (A), TNF- α (B), IL-12 (C), IL-6 (D), IL-4 (E) e IL-10 (F) en el modelo de administración del inhibidor de p38 en ratones inducidos con DMT-2 con 90 mg/kg de STZ. Promedio de 3 experimentos diferentes con 5 organismos por grupo. * $p < 0.05$ "t" de Student (Graphpad Prism).

II.11.2 Inhibidor de p38 vía oral

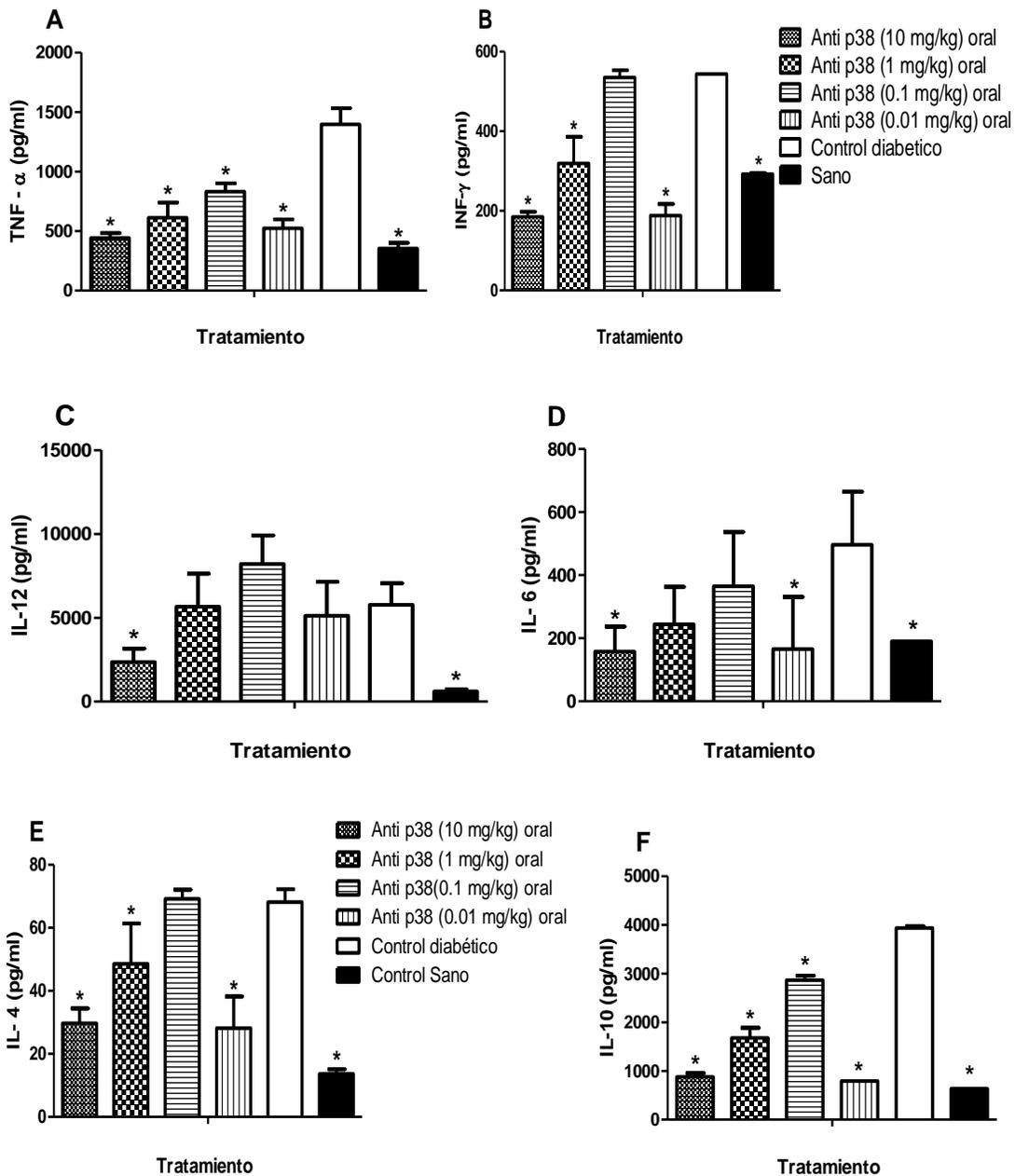
Una vez que establecimos que la dosis de 1mg/kg i.p. del inhibidor de p38 era efectiva, disminuyendo las citocinas pro- inflamatorias, probamos diferentes dosis con la finalidad de establecer una dosis- mínima efectiva, vía oral. Observamos que el efecto hipoglucémico del inhibidor de p38 fue más evidente a partir del día 15 post- inducción

en todas las dosis utilizadas. De acuerdo a la glucemia promedio, la dosis de inhibidor anti p38 más efectiva fue aquella de 0.1 mg/kg de STZ (Gráfica 22).



Gráfica 22. Glucemia obtenida al administrar el inhibidor anti p38 a diferentes dosis, como se puede ver todas las concentraciones ejercen un efecto positivo en la disminución de la glucemia, en comparación a los controles diabéticos. Promedio de 2 experimentos independientes con un número de 6 ratones en cada grupo por experimento. * $p < 0.05$ "t" de Student (Graphpad Prism).

En cuanto a la producción de citocinas (Gráfica 23), pudimos establecer que: la administración de 10 mg/kg de inhibidor anti p38 en ratones inducidos con 90mg/kg de STZ, es la dosis con la que los efectos del inhibidor fueron más notorios, ya que todas las citocinas evaluadas presentan diferencias significativas con respecto a los controles diabéticos. Por otro lado, la dosis de 1mg/kg de inhibidor, vía oral, produjo niveles bajos de TNF- α , INF- γ , IL-4 e IL-10. Con la dosis de 0.1 mg/kg de inhibidor, solo se lograron producciones menores de TNF- α IL-4 e IL-10 y en el caso de los ratones tratados con la dosis de 0.01mg/kg solo se obtuvieron niveles reducidos de TNF- α , INF- γ , IL-6, IL-4 e IL-10. De acuerdo al número de citocinas pro-inflamatorias que cada una de las dosis fue capaz de disminuir con respecto al control, se podría decir que las dosis más efectivas son la más alta (10 mg/kg) y la más baja (0.01mg/kg).



Gráfica 23. Producción de citocinas ante la inhibición de p38 vía oral. El efecto en las citocinas pro inflamatorias A) TNF- α , B) INF- γ , C) IL-12 y D) IL-6; es mayor a dosis más altas del inhibidor, mientras que se obtuvieron las producciones más bajas de citocinas anti-inflamatorias E) IL-4 y F) IL-10 en las dosis más bajas del inhibidor. Promedio de 3 experimentos diferentes con 5 organismos por grupo.

VIII. DISCUSIÓN.

La enfermedad conocida como DMT-2 es la primera causa de muerte en México [9] y es cada vez más común en el mundo [5, 7]. Esta enfermedad se caracteriza, entre otras, cosas por la presencia de resistencia a la insulina (IR- i), la cual es causada por una condición inflamatoria crónica de bajo grado en tejido adiposo y células pancreáticas. Esto puede estar regulado por citocinas pro-inflamatorias como MIF, TNF- α e IL-1 β [29].

La principal característica de la DMT-2 es la hiperglucemia crónica, la cual es un síntoma cuantificable que indica anomalías en el metabolismo de los lípidos y carbohidratos [3]. De acuerdo con la evaluación de la glucemia entre los diferentes grupos experimentales en ratones con fondo genético Balb/c, ante la inactividad del gen de MIF la concentración de glucosa en la sangre no cambió significativamente durante el experimento (Gráfica 1). Este fenómeno fue igualmente observado en ratones ICR con administración de inhibidores sintéticos anti-MIF, a diferentes dosis (Gráficas 13, 17, 19) y con la administración de inhibidores anti p38 (Gráficas 20 y 22). Esta es la primera señal que indica que, efectivamente, la diabetogénesis está estrechamente relacionada con una condición inflamatoria, como es el caso de la artritis reumatoide; enfermedad inflamatoria en la que se sabe MIF es altamente expresado y representa una llave importante hacia la respuesta inflamatoria.

Por otro lado, en los ratones que no expresan el gen de MIF encontramos que los síntomas clínicos característicos de la DMT-2 son atenuados, tal es el caso de la pérdida de peso (gráfica 2), polidipsia, polifagia y poliuria (tabla 1); además de que desarrollaron un daño renal menor (valor de proteínas en orina de 1+, tabla 1) comparado con los controles positivos [WT (+/+) con STZ] (valor de proteínas en orina 4+, tabla1), sin daño hepático aparente (gráfica 12).

Ante condiciones inflamatorias como la presente en la DMT-2, uno de los signos clínicos evaluados en el diagnóstico de la enfermedad es la proteína C-reactiva, la cual es indicativa de inflamación no sólo para el diagnóstico de DMT-2, sino para artritis y otras enfermedades autoinmunes. De manera que el “test” de proteína C-reactiva resulta positivo en ratones silvestres [WT (+/+) con STZ] desde la segunda semana; por el contrario en ratones [MIF^{-/-} con STZ] y STAT 6^{-/-} con STZ] esta positividad aparece hasta semanas posteriores (4 y 7 semanas, respectivamente). Comprobándose así que ante la ausencia de estos dos genes la producción de Proteína C reactiva por condición inflamatoria es retrasada en el hígado.

MIF actúa sobre los macrófagos y otras células estimulándolas para seguir con la cascada inmune, promoviendo que otras citocinas pro-inflamatorias sean expresadas, de manera que los niveles de citocinas como IL-6 (gráficas 5, 14, 21 y 23), IL-12 e INF- γ (Gráficas 14, 18, 21 y 23) se vieron disminuídos ante la ausencia o bloqueo de MIF y de la molécula p38. Además, probablemente MIF promueve de igual manera la producción de resistina, ya que ante la ausencia de MIF la producción de resistina fue menor (Gráfica 8). En cualquier caso, es evidente que ante la ausencia de MIF la respuesta inflamatoria se ve disminuída.

De todas estas citocinas pro-inflamatorias IL-1 β (gráfica 4) y TNF- α (3, 14, 18, 21 y 23), son las de mayor importancia debido a que son las responsables que bloquear los receptores de glucosa en el músculo (IR-1 e IR-2) debido a esto, la glucosa circulante no es captada por las células y por tanto acumulada en la sangre (de ahí la hiperglucemia); esta condición, en la cual la glucosa no puede ser utilizada por las células es llamada “tolerancia a la glucosa”, en cuya prueba se observó que ante la ausencia de MIF la homeostasis de la glucosa es mejor que cuando está presente (Gráfica 11). La insulina no puede actuar en las células debido a que los receptores de insulina están bloqueados y por tanto esta no puede ejercer su acción, provocando así una condición de resistencia a la insulina. Así, MIF es una citocina pro-inflamatoria importante para esta condición.

Un estudio reciente usando anticuerpos que bloquean MIF ha encontrado que el bloqueo terapéutico de MIF reduce la severidad y progresión de la diabetes autoinmune. Por tanto, usando un nuevo antagonista de MIF (inhibidor anti-MIF 156 S), nosotros determinamos si MIF es el blanco terapéutico para la DMT-2 inducida por STZ. Además, la administración del inhibidor anti-MIF 156 S en dosis de 0.1 y 0.01mg/kg en ratones ICR con STZ redujo la severidad de la DMT-2, la cual se asoció con una reducción significativa en los niveles séricos de citocinas y de glucosa en sangre con niveles menores de poliuria. Juntos, estos resultados demuestran que MIF es un nuevo blanco terapéutico para tratar la DMT-2.

Por otro lado, STAT- 6 es un factor de transcripción que promueve la producción de citocinas anti-inflamatorias como IL-4 (Gráfica 9) e IL-10(Gráfica 10). En la normalidad de la respuesta inmune, la respuesta pro-inflamatoria y la respuesta anti-inflamatoria se presentan en un estado de equilibrio, en el cual son mutuamente excluyentes, lo que significa que ante una respuesta pro-inflamatoria incrementada, citocinas como IL-4 o IL-13 inhiben la acción de algunas citocinas pro-inflamatorias. Sin embargo, estas dos condiciones opuestas (anti y pro-inflamatoria) están estrechamente ligadas, es por ello que ante la inhibición de la respuesta Th2, mediante la delección de STAT- 6, se esperaba que se presentara una respuesta pro-inflamatoria exacerbada indicada con hiperglucemia que se supuso sería semejante a los controles diabéticos; sin embargo, los resultados obtenidos demuestran que aún cuando en el sistema vivo se encuentra parcialmente ausente la respuesta anti-inflamatoria, la glucemia regulada de cierta manera y no se dispara como los controles diabéticos. Tratando de buscar una explicación a esto en la literatura se encontró que la resistina corresponde a una familia de citocinas llamada RELMs, la cual está compuesta por varias proteínas conservadas de más o menos 12.5 KDa con 10 u 11 residuos de cisteínas que promueven la formación de especies oligoméricas de proteínas.

El primer miembro de la familia, resistina, encontrada en la zona inflamatoria 3 (FIZZ3), es una nueva adipocitocina que puede ser la unión entre obesidad,

inflamación y DMT-2. Molécula tipo Resistina (RELM)- α fue encontrada originalmente en modelos animales en la zona designada como FIZZ1. La familia de citocinas RELM fueron observadas, posteriormente, en otros tejidos como corazón, pulmón, lengua, intestino y tejido adiposo.

Recientemente RELM- γ se ha visto que es sobre expresado en tejido hematopoyético. Basado en un dato relativamente fuerte, emerge la unión de los RELMs con procesos inflamatorios, identificando a RELM- β como un miembro de la firma del Asma, o una citocina importante envuelto en la respuesta innata de la mucosa [57]. En síntesis, la resistina pertenece a la familia de citocinas conocidas como RELMs. Dentro de esta familia también se encuentra RELM- β y esta es inducida por IL-4, IL-13 vía STAT-6. Por lo tanto, debido a que pertenecen a la misma familia, cabe la posibilidad de que haya alguna conexión entre resistina y STAT-6; de esta manera podría explicarse el por qué ante la ausencia de ésta molécula, la glucemia es baja, no tanto como en ratones [MIF (-/-) con STZ], pero no iguales que en los controles [WT (+/+) con STZ, 58].

Esta es una hipótesis que queda como puerta de entrada hacia futuros experimentos.

IX. CONCLUSIONES.

1. Ante la ausencia o bloqueo de MIF la glucosa en sangre es menor a los controles diabéticos.
2. Ante la ausencia de MIF síntomas propios de una condición diabética como la pérdida de peso, poliuria, polidipsia, polifagia, producción de proteína C-Reactiva y daño renal son disminuidos.
3. Ante la ausencia de MIF, citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 y resistina se ven disminuidas y por tanto la inflamación no es muy desarrollada.
4. MIF es una citocina capaz de desatar la respuesta inflamatoria que conlleva a la resistencia a la insulina y por lo tanto a la diabetogénesis.
5. Ante la ausencia del factor de transcripción STAT-6 la glucosa en sangre es menor que en los controles.
6. La insulina no se ve alterada significativamente, lo que sugiere que la causa principal del desarrollo del modelo es la resistencia a la insulina y no la falta de producción de insulina.

X. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Giugliano, D., A. Ceriello, y K. Esposito, *Glucose metabolism and hyperglycemia*. Am J Clin Nutr, 2008. 87(1): p. 217S-222S.
2. Maedler, K., *Beta cells in type 2 diabetes - a crucial contribution to pathogenesis*. Diabetes Obes Metab, 2008. 10(5): p. 408-20.
3. Association, A.D., *Diagnosis and classification of diabetes mellitus*. Diabetes Care, 2006. 29 Suppl 1: p. S43-8.
4. Barroso, I., *Genetics of Type 2 diabetes*. Diabet Med, 2005. 22(5): p. 517-35.
5. Prentki, M. and C.J. Nolan, *Islet beta cell failure in type 2 diabetes*. J Clin Invest, 2006. 116(7): p. 1802-12.
6. *In the clinic. Type 2 diabetes*. Ann Intern Med, 2007. 146(1): p. ITC1-15; quiz ITC16.
7. Wild, S., et al., *Global prevalence of diabetes: estimates for the year 2000 and projections for 2030*. Diabetes Care, 2004. 27(5): p. 1047-53.
8. Brentjens, R. y L. Saltz, *Islet cell tumors of the pancreas: the medical oncologist's perspective*. Surg Clin North Am, 2001. 81(3): p. 527-42.
9. IMSS, *La Diabetes, primer causa de muerte en México*. La Jornada Jalisco, 2007.
10. Black, P.H., *The inflammatory consequences of psychologic stress: relationship to insulin resistance, obesity, atherosclerosis and diabetes mellitus, type II*. Med Hypotheses, 2006. 67(4): p. 879-91.
11. Feve, B., J.P. Bastard, y H. Vidal, *[Relationship between obesity, inflammation and insulin resistance: new concepts]*. C R Biol, 2006. 329(8): p. 587-97; discussion 653-5.
12. Flores Aldana M, P.Z.O.y.B.C.S., *El paradigma inmune TH1-TH2: un vínculo entre obesidad, arterosclerosis y Diabetes Mellitus*. Clin Invest Arterioscl. , 2005. 17(5): p. 232-48.
13. Navab, M., N. Gharavi, y A.D. Watson, *Inflammation and metabolic disorders*. Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 2008. 11(4): p. 459-64.
14. Calandra, T. and T. Roger, *Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity*. Nat Rev Immunol, 2003. 3(10): p. 791-800.

15. Sakaue, S., et al., *Promoter polymorphism in the macrophage migration inhibitory factor gene is associated with obesity*. Int J Obes (Lond), 2006. 30(2): p. 238-42.
16. Fain, J.N., *Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells*. Vitam Horm, 2006. 74: p. 443-77.
17. Hirokawa, J., et al., *Identification of macrophage migration inhibitory factor in adipose tissue and its induction by tumor necrosis factor-alpha*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. 235(1): p. 94-8.
18. Yabunaka, N., et al., *Elevated serum content of macrophage migration inhibitory factor in patients with type 2 diabetes*. Diabetes Care, 2000. 23(2): p. 256-8.
19. Ghanim, H., et al., *Circulating mononuclear cells in the obese are in a proinflammatory state*. Circulation, 2004. 110(12): p. 1564-71.
20. Herder, C., et al., *Association of systemic concentrations of macrophage migration inhibitory factor with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes: results from the Cooperative Health Research in the Region of Augsburg, Survey 4 (KORA S4)*. Diabetes Care, 2006. 29(2): p. 368-71.
21. Benigni, F., et al., *The proinflammatory mediator macrophage migration inhibitory factor induces glucose catabolism in muscle*. J Clin Invest, 2000. 106(10): p. 1291-300.
22. Steppan, C.M., et al., *The hormone resistin links obesity to diabetes*. Nature, 2001. 409(6818): p. 307-12.
23. Donn, R.P. y D.W. Ray, *Macrophage migration inhibitory factor: molecular, cellular and genetic aspects of a key neuroendocrine molecule*. J Endocrinol, 2004. 182(1): p. 1-9.
24. Bedard, S., B. Marcotte, y A. Marette, *Cytokines modulate glucose transport in skeletal muscle by inducing the expression of inducible nitric oxide synthase*. Biochem J, 1997. 325 (Pt 2): p. 487-93.
25. Fujimoto, M., et al., *A role for iNOS in fasting hyperglycemia and impaired insulin signaling in the liver of obese diabetic mice*. Diabetes, 2005. 54(5): p. 1340-8.
26. Renner, P., T. Roger, y T. Calandra, *Macrophage migration inhibitory factor: gene polymorphisms and susceptibility to inflammatory diseases*. Clin Infect Dis, 2005. 41 Suppl 7: p. S513-9.
27. Alexandraki, K., et al., *Inflammatory process in type 2 diabetes: The role of cytokines*. Ann N Y Acad Sci, 2006. 1084: p. 89-117.

28. Guzik, T.J., D. Mangalat, and R. Korbut, *Adipocytokines - novel link between inflammation and vascular function?* J Physiol Pharmacol, 2006. 57(4): p. 505-28.
29. Tilg, H. and A.R. Moschen, *Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity.* Nat Rev Immunol, 2006. 6(10): p. 772-83.
30. Kochan, Z. y J. Karbowska, [*Resistina--a new hormone secreted by adipose tissue (adipose tissue in insulin resistance)*]. Przegl Lek, 2003. 60(1): p. 40-2.
31. Wolf, G., *Insulin resistance and obesity: resistin, a hormone secreted by adipose tissue.* Nutr Rev, 2004. 62(10): p. 389-94.
32. Adeghate, E., *An update on the biology and physiology of resistin.* Cell Mol Life Sci, 2004. 61(19-20): p. 2485-96.
33. Guest, C.B., et al., *The implication of proinflammatory cytokines in type 2 diabetes.* Front Biosci, 2008. 13: p. 5187-94.
34. Haan, C., et al., *Jaks and cytokine receptors--an intimate relationship.* Biochem Pharmacol, 2006. 72(11): p. 1538-46.
35. Murray, P.J., *The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration.* J Immunol, 2007. 178(5): p. 2623-9.
36. Reich, N.C. y L. Liu, *Tracking STAT nuclear traffic.* Nat Rev Immunol, 2006. 6(8): p. 602-12.
37. Marrero, M.B., et al., *Role of the JAK/STAT signaling pathway in diabetic nephropathy.* Am J Physiol Renal Physiol, 2006. 290(4): p. F762-8.
38. Cetkovic-Cvrlje, M. y F.M. Uckun, *Effect of targeted disruption of signal transducer and activator of transcription (Stat)4 and Stat6 genes on the autoimmune diabetes development induced by multiple low doses of streptozotocin.* Clin Immunol, 2005. 114(3): p. 299-306.
39. De Carvalho, M.H., A.L. Colaco, y Z.B. Fortes, [*Cytokines, endothelial dysfunction, and insulin resistance*]. Arq Bras Endocrinol Metabol, 2006. 50(2): p. 304-12.
40. Hotamisligil, G.S., *Inflammation and metabolic disorders.* Nature, 2006. 444(7121): p. 860-7.
41. Peraldi, P. y B. Spiegelman, *TNF-alpha and insulin resistance: summary and future prospects.* Mol Cell Biochem, 1998. 182(1-2): p. 169-75.

42. Goyenechea, E., M.D. Parra, y J.A. Martinez Hernandez, [*Role of IL-6 and its -174G>C polymorphism in weight management and in the metabolic comorbidities associated with obesity*]. *An Sist Sanit Navar*, 2005. 28(3): p. 357-66.
43. Chen, H., *Cellular inflammatory responses: novel insights for obesity and insulin resistance*. *Pharmacol Res*, 2006. 53(6): p. 469-77.
44. Hayashi, K., R. Kojima, y M. Ito, *Strain differences in the diabetogenic activity of streptozotocin in mice*. *Biol Pharm Bull*, 2006. 29(6): p. 1110-9.
45. Bolzan, A.D. y M.S. Bianchi, *Genotoxicity of streptozotocin*. *Mutat Res*, 2002. 512(2-3): p. 121-34.
46. Szkudelski, T., *The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas*. *Physiol Res*, 2001. 50(6): p. 537-46.
47. Imaeda, A., et al., *DNA damage and the effect of antioxidants in streptozotocin-treated mice*. *Food Chem Toxicol*, 2002. 40(7): p. 979-87.
48. Sun, N., et al., *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(4): p. 202-9.
49. Junod, A., et al., *Diabetogenic action of streptozotocin: relationship of dose to metabolic response*. *J Clin Invest*, 1969. 48(11): p. 2129-39.
50. Vollenweider, P., *Insulin resistant states and insulin signaling*. *Clin Chem Lab Med*, 2003. 41(9): p. 1107-19.
51. WM, T. y F.J. T., *Serological reactions in pneumonia with a non-protein somatic fraction of pneumococcus*. *J exp Med*, 1930. 52(11): p. 561-71.
52. Orrego, L.M., et al., [*Plasma C reactive protein in elective orthopedic surgery*]. *Rev Med Chil*, 2005. 133(11): p. 1341-8.
53. Ruckerl, R., et al., *Determinants of the acute-phase protein C-reactive protein in myocardial infarction survivors: the role of comorbidities and environmental factors*. *Clin Chem*, 2009. 55(2): p. 322-35.
54. Lee, J.C., et al., *A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis*. *Nature*, 1994. 372(6508): p. 739-46.
55. Ono, K. y J. Han, *The p38 signal transduction pathway: activation and function*. *Cell Signal*, 2000. 12(1): p. 1-13.

56. Roux, P.P. y J. Blenis, *ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions*. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. 68(2): p. 320-44.
57. Mishra, A., et al., *Resistone-like molecule-beta is an allergen-induced cytokine with inflammatory and remodeling activity in the murine lung*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2007. 293 (2): p. L305- 13.
58. Al- Azzawi, H. H., et al., *Resistin-like molecule alpha reduces gallbladder optimal tension*. J Gastrointest Surg, 2007. 11 (1): p. 95- 100.

XI. GLOSARIO

Glucógeno	El glucógeno es un polisacárido de reserva energética de los animales, formado por cadenas ramificadas de glucosa; es soluble en agua, en la que forma dispersiones coloidales. Abunda en el hígado y en el músculo.
Glucogenolisis	Es un proceso catabólico llevado a cabo en el citosol que consiste en la remoción de un monómero de glucosa de un glucógeno mediante fosforólisis para producir glucosa 1 fosfato, que después se convertirá en glucosa 6 fosfato, el segundo paso de la glucólisis. Es antagónica de la gluconeogénesis, estimulada por el glucagon en el hígado, epinefrina y adrenalina en el músculo e inhibida por la insulina.
Gluconeogénesis	Es una ruta metabólica anabólica que permite la síntesis de glucosa a partir de precursores no glucídicos. Incluye la utilización de varios aminoácidos, lactato, piruvato, glicerol y cualquiera de los intermediarios del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (o CICLO de Krebs) como fuentes de carbono para la vía metabólica. Todos los aminoácidos, excepto la leucina y la lisina, pueden suministrar carbono para la síntesis de glucosa. Algunos tejidos, como el cerebro, los eritrocitos, el riñón, la córnea del ojo y el músculo, cuando el individuo realiza actividad extenuante, requieren de un aporte continuo de glucosa, obteniéndola a partir del glucógeno proveniente del hígado, el cual solo puede satisfacer estas necesidades de 10 a 18 horas. Después de este periodo, el glucógeno almacenado en el hígado disminuye drásticamente. Debido a ello comienza la formación de glucosa a partir de sustratos diferentes al glucógeno. La gluconeogénesis ocurre casi exclusivamente en el hígado (10% en los riñones). Es un proceso muy importante, ya que en estados metabólicos como el ayuno los organismos superiores son capaces de sintetizar glucosa a partir de otras sustancias.
Hiperglucemia	La hiperglucemia es el término técnico que utilizamos para referirnos a los altos niveles de azúcar en la sangre. El alto nivel de glucemia aparece cuando el organismo no cuenta con la suficiente cantidad de insulina o cuando la cantidad de insulina es muy escasa. La hiperglucemia también se presenta cuando el organismo no puede utilizar la insulina adecuadamente.
Homeostasis de glucosa.	Comprende todos los procesos metabólicos por medio de los cuales la concentración de la glucosa en sangre es regulada

debido, principalmente, al equilibrio entre la liberación de insulina, por un lado, y la acción de otras hormonas contrarreguladoras, por otro.

Obesidad

Es una enfermedad crónica originada por muchas causas y con numerosas complicaciones, la obesidad se caracteriza por el exceso de grasa en el organismo y se presenta cuando el índice de masa corporal en el adulto es mayor de 30 kg/m² según la OMS (Organización Mundial para la Salud).

Resistencia a la insulina

Es una disminución en la acción de la insulina que puede producirse como consecuencia de una alteración a nivel de receptores, o post-receptor, disminución del flujo sanguíneo tisular, alteración del transporte celular de glucosa o defectos intracelulares del metabolismo (principalmente en músculo esquelético). La toxicidad de la glucosa en la hiperglucemia crónica puede alterar la secreción de insulina e inducir la resistencia a la insulina. Por eso, una vez que se ha establecido la hiperglucemia, el papel relativo de la resistencia a la insulina y de la deficiencia de insulina en la perpetuación de la hiperglucemia, puede ser difícil de diferenciar.