



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

# **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Caracterización del Factor Inhibidor de la Migración  
de Macrófagos (MIF) en la fisiopatogenia de la di-  
abetes mellitus tipo 2 en un modelo murino.

## **T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

**M.C. ESPERANZA GARCÍA REYES**

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA

COMITÉ TUTORAL

DRA. EMMA BERTHA GUTIERREZ MADRID-CIRLOS

DRA. ROCIO SALCEDA SACANELLES

**MEXICO, D.F.**

**ENERO**

**2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

# **POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

Caracterización del Factor Inhibidor de la Migración  
de Macrófagos (MIF) en la fisiopatogenia de la di-  
abetes mellitus tipo 2 en un modelo murino.

## **T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

**M.C. ESPERANZA GARCÍA REYES**

DIRECTORA DE TESIS

DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA

COMITÉ TUTORAL

DRA. EMMA BERTHA GUTIERREZ MADRID-CIRLOS

DRA. ROCIO SALCEDA SACANELLES

**MEXICO, D.F.**

**ENERO**

**2012**

Dr. Isidro Ávila Martínez  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 3 de octubre del 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL) del (la) alumno (a) GARCÍA REYES ESPERANZA con número de cuenta 78064391 con la tesis titulada "Caracterización del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) en la fisiopatogenia de la diabetes mellitus tipo 2 en un modelo murino", realizada bajo la dirección del (la) DRA. MIRIAM RODRÍGUEZ SOSA:

Presidente: DRA. ROCÍO SALCEDA SACANELLES  
Vocal: DRA. MARÍA CRISTINA FERNÁNDEZ MEJÍA  
Secretario: DR. RAFAEL VILLALOBOS MOLINA  
Suplente: DR. MAXIMILIANO IBARRA BARAJAS  
Suplente: DRA. YOLANDA IRASEMA CHIRINO LÓPEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 5 de enero de 2012.

*M: del Coro Arizmendi*  
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga  
Coordinadora del Programa

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

## **AGRADECIMIENTOS**

**Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM por permitirme hacer la maestría**

**Este trabajo fue financiado parcialmente por CONACYT 152224 y PAPIIT-IN212412**

**AI PROGRAMA DE APOYO A LA SUPERACIÓN ACADEMICA (PASPA) POR EL  
FINANCIAMIENTO ECONOMICO QUE RECIBI DURANTE MIS ESTUDIOS DE  
MAESTRÍA**

**Agradezco a la UNAM-FES-IZTACALA por el permiso de tiempo completo con goce de  
sueldo durante el desarrollo del 100% de créditos de la maestría**

### **AL COMITÉ TUTORAL**

**Dra. Miriam Rodríguez Sosa**

**Dra. Emma Berta Gutiérrez Cirlos Madrid**

**Dra. Rocío Salceda Sacanelles**

## **AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL**

<b>Presidente:</b>	<b>Dra. Rocío Salceda Sacanelles</b>
<b>Vocal:</b>	<b>Dra. María Cristina Fernández Mejía</b>
<b>Secretario:</b>	<b>Dr. Rafael Villalobos Molina</b>
<b>Suplente:</b>	<b>Dr. Maximiliano Ibarra Barajas</b>
<b>Suplente:</b>	<b>Dra. Yolanda Irasema Chirino López</b>

Gracias por sus importantes observaciones, sugerencias en la revisión de la tesis.

## DEDICATORIAS

Dedicada muy en especial a mi madre Emma Irma Reyes porque contigo escribí esta tesis al pie de tu cama. TE AMO HOY Y SIEMPRE, MAÑANA TE EXTRAÑARÉ.

A mi padre Santiago García Baca porque tú sembraste en mi la semilla de la superación; esté es tu fruto.

A mis hermanos Armando y Alejandro quienes como siempre me han acompañado y apoyado en toda mi vida.

A mi abuelita Micaela Reyes porque fuiste un pilar de fortaleza, y recibimos de ti la fuerza que ha impulsado a las nuevas generaciones. (Irma, Esperanza, Lilián y Nathalia)

A mis hijas Lilián y Nathalia porque son la razón de mi vida, con esta tesis les presento a la mujer profesionalista que les toco como mamá.

A mi esposo Flabio Camacho con todo cariño, por tu paciencia, porque tuviste que lavar trastos y cuidar niñas en lo que yo estudiaba.

A mi tutora Miriam, porque creyó en mí, antes de que yo creyera en mí. Por su gran comprensión y porque no sólo me abrió las puertas de su laboratorio, también las de su casa.

A la Dra. EMBER por su gran calidez y su amabilidad para conmigo y para con todos sus estudiantes junto con ella a su técnico académico Tecilli quien me enseñó hacer cálculos muy pacientemente.

A la Dra. Rocío Salceda por su gran experiencia y su sabiduría en cada uno de sus comentarios, me hicieron crecer.

A mi amigo y técnico académico de la UBIMED Dr. Alonso Vilchis por sus asesorías en las técnicas y por brindarme su amistad.

A mis compañeros y amigas del Lab-5. Victor, Fernando, Laurita, Michel, Rodrigo, Juan de Dios, Yuriko, Alicia e Imelda. Quienes vivieron conmigo el proceso de aprendizaje en los experimentos, en los tutorales y en clase. Gracias por su apoyo! Muy en especial a Alis e Ime por los momentos en que llore y también por los que reímos juntas.

A mis amigas y compañeras por que siempre tuvieron un “TU PUEDES” Elsa, Maritza, Anita, Miriam chiquita, Chio, Paty Barajas, Griselda, Araceli, Marcela, Chichen y Rubí.

A Lauris Vera porque me enseñó con el ejemplo que los médicos podemos hacer la Maestría en Ciencias Biológicas.

A TODOS LOS PROFESORES DE LA UBIMED LOS DOCTORES Santiago Martínez, Emma Berta Gutiérrez, Maximiliano Ibarra, Leticia Moreno, Ricardo Mejía, porque cada uno de ellos me apoyó en mi crecimiento profesional, especialmente al Dr. Ignacio Terrazas Valdés quien por primera vez me abrió su laboratorio y al Dr. Rafael Villalobos quien me abrió las puertas de la UBIMED. MUCHAS GRACIAS A TODOS

## INDICE

I ABREVIATURAS	1
II RESUMEN	2
III ABSTRACT	3
IV INTRODUCCIÓN	5
IV.1 Concepto, clasificación y epidemiología de la Diabetes Mellitus Tipo	5
IV.2 Inflamación	6
<b>IV.3 El Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF)</b>	6
IV.4 Mecanismo de señalización de MIF	7
IV.5 MIF en la patología diabética	9
IV.6 Estudios en pacientes diabéticos y niveles de MIF	11
V JUSTIFICACIÓN	13
VI HIPOTESIS	14
VII OBJETIVO GENERAL	15
VII. 1 Objetivos particulares	15
VIII MATERIAL Y METODOS	16
VIII. 1 Determinación del genotipo por PCR	16
VIII. 1.2 Amplificación del gen	16
VIII 1. 3 Electroforesis	17
VIII. 2 Desarrollo de Diabetes Mellitus tipo 2	17
VIII. 3 Evaluación clínica	18
VIII. 4 Parámetros en orina	18
VIII. 5 Curva de tolerancia a la glucosa	19
VIII. 6 Concentración de glucosa en sangre	19
VIII. 7 Histología de páncreas	19
VIII. 8 Obtención de islotes pancreáticos	19
VIII. 9 Ensayo de RT-PCR tiempo real para el RNAm de insulina	20
VIII. 10 Medición de citocinas en suero por ELISA	22
IX. RESULTADOS	23
IX. 1 Genotipo de los ratones, grupos experimentales	23
IX. 2 Polidipsia	24



IX. 3 Polifagia	25
IX. 4 Poliuria	26
IX. 5 Examen General de Orina	27
IX.6 Glucosuria	28
IX. 7 Talla	29
IX. 8 Peso	30
IX. 9 Curva de Tolerancia a la Glucosa	31
IX. 10 Concentración de glucosa en sangre	32
IX. 11 Cortes histológicos de páncreas tenidos con Hematoxilina-eosina	33
IX. 12 Cortes histológicos de páncreas de ratones controles	34
IX. 13 Cortes histológicos de páncreas de ratones MIF+/+ STZ y MIF-/- STZ	35
IX. 14 Número de islotes de Langerhans en los diferentes grupos	36
IX. 15 Determinación de insulina en el páncreas por RT-PCR Tiempo Real	37
IX. 16 Determinación de TNF- $\alpha$	38
IX. 17 Determinación de IL-1 $\beta$	39
IX. 18 Determinación de IL-10	40
IX. 19 Determinación de IL-4	41
X. DISCUSIÓN	42
XI CONCLUSIONES	46
XII BIBLIOGRAFIA	47
XIII APENDICES	50

## I ABREVIATURAS

MIF	Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos
DMT-1	Diabetes Mellitus Tipo 1
DMT-2	Diabetes Mellitus Tipo 2
HLA	Complejo Principal de Histocompatibilidad
BALB/c	Nomenclatura para designar cepa de ratones con fondo genético Th2 generados por endogamia.
HDL	Lipoproteína de alta densidad
LDL	Lipoproteína de baja densidad
CRP	Proteína C reactiva
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
TNF- $\alpha$	Factor de Necrosis Tumoral alpha
TNFR1	Receptor de Factor de Necrosis Tumoral 1
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 beta
INF $\gamma$	Interferón gama
ACTH	Hormona Corticotropina
TSH	Hormona Estimulante de Tiroides
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
APCs	Células presentadoras de antígeno
LPS	Lipopolisacárido
TLR	Receptor Toll Like
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógeno
ERK1/2	Cinasa activada por receptor extracelular 1/2
I $\kappa$ B	Inhibidor del factor nuclear
NF $\kappa$ B	Factor nuclear $\kappa$ B
PLA2	Fosfolipasa 2
ON	Óxido nítrico
COX2	Ciclooxigenasa 2
F2,6BP	Fructosa 2,6 bifosfato
PKC-1	Proteína cinasa C-1
PFK-1	Fosfofructocinasa 1

VCAM-1	Molécula de Adhesión Vasculiar 1
ICAM-1	Molécula de adhesión intracelular 1
IGT	Intolerancia a la glucosa
CTG	Curva de tolerancia a la glucosa
STZ	Estreptozotocina
ELISA	Análisis de inmunoadsorción ligados a enzima
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa transcriptasa inversa
DNAasa	Enzima que degrada DNA
RNAasa	Enzima que degrada RNA
RNAM	Mensajero de ácido ribonucleico
IRS-1	Sustrato del Receptor de Insulina 1
GLUT-4	Transportador de glucosa 4
PI3k	Fosfatidilinositol 3 cinasa
JNK	c-Jun N-Terminal cinasa

## II RESUMEN

La diabetes mellitus 2 (DMT-2) es un enfermedad crónico degenerativa con complicaciones que pueden causar la muerte. Se estima que su prevalencia mundial es de 6.4%, afectando a 285 millones de adultos en el año 2010, y se incrementará a 7.7%, 439 millones de adultos, para el año 2030. En los últimos años se ha reconocido a la inflamación moderada crónica como un factor desencadenante de la DMT-2. Al respecto, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  son las principales moléculas involucradas en los procesos inflamatorios crónicos con una participación importante en la fisiopatología de la resistencia a la insulina. El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) es una molécula que regula la expresión de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  y se sobreexpresa en la patología diabética. El objetivo de este trabajo fue caracterizar la expresión de MIF en los islotes pancreáticos y su posible participación en la fisiopatogenia de la DMT-2 en un modelo murino. Se utilizaron ratones macho de 7 semanas de edad con fondo genético BALB/c deficientes para el gen MIF (MIF $^{-/-}$ ) y como controles se usaron ratones silvestres del mismo fondo genético (MIF $^{+/+}$ ). La DMT-2 fue inducida con una dosis única de 130 mg/Kg de estreptozotocina (STZ) vía intraperitoneal. Se evaluaron las manifestaciones clínicas, ingesta de agua y volumen urinario producido en 24 horas. Se realizó la curva de tolerancia a la glucosa a la sexta semana. Semanalmente se tomaron muestras de suero para determinar citocinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) y anti-inflamatorias (IL-4, IL-10) por ELISA Sandwich. A las 8 semanas post-inducción con STZ se determinó la expresión del transcrito de insulina del páncreas de los ratones MIF $^{+/+}$ STZ y MIF $^{-/-}$ STZ. Aquí se muestra que los ratones MIF $^{-/-}$ STZ desarrollaron glicemias, pérdida de peso, poliuria y glucosuria menores que los MIF $^{+/+}$ STZ. La curva de tolerancia a la glucosa realizada a los ratones MIF $^{+/+}$  STZ y MIF $^{-/-}$ STZ confirmó el diagnóstico de DMT-2 las glicemias fueron arriba de valores normales en más de 2 ocasiones. Los cortes histológicos teñidos con H-E demostraron que no existió infiltración leucocitaria. Los islotes pancreáticos de los ratones MIF $^{+/+}$ STZ y MIF $^{-/-}$ STZ fueron muy similares morfológicamente a los islotes pancreáticos de los ratones controles. La abundancia del RNAm de insulina en los islotes pancreáticos de los ratones MIF $^{+/+}$ STZ y MIF $^{-/-}$ STZ es menor a 0.5 comparados con los ratones controles MIF $^{+/+}$  que fue de 1. La secreción de insulina de los islotes pancreáticos bajo estimulación con glucosa en los ratones MIF $^{-/-}$ STZ fue similar a los grupos controles MIF $^{+/+}$  y MIF $^{-/-}$  no así para el grupo de ratones MIF $^{+/+}$ STZ donde la secreción de insulina fue baja. En conclusión los ratones MIF $^{-/-}$ STZ desarrollaron manifestaciones clínicas significativamente menos severas, sus glicemias son bajas en comparación con los ratones MIF $^{+/+}$ STZ. Lo que sugiere que el gen de MIF participa de manera activa en la regulación de la secreción de insulina en la DMT-2.

### III ABSTRACT

Diabetes mellitus 2 (DMT-2) is a chronic degenerative disease with complications that can cause death. It is estimated that the worldwide prevalence is 6.4% affecting 285 million adults in 2010 and will increase to 7.7% to 439 million adults by 2030. Recently moderate chronic inflammation has been recognized as a trigger for DMT-2. In this regard, TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  are the main molecules involved in chronic inflammatory processes with an important role in the pathophysiology of insulin resistance. Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF) is a molecule that regulates the expression of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  and it is over-expressed in diabetic pathology. The aim of this study was to characterize the expression of MIF in pancreatic islets and their possible role in the pathogenesis of the DMT-2 in a murine model. Seven weeks old wild type (MIF<sup>+/+</sup>) and MIF knockout (MIF<sup>-/-</sup>) male BALB/c mice were used. The DMT-2 was induced via intraperitoneal with a dose of 130 mg/ kg of streptozotocin (STZ). We evaluated the clinical manifestations, water intake and urine volume produced in 24 hours. Glucose tolerance curve was performed after sixth week post-induction (p.i.). Serum samples were taken weekly to determine pro-inflammatory cytokines (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) and anti-inflammatory cytokines (IL-4, IL-10) by ELISA Sandwich. At 8 weeks p.i. the expression of insulin was determined on pancreas. MIF<sup>-/-</sup>-STZ mice developed lower levels of glycemia, weight loss, polyuria and glycosuria than MIF<sup>+/+</sup> STZ. Glucose tolerance curve from MIF<sup>+/+</sup> STZ and MIF<sup>-/-</sup> STZ confirm the diagnosis of DMT-2. Histological sections stained with HE showed that there was no leukocyte infiltration in pancreas. The pancreatic islets from mice MIF<sup>+/+</sup> STZ and MIF<sup>-/-</sup> STZ were morphologically similar to the pancreatic islets from control mice. The abundance of insulin mRNA in pancreatic islets of mice MIF<sup>+/+</sup> STZ and MIF<sup>-/-</sup> STZ was less than 0.5 relative expression (r.e.) compared to 1.0 r.e. observed in control mice MIF<sup>+/+</sup>. Pancreatic islets under glucose stimulation from MIF<sup>-/-</sup> STZ mice had similar insulin secretion that control groups MIF<sup>+/+</sup> and MIF<sup>-/-</sup> but not for the group of mice MIF<sup>+/+</sup> STZ where insulin secretion was lower. In conclusion, MIF<sup>-/-</sup>-STZ mice developed significantly less severe clinical manifestations, their glucose levels are low compared with mice MIF<sup>+/+</sup> STZ. This suggests that MIF has an important role in the regulation of diabetes pathology.

## IV INTRODUCCIÓN

### IV. 1 Concepto, clasificación y epidemiología de la Diabetes Mellitus

**Diabetes Mellitus.** La diabetes mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizada por hiperglucemia, defectos en la secreción de insulina y defecto en la acción de la insulina o ambas. La hiperglucemia en la diabetes está asociada a largo plazo con daño y disfunción de varios órganos, especialmente en ojos, riñón, nervios y vasos sanguíneos.

La diabetes se ha clasificado en dos grandes grupos: La diabetes tipo 1 (DMT-1), también llamada diabetes juvenil, representa del 5 al 10% de la prevalencia a nivel mundial. Se caracteriza por una deficiencia absoluta en la secreción de insulina, destrucción autoinmune de las células beta ( $\beta$ ) pancreáticas. Los autoanticuerpos más conocidos, presentes en el 85-90% de los individuos con hiperglucemia, están asociados al Complejo Principal de Histocompatibilidad (HLA), ligado a los genes DQA y DQB. La diabetes tipo 2 (DMT-2), también llamada diabetes mellitus no insulino-dependiente, se caracteriza por resistencia a la acción de la insulina en asociación con deficiencia relativa de la secreción de insulina. La DMT-2 tiene una prevalencia de aproximadamente 90 al 95% de los casos. No hay destrucción autoinmune de las células  $\beta$  pancreáticas pero sí está asociada a predisposición genética y obesidad [1].

La DMT-2 es una enfermedad crónica degenerativa que conlleva a complicaciones tanto agudas como crónicas. Se estima que en el año 2010 la prevalencia mundial de la DMT-2, en el grupo de edad de 20 a 79 años, fue de 6.4% afectando a 285 millones de adultos y se incrementara al 7.7%; lo cual representará 439 millones de adultos para el año 2030 [2].

La DMT-2 representó el 6% de las muertes de adultos en África, el 15,7% en América del Norte. En personas mayores de los 49 años de edad la diabetes constituye un mayor porcentaje de muertes en mujeres que en hombres en todas las regiones. Así, la diabetes es una causa importante de mortalidad prematura, una situación que es probable que empeore, sobre todo en los países de bajos y medianos ingresos a medida que aumenta la prevalencia [3]. Según la Encuesta Nacional de Salud (México, 2000) la prevalencia nacional de la

DMT-2 en adultos de 20 o más años de edad fue de 7.5%. En las mujeres fue de 7.8% y en los hombres de 7.2%. La prevalencia aumentó en relación directa con la edad, 2.3% antes de los 40 años y 21.2% después de los 60 años [4].

Los factores que desencadenan esta patología pueden ser variados, desde genéticos, hormonales hasta ambientales. Factores de riesgo ya conocidos como la elevación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), disminución de las lipoproteínas de alta densidad (HDL), hipertrigliceridemia, tabaquismo, hipertensión arterial, baja actividad física, estrés están asociados con la DMT-2. Sin embargo, recientemente se ha reconocido a la inflamación de bajo grado sostenida, como un factor desencadenante de la DMT-2 [5,6]

**IV. 2 Inflamación** es definida como una cascada de fenómenos inducida en respuesta a diferentes estímulos patológicos o daño al tejido. Los marcadores de la inflamación incluyen: leucocitosis, aumento de la sedimentación eritrocitaria, aumento de la secreción de interleucinas (IL-6, IL-1 $\beta$  TNF- $\alpha$  y MIF), activación del complemento, activación de la cascada de coagulación, aumento de las moléculas de adhesión celular, activación de la Proteína C Reactiva (CRP) [7,8]. Al respecto, TNF- $\alpha$  e IL-6 son las principales moléculas que participan en los procesos inflamatorios crónicos y recientemente, se han reconocido como moléculas con una participación importante en la fisiopatología de la resistencia a la insulina [5,9-11].

**IV. 3 El Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF).** Fue descrito en los años 60s como una proteína soluble secretada por linfocitos T activados. Ahora se sabe que se sintetiza constitutivamente en células del sistema inmune: linfocitos T, linfocitos B, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastocitos, células dendríticas, así como células no inmunes de otros órganos como pulmón, piel, tracto urinario, gastrointestinal, célula  $\beta$  pancreática, ovario y glándula pituitaria anterior. MIF está co-localizado con la hormona corticotropina (ACTH) y hormona estimulante de tiroides (TSH) y es secretado hacia el torrente sanguíneo en respuesta a varios estímulos proinflamatorios o de estrés. MIF circula normalmente en suero en un nivel basal de 2 a 4 ng/ml, tanto en roedores como en humanos [12]. El incremento de MIF actúa como un contrarregulador de los efectos

supresivos de los glucocorticoides actuando así como mediador del sistema endocrino [13]. Además, MIF está implicado en varias enfermedades inflamatorias tanto agudas como crónicas, incluyendo sepsis, glomerulonefritis, artritis, colitis y gastritis [11]. Existe evidencia de que MIF también participa en desórdenes metabólicos durante la homeostasis de la glucosa en periodos de estrés y en la infiltración de macrófagos en el tejido adiposo [14].

#### **IV. 4 Mecanismo de señalización de MIF**

MIF puede actuar a través de la vía clásica mediante un receptor o mediante una vía no clásica endocítica. Para el primer caso, se ha demostrado que MIF se une al receptor CD74 conocido como la cadena invariante del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) Clase II [15]. CD74 se expresa en varios tipos de células del sistema inmune como lo son las células presentadoras de antígeno (APCs), pero también se expresa en otros tipos de células como las epiteliales [16]. La unión de la molécula MIF al receptor CD74 activan vías de señalización celular, transcripción de genes y moléculas efectoras, como citocinas inflamatorias y quimiocinas [17,18].

El lipopolisacárido (LPS) de las bacterias Gram negativas es el principal estímulo para la secreción de MIF por los macrófagos. La formación del complejo receptor CD14 y el receptor 4 tipo Toll (TLR4) posterior a la estimulación del LPS promueve, al inhibidor del factor nuclear  $\kappa\beta$  ( $I\kappa\beta$ ) y la fosforilación de  $NF-\kappa\beta$ , la producción de citocinas (incluyendo MIF) [19].

MIF actúa como una citocina proinflamatoria promotora de la respuesta inmune innata. Después de su secreción, MIF puede activar a los miembros de la familia de proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs), ERK1/ERK2 dando como resultado la proliferación celular y la producción de prostaglandina  $E_2$  ( $PGE_2$ ), como se puede observar en la figura 1. Además, la fosforilación de ERK1/2 activa la proteína cinasa C (PKC), asociada con el incremento de la fosfolipasa  $A_2$  ( $PLA_2$ ), esta última es clave en el efecto anti-inflamatorio de los glucocorticoides. Por tanto, MIF puede anular el efecto de los esteroides sobre la respuesta inmune. Otra acción de MIF es suprimir la activación de p53,



inhibiendo el arresto celular y la apoptosis, lo que sugiere una relación interesante entre MIF, inflamación, crecimiento celular y tumorigénesis [11].

Por otro lado, MIF a través de células efectoras, facilita la detección de la endotoxina producida por bacterias (Gram negativas), permitiendo la activación de los macrófagos y la fagocitosis de los microorganismos en respuesta a la invasión de las bacterias. La rápida producción de citocinas pro-inflamatorias es absolutamente esencial en el montaje de la respuesta inmune innata [20,21]. Al respecto, fue reportado en ratones MIF “knockout” (KO) infectados con *Salmonella typhimurium* la reducción significativa de los niveles de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-2 e interferón  $\gamma$ . (IFN- $\gamma$ ), en plasma, comparados con los ratones silvestres. MIF, directa o indirectamente promueve la producción o expresión de un gran panel de moléculas pro-inflamatorias incluyendo citocinas (tal como TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8), ON, enzima ciclooxigenasa 2 (COX-2), y productos derivados de la vía del ácido araquidónico, (PGE<sub>2</sub>) [14]. Como se observa en la figura 1.

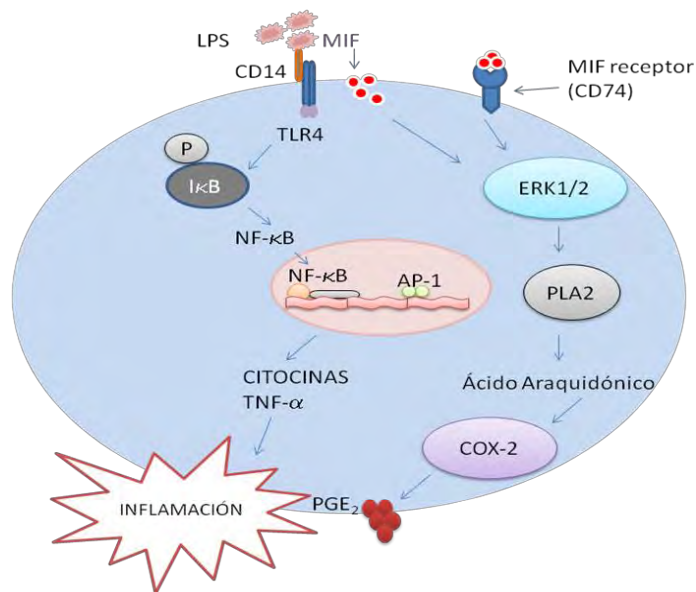


Fig. 1. Mecanismo de señalización de MIF. Como se observa MIF puede actuar a través de la vía clásica por el receptor CD74 o por la vía endocítica. MIF activa al factor de transcripción NF $\kappa$ B para la producción de citocinas pro-inflamatorias. MIF también activa a proteínas cinasas ERK1/2 incrementando la activación de la Fosfolipasa A<sub>2</sub> y la subsecuente liberación de ácido araquidónico, la activación de COX-2 y la prostaglandina E<sub>2</sub> iniciando al proceso de inflamación (Esquema modificado de Calandra, 2003).

#### IV. 5 MIF en la patología diabética.

En líneas celulares INS-1 derivadas de insulinomas [22], se encontró gránulos los cuales contenían solo insulina, otros contenían tanto insulina como MIF, no se encontraron gránulos solo con MIF, ambas hormonas están colocalizadas por lo que se cree que MIF puede estar regulada de la misma manera que la insulina. En cultivo de islotes de pancreáticos de ratas Sprague-Dawley por 24 horas, la expresión del RNAm de MIF esta incrementada 3 veces más que el control después de la estimulación con 20mM de glucosa.. Las células INS-1 se les adiciono anticuerpos anti-MIF ó se le inhibió el transcrito de MIF al ser estimuladas con glucosa a 2.8mM y 16.7mM se observo inhibición de la secreción de insulina. Contrariamente cuando se agrega MIF recombinante la secreción de insulina inducida por glucosa es significativamente secretada. Por lo que se cree que la disminución de la secreción y/o acción de MIF puede contribuir a una disfunción progresiva de la célula  $\beta$  pancreática y a la disminución de insulina asociada a DMT-2 [13]. Así, una vez secretado MIF tiene una acción autocrina positiva sobre la secreción de insulina, lo cual lleva a disminuir la glucemia y de MIF [11].

Por otro lado, en células musculares L6 derivadas de mioblastos de rata, se observó que MIF incrementa la expresión del RNAm del sustrato fructosa 2,6-bifosfato (F2,6BP), un regulador positivo alostérico de la glucólisis, posiblemente incrementa la enzima fructosa 2.6-bifosfatasa (PFK-2). Como se observa en la figura 2.

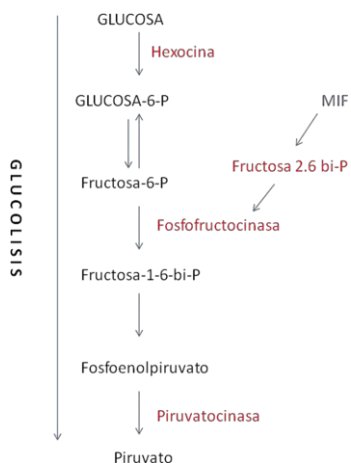


Fig. 2. Participación de MIF en la glucólisis. MIF induce la activación de forma alostérica del sustrato Fructuosa 2,6 bifosfato, y éste estimula la activación de la fosfofructocinasa 1. (Esquema modificado de Robert C. Bohisnski. Bioquímica.)

En células musculares L6 estimuladas con TNF- $\alpha$  (100 ng/ml) por 72 horas, las concentraciones de F2,6BP se vieron incrementadas. Sin embargo, cuando a estas células se les adiciona un anticuerpo monoclonal anti-MIF (MIF-mAb) el efecto se inhibe hasta un 70%. Estos datos apoyan que la acción autocrina de MIF interviene en el efecto de TNF- $\alpha$  sobre los niveles de F2,6BP. Bajo condiciones de infección severa, las concentraciones de citocinas inflamatorias se ven incrementadas, como el TNF- $\alpha$  que tiene efectos sobre la respuesta inmune, pero también tiene efectos sobre el catabolismo. TNF- $\alpha$  causa hipoglucemia en respuesta a una mayor demanda de las necesidades energéticas del huésped ante la infección. Sin embargo, los ratones tratados con anti-MIF tuvieron una disminución del sustrato de F2,6BP por lo que se demostró que MIF participa en el metabolismo de la glucosa [23].

MIF tiene efectos autocrino/paracrino sobre los adipocitos, ya que media los efectos de TNF- $\alpha$  sobre el catabolismo de la glucosa, específicamente en situaciones de estrés. Bajo la administración intraperitoneal de una sola dosis letal de LPS (16.6 $\mu$ g/g) en ratones MIF-/- y silvestres se midió glicemia en plasma, observando que los ratones MIF-/- mantienen sus niveles de glucosa normales a diferencia de los ratones silvestres donde se observó hipoglucemia después de 2.5 a 3 hrs. Estos resultados sostienen el importante papel de MIF en la regulación del metabolismo de glucosa ocurrido durante la endotoxemia [24].

La acción inhibitoria de MIF sobre la captación de 2-deoxiglucosa fue demostrada en cultivos primarios de adipocitos de ratones, donde los adipocitos de los ratones MIF-/- incrementaron la captación de 2-deoxiglucosa, a pesar del tratamiento con TNF- $\alpha$ . El mecanismo del efecto inhibitorio de MIF podría ser porque actúa como un mediador de la producción de TNF- $\alpha$  y éste actúa como inhibidor en la transducción de la señal de insulina, causando resistencia a la insulina [24].

En ratones con fondo genético C57BL/6 deficientes en el gen que codifica para MIF (MIF-/-) y deficientes en el gen del receptor de lipoproteína de baja densidad (Ldlr-/-) (propensos a lesiones por aterosclerosis), Los ratones MIF-/-Ldlr-/- incrementaron los niveles de insulina en plasma que los ratones Ldlr-/. Las glucemias se incrementaron en los ratones

Ldlr<sup>-/-</sup> mientras que en los ratones MIF<sup>-/-</sup>Ldlr<sup>-/-</sup> fueron menores. Los marcadores de inflamación como amiloide A en suero, en los ratones Ldlr<sup>-/-</sup> fueron 109 µg/ml en comparación con los ratones MIF<sup>-/-</sup>Ldlr<sup>-/-</sup> que tuvieron 10µg/ml. Así, también la concentración de fibrinógeno en Ldlr<sup>-/-</sup> fue de 70 µg/ml mientras que en los ratones MIF<sup>-/-</sup> fue de 7 µg/ml. Los marcadores de inflamación disminuyeron en los ratones MIF<sup>-/-</sup>. Por lo que se cree que la deficiencia de MIF disminuye la inflamación crónica y reduce la magnitud de la respuesta a la inflamación [14]. La actividad de la fosfatidilinositolcinas (P13k) y la fosforilación de Akt fue mayor en MIF<sup>-/-</sup>Ldlr<sup>-/-</sup> comparado con Ldlr<sup>-/-</sup> en tejido adiposo. Así, estos datos sugieren que MIF puede promover el desarrollo de resistencia a la insulina. MIF ha sido asociado con el proceso inflamatorio, por lo que se midieron los niveles circulantes de la molécula de adhesión vascular (VCAM)-1 y molécula de adhesión intracelular (ICAM)-1 los cuales fueron significativamente menores en ratones MIF<sup>-/-</sup>Ldlr<sup>-/-</sup>, lo que sugiere que MIF promueve el reclutamiento de células del sistema inmune en tejido adiposo, a través de la expresión de moléculas de adhesión vascular [25].

La microfotografía longitudinal de aorta mostró menor nivel de aterosclerosis en el área de la válvula aórtica en ratones MIF<sup>-/-</sup>Ldlr<sup>-/-</sup>. El análisis del contenido de la lesión mostró que hay 5.1 veces menos monocitos/macrófagos en MIF<sup>-/-</sup>Ldlr<sup>-/-</sup>. Estos datos apoyan la conclusión que la deficiencia de MIF impide la acumulación de monocitos/macrófagos en la pared vascular, característica fundamental para el desarrollo de aterosclerosis [26].

#### **IV 6 Estudios en pacientes diabéticos y los niveles de MIF.**

Herder y cols. en un estudio transversal en donde participaron 236 pacientes con el diagnóstico de DMT-2 y 242 sujetos con Intolerancia a la glucosa (IGT) presentaron niveles elevados de MIF en suero así como, IL-6 y proteína C reactiva (CRP) comparados con los controles. La concentración elevada de MIF contribuye a la hiperinsulinemia, al estado proinflamatorio de resistencia a la insulina, porque la secreción de insulina estimulada por glucosa está acompañada de la secreción de MIF por la célula β pancreática [27].

Con el objetivo de estudiar si los niveles de MIF se estudiaron 617 pacientes de la Hospital de la Universidad de Yamanashi con los siguientes resultados. Los niveles de MIF fueron

altos en pacientes con IGT/DMT-2 y con enfermedad coronaria 28.6ng/ml, en comparación con los pacientes sin IGT/DMT-2 y sin enfermedad coronaria 22.6ng/ml. MIF puede usarse como biomarcador en pacientes con IGT/DMT-2 con riesgo de presentar enfermedad coronaria en un futuro [28].

Yabunaka y colaboradores en un estudio con 79 pacientes con el diagnóstico de DMT-2 de los cuales 30 consumían hipoglucemiantes orales, 32 se inyectan insulina y 17 solo tienen terapia dietética. Los 79 pacientes con el diagnóstico de DMT-2 tuvieron niveles de MIF elevado en suero  $20.7 \pm 13.3$  ng/ml a diferencia de los pacientes no diabéticos  $5.2 \pm 3.0$  ng/ml [29].

MIF unido a su receptor CD74 activa la vía de señalización tales como, NF $\kappa$ B, el cual activa la síntesis de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ . Más aún, la expresión de MIF está incrementada en nefropatía diabética y esta incrementado el RNAm del receptor CD74 en modelo experimental, y en indios Pima con DMT-2 y nefropatía diabética [30].

Zamora y colaboradores en 73 pacientes los cuales fueron 23 mujeres y 46 hombres con el diagnóstico de DMT-2 de entre 35-65 años de edad encontraron niveles elevados de MIF, TNF- $\alpha$  y resistina en comparación con los controles de la misma edad [31].

## **V JUSTIFICACIÓN**

En México la mortalidad en el grupo de edad de 45 a 65 años por DMT-2 ocupa el primer lugar (INEGI), su prevalencia se está incrementando cada año. Diferentes moléculas se han asociado con la resistencia a insulina como resistina, leptina, TNF- $\alpha$  e incremento de ácidos grasos libres. MIF se ha encontrado elevado en pacientes obesos y con IGT/DMT-2. Sin embargo, no se ha identificado cual es su papel en los islotes pancreáticos. Existen investigaciones en donde se demuestra que MIF regula positivamente la secreción de insulina, pero también existen investigaciones en donde MIF promueve su resistencia. El interés de esta investigación es estudiar la posibilidad de que la ausencia de MIF participe en atenuar o prevenir la DMT-2.

## **VI HIPÓTESIS:**

Dado que MIF induce la expresión de citocinas pro-inflamatorias y se sobreexpresa en la DMT-2, se plantea en esta investigación que:

En un modelo de Diabetes Mellitus Tipo 2 en ratones de fondo genético BALB/c modificados en el gen que codifica para MIF<sup>-/-</sup>, la ausencia de MIF regula negativamente la expresión de citocinas inflamatorias y en consecuencia disminuye la glucemia en la DMT-2.

**VII OBJETIVO GENERAL:** Caracterizar la participación de MIF en la fisiopatogenia de la DMT-2 a nivel de los islotes pancreáticos en un modelo murino.

**VII. 1 OBJETIVOS PARTICULARES:**

- 1.- Desarrollar DMT-2 en ratones silvestres (MIF+/+) y ratones deficientes para el gen que codifica para MIF-/- con fondo genético BALB/c con una dosis única de STZ..
- 2.- Registrar las manifestaciones clínicas de la DMT-2 en ratones MIF+/+ STZ y en ratones MIF-/- STZ.
- 3.- Elaborar el diagnóstico clínico en la DMT-2 a través de la curva de tolerancia a la glucosa y glucemias en ratones los grupos controles (MIF+/+ y MIF-/-) y en los grupos experimentales (MIF+/+ STZ y MIF-/- STZ).
- 4.- Observar las característica morfológicas de los islotes pancreáticos en los grupos controles (MIF+/+ y MIF-/-) y en los grupos experimentales (MIF+/+ STZ y MIF-/- STZ).
- 5.- Cuantificar el número de islotes pancreáticos de los grupos controles (MIF+/+ y MIF-/-) y en los grupos experimentales (MIF+/+ STZ y MIF-/- STZ).
- 6.- Determinar la expresión del RNAm de insulina en los islotes pancreáticos de los grupos controles (MIF+/+ y MIF-/-) y en los grupos experimentales (MIF+/+ STZ y MIF-/- STZ) a través de la técnica de RT-PCR.
- 7.- Cuantificar la producción de citocinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) en suero en los ratones MIF+/+ STZ y MIF-/- STZ a través de la técnica de ELISA.
- 8.- Cuantificar la producción de citocinas anti-inflamatorias (IL-10 e IL-4) en suero en los ratones MIF+/+ STZ y MIF-/- STZ a través de la técnica de ELISA.



## **VIII METODOLOGIA EXPERIMENTAL**

### **VIII. 1 Determinación del genotipo por PCR**

Para generar y evaluar el desarrollo de la DMT-2 se usaron ratones macho de 7 semanas de edad con fondo genético BALB/c, modificados en el gen que codifica para MIF (MIF<sup>-/-</sup>) y como controles se usaron ratones silvestres del mismo fondo genético y edad (MIF<sup>+/+</sup>). Los ratones MIF<sup>-/-</sup> fueron donados por el Dr. Jonh R. David de la Escuela de Salud Pública de Harvard y han sido mantenidos en el bioterio de la FES-Iztacala por varias generaciones. Se verificó el genotipo para determinar la pureza de la colonia, de la siguiente manera:

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

Posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm durante 10 min, se recuperó el sobrenadante con micropipeta y se colocó en tubos Eppendorf con 500 µl de isopropanol frío, invirtiéndolos de manera suave hasta hacer evidente la precipitación del DNA. Se centrifugó nuevamente a 14,000 rpm durante 2 minutos para precipitar el DNA, se decantó el sobrenadante para proceder a lavar la pastilla de DNA con etanol frío al 75% en el mismo tubo se resuspendió la pastilla y fue centrifugado nuevamente a 14,000 rpm durante 2 minutos min, el sobrenadante se desecho, dejando evaporar el etanol del tubo a temperatura ambiente por 2 horas. Posteriormente la pastilla se suspendió en 200 µl de H<sub>2</sub>O mili Q (todos los reactivos son marca SIGMA).

#### **VIII. 1.2 Amplificación del gen**

Se utilizaron los desoxioligonucleótidos específicos para el reconocimiento del gen MIF. MIF-F AGA CCA CGT GCT TAG CTG AG y MIF-R GCA TCG CTA CCG GTG GAT AA. En tubos nuevos libres de DNAasas-RNAasas de 0.2 ml, se llevó a cabo la reacción con un volumen final de 25 µl colocando los siguientes reactivos (Kit Red-Taq DNA polimerase AMPLIQON) en el siguiente orden:

	Para MIF	Para NEOMICINA
Buffer 10x	2.5µl	2.5µl
dNTP's 12.5mM	0.4µl	0.4µl
A	5.6µl	3.8µl
B	4.1µl	3µl
Red-Taq	0.3µl	0.3µl
H <sub>2</sub> O	10.1µl	13µl
Muestra de DNA	2µl	2µl
Volumen Total	25µl	25µl

Una vez listos los tubos con sus respectivos reactivos se colocaron en el termociclador (BIOERXP CYCLER) con la temperatura de alineación 56°.

### **VIII. 1. 3 Electroforesis**

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

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

### **VIII. 2 Desarrollo de Diabetes Mellitus tipo 2.**

Se usaron ratones macho de 7 semanas de edad con fondo genético BALB/c, modificados en el gen que codifica para MIF (MIF<sup>-/-</sup>) y como controles se usaron ratones silvestres del mismo fondo genético MIF (MIF<sup>+/+</sup>). La diabetes fue inducida en ayuno de 6 horas con una dosis única de 130 mg/Kg STZ vía intraperitoneal (ip) disuelta en buffer de citratos (0.05M) con pH de 4.5 recién preparado. Al grupo control se le administró el equivalente en volumen de buffer de citratos (0.05M a pH4.5) sin STZ.

### VIII. 3 Evaluación clínica.

Antes de administrar la dosis de STZ se hizo una evaluación clínica para tener el control de peso, ingesta de agua y el volumen de orina producida en 24 horas. Esto se hizo a través de cajas metabólicas que se muestran en la Fig.4.



Fig. 3. Cajas metabólicas para la recolección de orina, cuantificación de alimento y agua.

### VIII. 4 Parámetros en orina

Se determinaron los principales parámetros de diagnóstico clínico en orina a la 6ª semana de inducción de diabetes con STZ, utilizando tiras reactivas (SPINREACT) Fig. 4 A. Se colocó la tira reactiva por 30 segundos como se observa en la Fig. 4 B para determinar los siguientes parámetros: leucocitos, nitritos, urobilinogeno, proteínas, pH, sangre, densidad, cetona, bilirrubina y glucosa.

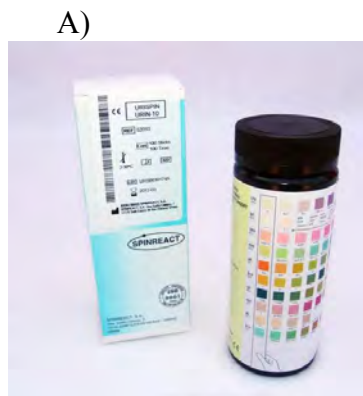


Fig. 4.A) Tiras reactiva de SPINREACT. Fig. 4 B) Modo de uso

### **VIII. 5 Curva de tolerancia a la glucosa**

La curva de tolerancia a la glucosa se determinó a la 6<sup>a</sup> semana después de la inducción de la diabetes. Los ratones estuvieron 6 horas en ayuno y se les administró glucosa vía oral (1.5 g/kg) y se cuantificó las glucemias a los tiempos 0 min (estado basal) 30, 90 y 120 minutos expresando los resultados en mg/dl. Se realizó una incisión en la cola del ratón para obtener una gota de sangre y ponerla en la tira reactiva y sensor ACCU-CHEK. Después de cada media hora no fue necesaria hacer más cortes pues la gotita de sangre se obtuvo de la misma herida.

### **VIII. 6 Concentración de glucosa en sangre**

Cada semana, posterior a la administración de STZ, se midió la glucemia expresando los resultados en mg/dl. Los ratones se mantuvieron a un ayuno de 6 horas. Se hizo una pequeña incisión a la cola y la gota de sangre se colocó en la tira reactiva ACCU-CHEK para medir la glucemia.

### **VIII. 7 Histología de páncreas.**

Se extrajo el páncreas de los ratones MIF<sup>+/+</sup> y MIF<sup>-/-</sup> controles así como MIF<sup>+/+</sup> STZ y MIF<sup>-/-</sup> STZ después de 8 semanas. Se fijaron con paraformaldehído al 4% por 5 días, posteriormente los páncreas fueron incluidos en bloques de parafina. Se realizaron cortes de 5 µm en el micrótopo y se tiñeron con hematoxilina y eosina, y se montaron en Bálsamo de Canadá. Las laminillas fueron observadas al microscopio óptico en 20x, 40x y 100x con aceite de inmersión. Los islotes de Langerhans se contaron 10 laminillas por grupo experimental. El número total de los islotes de Langerhans observados en los ratones MIF<sup>+/+</sup> (control) fueron considerados como el 100%.

### **VIII. 8 Obtención de islotes pancreáticos**

Después de 8 semanas post-inducción se extrajo el páncreas de los ratones MIF<sup>+/+</sup> y MIF<sup>-/-</sup> cada uno fue procesado de manera independiente. Se procedió a la digestión con colagenasa (WORTHINGTON), 1 mg por cada páncreas, la muestra se colocó en baño María a 37°C con agitación rápida por 10 minutos para la digestión, el punto final de la digestión se determinó de manera visual, cuando no se observaron grumos grandes y la

solución tenía un color café y textura cremosa. Se lavaron las células con solución de Hanks (SIGMA) frío y se pasaron por un colador, se centrifugaron a 1500 rpm durante 3 min, se resuspendió la pastilla con la solución de Hanks frío y se volvieron a centrifugar 1500 rpm por 5 min. Se procedió a formar un gradiente de Ficoll (SIGMA) a concentraciones de 27%, 23%, 20% y 11%, se centrifugó a 2000 rpm durante 15 min sin freno y sin aceleración y se recolectaron los islotes a contra luz entre la interfase de 11% y 20% como se observa en la Fig. 5. Se lavaron en dos ocasiones con solución de Hanks. Los islotes recolectados se colocaron en una caja de Petri y se contaron bajo el microscopio estereoscópico..

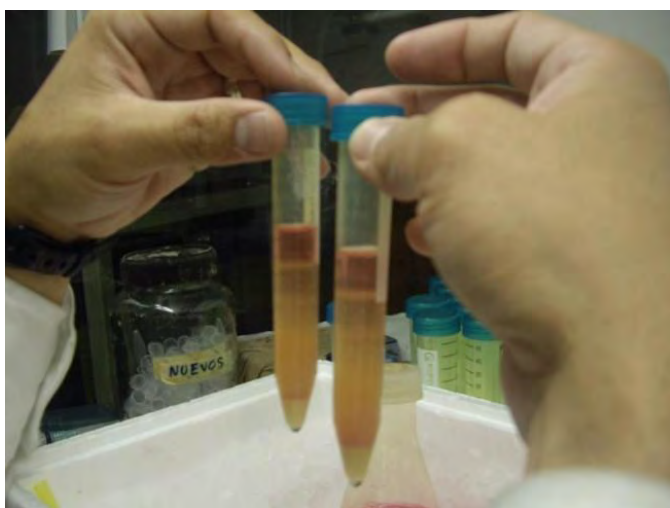


Fig. 5. Gradiente de Ficoll a 27%, 23%, 20% y 11%

### **VIII. 9 Ensayo de RT-PCR tiempo real para el RNAm de insulina**

Después de 8 semanas post-inducción se extrajo el páncreas de los ratones MIF+/+ y MIF-/- cada uno fue procesado de manera independiente. Se colocaron los islotes de cada pozo de la placa de cultivo en un tubo de ependorff con 0.8ml de Trizol (INVITROGEN) para aislar el RNAm, con precipitación en isopropanol. La cantidad de RNAm se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm. La expresión relativa de insulina se evaluó con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando el RNA ribosomal 18 S como referencia endógena. Para amplificar el gen de insulina se utilizó Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG catalogo número 11733-038 (INVITROGEN) en el siguiente orden:

Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG	7.5 µl
Primer Forward	0.75 µl
Primer Reverse	0.75 µl
Agua	4.5 µl
cDNA (a una concentración de 20 ng)	1.5 µl
Total	15 µl

Se amplificó el RNAm de insulina en el termociclador CORBETT RESEARCH con las siguientes condiciones.

95°.C 30 seg.

60°.C 30 seg.

72°.C 30 seg.

Por 20 ciclos

La fluorescencia se midió al final de cada ciclo. Cada muestra se analizó por duplicado para después calcular la media de los Ct obtenidos y hacer el cálculo de la expresión génica normalizada con el control de expresión de un gen constitutivo (RNA ribosomal 18 S ) y relativizada a la muestra.

El valor  $\Delta\Delta Ct$  muestra la diferencia entre el  $\Delta Ct$  de la muestra de los islotes pancreáticos de los ratones MIF+/+ STZ y MIF-/- STZ y el  $\Delta Ct$  del calibrador (islotes pancreáticos de los ratones MIF+/+ Control)

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct (\text{MIF+/+ STZ}) - (\Delta Ct \text{ MIF+/+ Control})$$

El promedio  $\Delta Ct$  de las muestras se calcula normalizándolo frente al control del gen constitutivo. Igualmente el  $\Delta Ct$  del calibrador se calcula restándole el Ct del gen de interés (MIF+/+ Control) y el Ct control gen constitutivo.

$$\Delta Ct (\text{muestra}) = Ct \text{ gen interés (muestra)} - Ct \text{ control gen constitutivo}$$

Al tratarse de una cuantificación relativa de la expresión génica es importante considerar que una expresión génica de 1 supone que dicha expresión no cambia respecto a la situación tomada como calibradora (MIF+/+ Control). Si la expresión es mayor o menor a 1, implica que hay mayor o menor expresión.

Si los resultados de expresión génica después de aplicar la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Son menores a 1, la expresión génica real se calcula haciendo la potencia de ese mismo número. Al analizar estos resultados hay que considerar que los cambios de expresión génica aquí reflejados son relativos, lo que quiere decir que no reflejan la cantidad absoluta de RNAm.

### **VIII. 10 Medición de citocinas en suero por ELISA**

Semanalmente, posterior a la inducción con STZ se tomaron muestras de sangre después de 6 horas de ayuno, se centrifugó a 2500 rpm para obtener el suero, éste se mantuvo a -20°C hasta su uso para determinar las citocinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) y citocinas anti-inflamatorias (IL-10 e IL-4). Para éstas citocinas se utilizaron kits de PREPROTECH MÉXICO. Brevemente, se sensibilizó la placa con el anticuerpo de captura a una concentración de 2  $\mu$ l/ml de solución de pegado. Se agregó 50  $\mu$ l de ésta solución en cada pozo de la placa para ELISA. Después se dejó incubar la placa toda la noche a 4°C y al día siguiente se lavó con PBS-Tween. Se bloqueó la placa con 200  $\mu$ l de buffer de bloqueo por pozo, dejando incubar a temperatura ambiente por 1 hora. Nuevamente se lavó la placa y se agregó 100  $\mu$ l por pozo de los estándares y 50 $\mu$ l de las muestras en la placa. Se cubrió la placa y se dejó incubar a 4°C toda la noche. Posteriormente se lavó la placa con PBS-Tween y se añadió el anticuerpo biotinilado (dilución de 1  $\mu$ l de anticuerpo por 1 ml de buffer de bloqueo). Se cubrió la placa y se dejó incubar 1 hora a temperatura ambiente, se lavó la placa y se agregó la estreptavidina (dilución 1:4000) añadiendo 100  $\mu$ l por pozo. Se cubrió la placa y se dejó incubar 30 min a temperatura ambiente. Se lavó por última vez y se añadieron 100  $\mu$ l del sustrato de ABTS. Se incubó de 30 min y finalmente se leyó la placa en el lector de ELISA THERMO LABSYSTEMS, MULTISKAN ASCENT a 405nm.

## IX. RESULTADOS

### IX. 1 Genotipo de los ratones, grupos experimentales

Todos los ratones BALB/c del experimento tuvieron el genotipo establecido, éste fue determinado por PCR como se presenta en la Fig. 6. Gel de agarosa con los genes MIF y NEOMICINA amplificados. Los ratones experimentales (columnas 1-6) en los cuales se observa una banda amplificada a los 500 pb que corresponden al gen de resistencia a neomicina y en los ratones MIF+/+ (columnas 7-9) muestran la expresión del gen que codifica para MIF con un peso molecular de 200 pb.

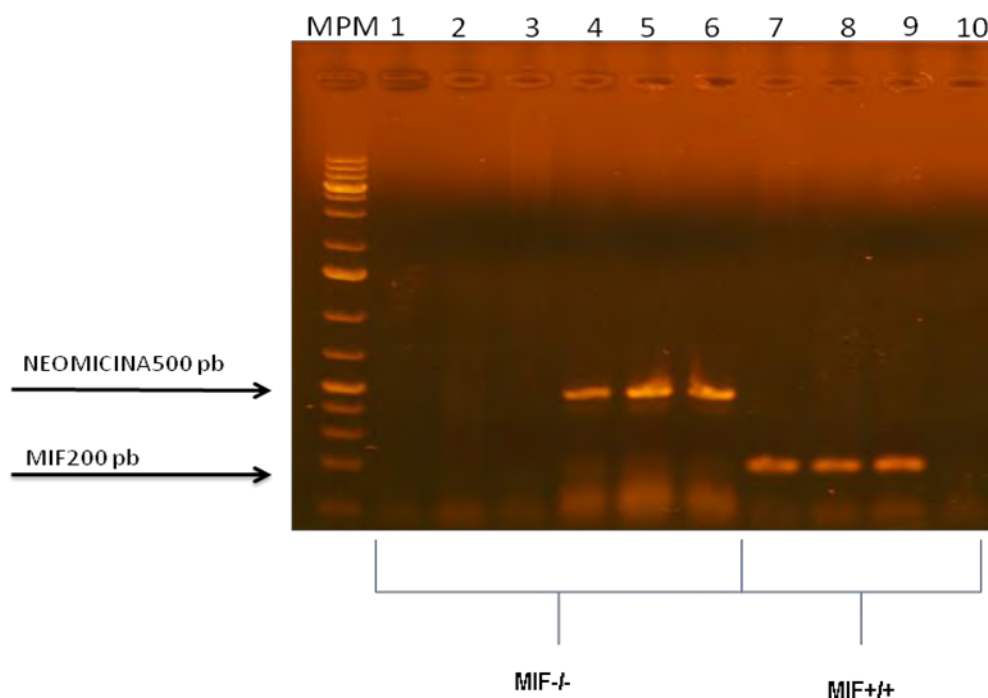


Fig. 6. **Electroforesis.** Gel de agarosa al 1% en TBE el cual muestra la amplificación a través de PCR de los genes MIF a 200 pb y NEOMICINA a 500 pb en ratones de fondo genético BALB/c.



## IX. 2 Polidipsia

La baja secreción de insulina y/o la baja sensibilidad a la insulina en el tejido muscular conlleva a hiperglucemia y esto a hiper-osmolaridad sanguínea, por lo que la glucosa en riñón sobrepasa el umbral renal dando como consecuencia la glucosuria, además junto con la salida de glucosa sale agua, llevando a poliuria y en consecuencia a una deshidratación celular, por lo que se estimulan los receptores del hipotálamo anterior para saciar la sed y se presenta polidipsia. Por otra parte, al no entrar glucosa a la célula se estimulan los receptores de los núcleos laterales de hipotálamo por lo que hay polifagia [32]. En esta investigación valoramos los signos patognomónicos de la DMT-2 (polidipsia, polifagia, poliuria, glucosuria y pérdida de peso) en los ratones MIF+/+ STZ y MIF-/- STZ a la 6 semana post-inducción. En la Fig. 7 se puede observar que el consumo de agua en promedio de los ratones MIF+/+ controles fue de  $3.1 \pm 0.40$  ml, MIF-/- controles  $1.7 \pm 0.22$  ml; mientras que para los ratones MIF+/+ STZ consumieron  $10.73 \pm 1.97$  ml de agua, (tres veces más) los ratones MIF-/- STZ  $5.1 \pm 0.97$  ml su consumo de agua fue de manera moderada. Esto demuestra que los ratones MIF-/- STZ tuvieron menor polidipsia que los ratones MIF+/+ STZ.

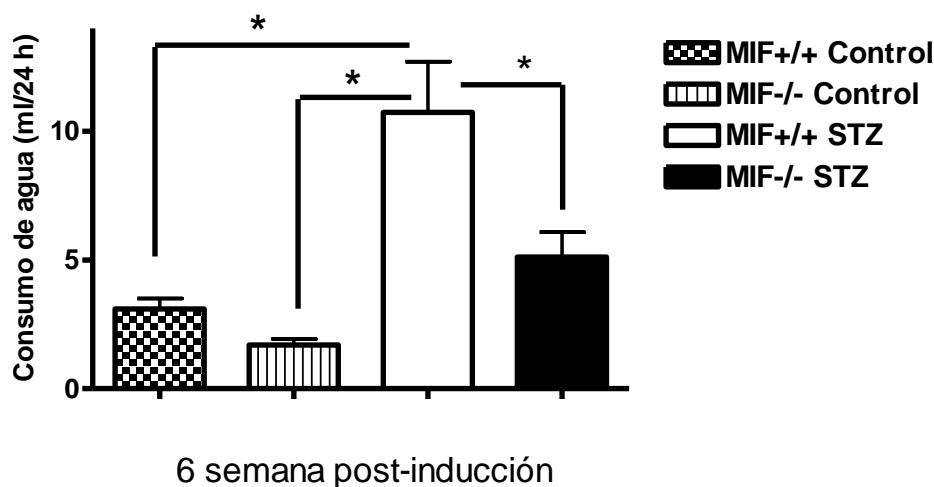


Fig. 7. **Polidipsia** de los ratones MIF+/+ STZ y MIF-/- STZ. Barras representativas del promedio de la cantidad de agua ingerida en 24 horas en la semana 6 post-inducción con STZ. Se expresan los datos de 3 experimentos independientes con 5 ratones por grupo. \*  $p < 0.05$  *t* de Student,  $n = 15$ .

### IX. 3 Polifagia

En relación con el consumo de alimento en 24 horas. Se encontró que los ratones MIF<sup>+/+</sup> control consumieron  $1.82 \pm 0.35$  g, MIF<sup>-/-</sup> controles  $2.15 \pm 0.08$  g, mientras que los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ  $4.93 \pm 0.76$  g, los ratones MIF<sup>-/-</sup> STZ su consumo fue de  $3.58 \pm 1.10$  g, como se observa en la Fig. 8. La diferencia fue estadísticamente significativa en los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ en comparación con los ratones MIF<sup>+/+</sup> y MIF<sup>-/-</sup> controles. No encontramos diferencia significativa entre los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ vs los ratones MIF<sup>-/-</sup> STZ.

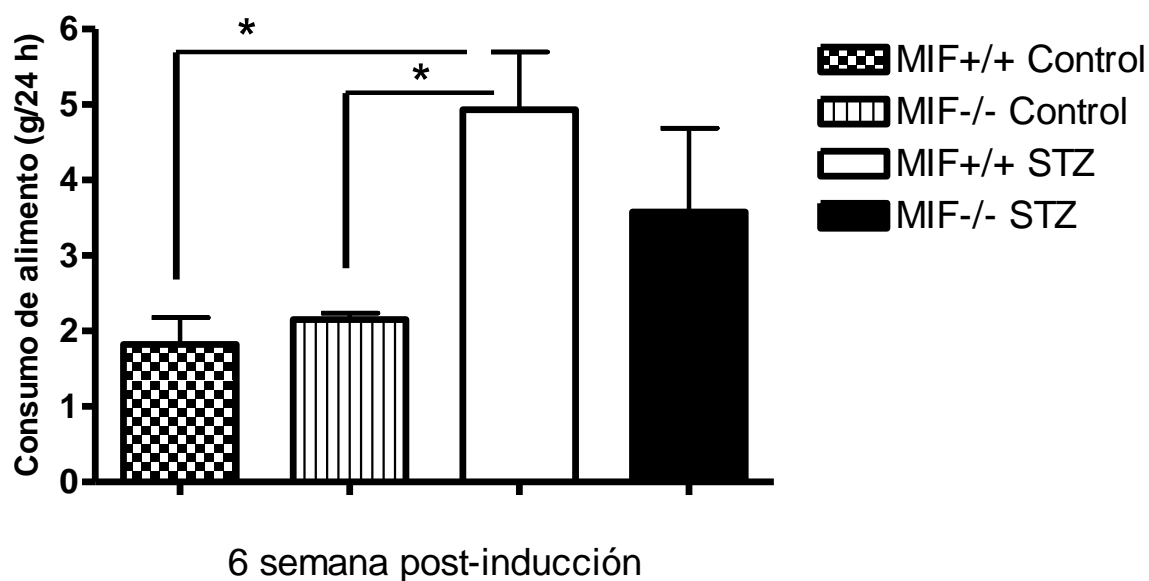


Fig.8. **Polifagia** de los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ y MIF<sup>-/-</sup> STZ. Barras representativas la cantidad de alimento ingerido en 24 horas. Se expresan los datos de 3 experimentos independientes con 5 ratones por grupo. \*  $p < 0.05$  *t* de Student,  $n = 15$ .

#### IX. 4 Poliuria

La cantidad de orina excretada en 24 h por ratón en el grupo MIF+/+ control el volumen urinario fue de  $0.65 \pm 0.08$  ml, MIF-/- controles fue de  $0.66 \pm 0.06$  ml mientras que en el grupo de ratones MIF+/+STZ el promedio fue  $7.96 \pm 1.47$  ml, a diferencia de los ratones MIF-/- STZ con  $1.3 \pm 0.17$  ml como se puede observar en la Fig 9. Los ratones MIF-/- STZ el volumen urinario es 7 veces menos que los ratones MIF+/+STZ. La diferencia fue estadísticamente significativa en los grupos MIF+/+, MIF-/- y MIF-/-STZ vs el grupo MIF+/+STZ. Esto demostró que los ratones MIF-/-STZ tuvieron menor cantidad de volumen urinario que los ratones MIF+/+STZ.

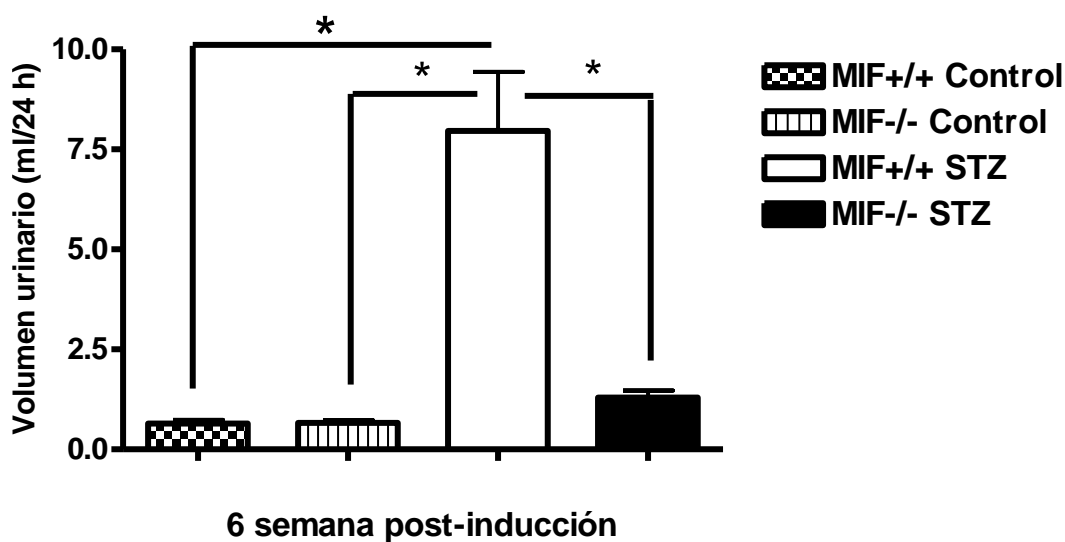


Fig. 9. **Poliuria** de los ratones MIF+/+ STZ y MIF-/- STZ. Barras representativas del promedio de la cantidad de orina excretada por ratón en 24 horas. Se expresan los datos de 3 experimentos independientes con 5 ratones por grupo. \*  $p < 0.05$  *t* de Student,  $n = 15$

## IX. 5 Examen General de Orina

Los leucocitos, nitritos, urobilinogeno, proteínas, pH, eritrocitos, densidad, cetonas, bilirrubinas y glucosa fueron determinados en orina de 24 horas, en ratones MIF+/+ y MIF-/- inducidos con STZ en la semana 6, así como sus controles respectivos. Como se esperaba, los ratones controles estuvieron dentro de la normalidad, no hubo presencia anormal de éstas moléculas y la densidad y pH fueron normales (datos no mostrados). En ratones MIF+/+ STZ y MIF-/- STZ, el único parámetro alterado fue la glucosuria. En la Fig. 10 se puede observar que los ratones MIF-/-STZ tuvieron glucosuria de +++ a diferencia de los ratones MIF+/+ STZ con glucosuria de +++++. Los parámetros como proteínas, eritrocitos fueron negativos por lo que, al parecer, a la 6 semana post-inducción no hubo daño renal a pesar de que el umbral renal está incrementado para la glucosa. La glucosuria fue menor en los ratones MIF-/- STZ.

Parámetros	MIF+/+ STZ	MIF-/- STZ
Leucocitos	negativo	negativo
Nitritos	negativo	negativo
Urobilinogeno	normal	normal
Proteínas	negativo	negativo
pH	6	6
Eritrocitos	negativo	Negativo
Densidad	1.030	1.020
Cetona	negativo	negativo
glucosa	+++++	+++

Fig. 10. **Examen General de Orina.** Parámetros medidos en la orina producida 24 horas de los ratones MIF+/+ STZ y MIF-/- STZ en la semana 6 post-inducción utilizando tira reactiva (SPINREACT). Se expresan los datos de 3 experimentos independientes con 5 ratones por grupo.

## IX. 6 Glucosuria

Posteriormente procedimos a la cuantificación de glucosa en orina a través del glucómetro en los grupos experimentales MIF+/+ STZ y MIF-/- STZ. Como se observa en la Fig.11 La glucosuria en los ratones MIF-/- STZ fue de  $281 \pm 24$  mg/dl, y en ratones MIF+/+ STZ la glucosuria fue de  $432 \pm 63$  mg/dl, casi 2 veces más alta, la diferencia fue estadísticamente significativa. Lo que demostró que los ratones MIF-/- STZ tuvieron menor glucosuria que los ratones MIF+/+ STZ.

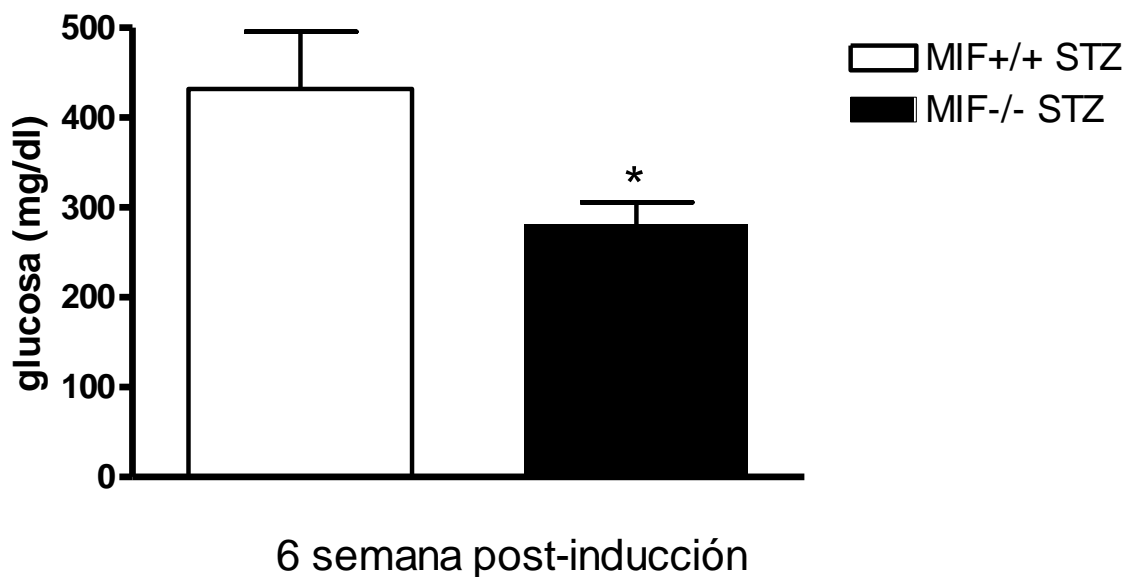


Fig. 11. **Glucosuria** de los ratones MIF+/+ STZ y MIF-/- STZ. Barras representativas del promedio la cantidad de glucosa en orina de 24 horas en la semana 6 post-inducción con STZ. Se expresan los datos de 3 experimentos independientes con 5 ratones por grupo. \*  $p < 0.05$  *t* de Student,  $n=15$

## IX 7 Talla

La pérdida de peso en pacientes con DMT-2, así como la baja talla en ratones se ha explicado como consecuencia de la acción inhibitoria de insulina sobre la lipólisis y proteólisis [33]. La talla en los ratones MIF+/+ Control adulto en promedio a las 15 semanas tuvieron una talla de  $22.9 \pm 0.64$  y la talla de los ratones MIF-/- Control fue de  $18.88 \pm 1.11$ . Los ratones MIF+/+ STZ y MIF-/- STZ a las 7 semanas de edad tiempo en el cual fue administrada la dosis de STZ su talla fue de  $15.85 \pm 0.29$  y  $14.97 \pm 1.46$  respectivamente. Al final del experimento a las 8 semanas post-inducción la talla fue en los ratones MIF+/+ STZ  $15.53 \pm 0.975$  y en MIF-/- STZ fue de  $17.94.7 \pm 0.25$  como se puede ver en la Fig. 12. Los ratones MIF+/+ STZ dejaron de crecer, a diferencia de los ratones MIF-/-STZ que su crecimiento continuo.

Ratones de fondo genético BALB/c con STZ a las 8 semana post-inducción

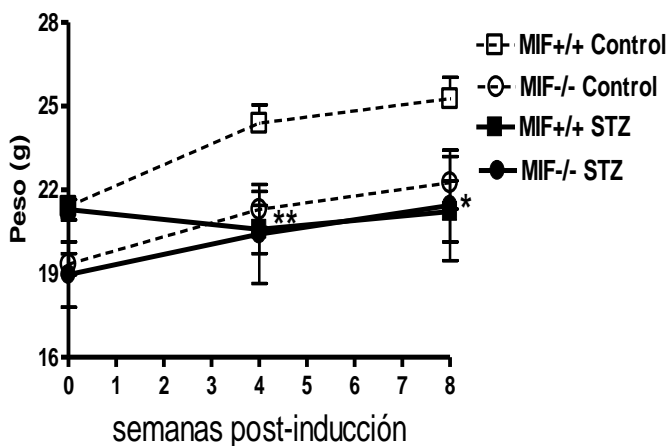


Fig. 12. **Talla** en ratones MIF+/+ STZ y MIF-/- STZ a la 8ª Semana post-inducción, los ratones dejaron de crecer a diferencia de los ratones MIF-/-STZ que alcanzaron la talla de un ratón adulto.

## IX. 8 Peso

El peso inicial en los ratones adultos MIF<sup>+/+</sup> control fue de  $21.20 \pm 0.45$  g a diferencia de los ratones adultos MIF<sup>-/-</sup> fue de  $19.69 \pm 0.80$  g. Esta diferencia inicial de los ratones adultos MIF<sup>+/+</sup> y MIF<sup>-/-</sup> estuvo relacionado a la condición de knockout de los ratones MIF<sup>-/-</sup>. Los ratones MIF<sup>+/+</sup> y MIF<sup>-/-</sup> controles, después de 8 semanas, aumentaron de peso a  $25.26 \pm 0.77$  g y  $22.03 \pm 1.0.3$  g respectivamente. Observamos en la 4 semana que los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ perdieron peso de  $21.20 \pm 0.45$  a  $20.41 \pm 0.86$  g, no así los ratones MIF<sup>-/-</sup> STZ que no perdieron peso, sino que incrementaron ligeramente su peso de  $18.54 \pm 0.29$  a  $20.03 \pm 0.61$  g, como se puede observar en la Fig. 13.

A la 4<sup>a</sup> semana los ratones MIF<sup>+/+</sup> control tuvieron un peso de  $24.38 \pm 0.66$  y los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ fue de  $20.41 \pm 0.86$ . A la 8<sup>a</sup> semana los ratones MIF<sup>+/+</sup> control tuvieron un peso de  $25.26 \pm 0.77$  y los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ fue de  $21.19 \pm 1.25$  las diferencias fueron significativas. Los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ no lograron alcanzar el peso de un ratón adulto MIF<sup>+/+</sup> control.



4 semana MIF<sup>+/+</sup> Control vs 4 semana MIF<sup>+/+</sup> STZ \*\*P=0.0078

8 semana MIF<sup>+/+</sup> Control vs 8 semana MIF<sup>+/+</sup> STZ \*P= 0.0371

Fig. 13. **Peso Corporal** de los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ y MIF<sup>-/-</sup> STZ. Curso temporal de peso de la semana 0 hasta la semana 8 post-inducción. Se expresan los datos de 3 experimentos independientes con 5 ratones por grupo. \* p<0.05 t de Student, n=15

## IX. 9 Curva de Tolerancia a la Glucosa

Los ratones MIF<sup>+/+</sup> y MIF<sup>-/-</sup> controles, no tratados con STZ presentaron la curva típica. Cuando se administró 1.5 g/Kg de glucosa los valores fueron a los 30 min  $144.6 \pm 8.53$  y  $98.38 \pm 3.076$  mg/dl respectivamente, a los 120 min fueron de  $118.0 \pm 7.9$  y  $83.13 \pm 3.36$  mg/dl. Los valores no fueron mayores a 200 mg/dl. Como podemos observar en la figura 14. Los ratones MIF<sup>+/+</sup> y MIF<sup>-/-</sup> tratados con STZ tuvieron hiperglucemia después de la administración de glucosa, a los 30 minutos alcanzaron un pico máximo por arriba de los  $351.7 \pm 28.58$  mg/dl vs  $271 \pm 25.62$  mg/dl respectivamente. Sin embargo, después de 90 min los ratones fueron capaces de restablecer los valores de glucosa, a los 120 min la glucemia los valores fueron  $196.4 \pm 17.36$  mg/dl para los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ y  $166.3 \pm 11.03$  mg/dl para los ratones MIF<sup>-/-</sup> STZ. Los ratones MIF<sup>-/-</sup> STZ presentaron glicemias al inicio del experimento no tan altas como los MIF<sup>+/+</sup> STZ como podemos observar en la Fig. 14. En ambos casos las curvas confirman el diagnóstico de diabetes tipo 2 (DMT-2).

Fig. 14 A

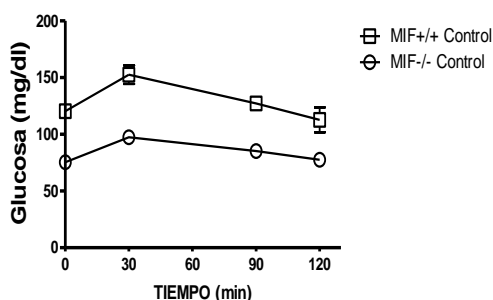


Fig. 14 B

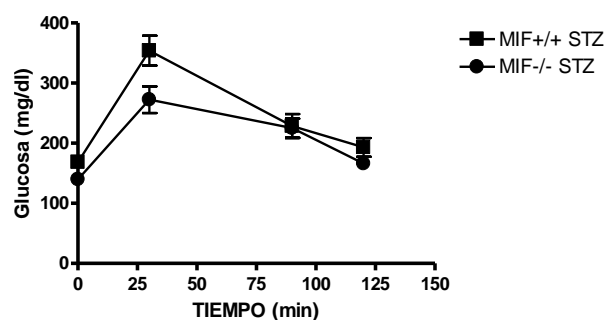


Fig. 14. **Curva de tolerancia a la glucosa oral.** A) CTG de los ratones MIF<sup>+/+</sup> Control y MIF<sup>-/-</sup> Control. B) CTG de los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ y MIF<sup>-/-</sup> STZ. Cinética de los niveles de glucosa en sangre desde el 0 min hasta los 120 min. Se expresan los datos de 3 experimentos independientes con 5 ratones por grupo. \*  $p < 0.05$  *t* de Student.  $n=15$



## IX. 10 Concentración de glucosa en sangre

Los ratones MIF<sup>+/+</sup> control y MIF<sup>-/-</sup> controles tuvieron glicemias en ayuno de 6 horas de  $113.3 \pm 8.379$  y  $75.13 \pm 6$  mg/dl  $\pm$  mg/dl. Después de la administración de la STZ a partir de la 3<sup>a</sup> semana se incremento la glucemia a valores de  $267.4 \pm 48.87$  en ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ y  $132.4 \pm 2.7$  en ratones MIF<sup>-/-</sup> STZ. El incremento de los niveles de glucemia a partir de la 5<sup>a</sup> semana post-inducción fue de valores de  $256.6$  mg/dl  $\pm$  37.11, incrementaron la glucemia a  $308$  mg/dl  $\pm$  39.92 de la 6<sup>a</sup> a la 7<sup>a</sup> semana post-inducción, como se observa en la Fig. 15. Lo que demuestra que los ratones MIF<sup>-/-</sup> STZ tienen menor glicemia que los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ. La diferencia fue estadísticamente significativa.

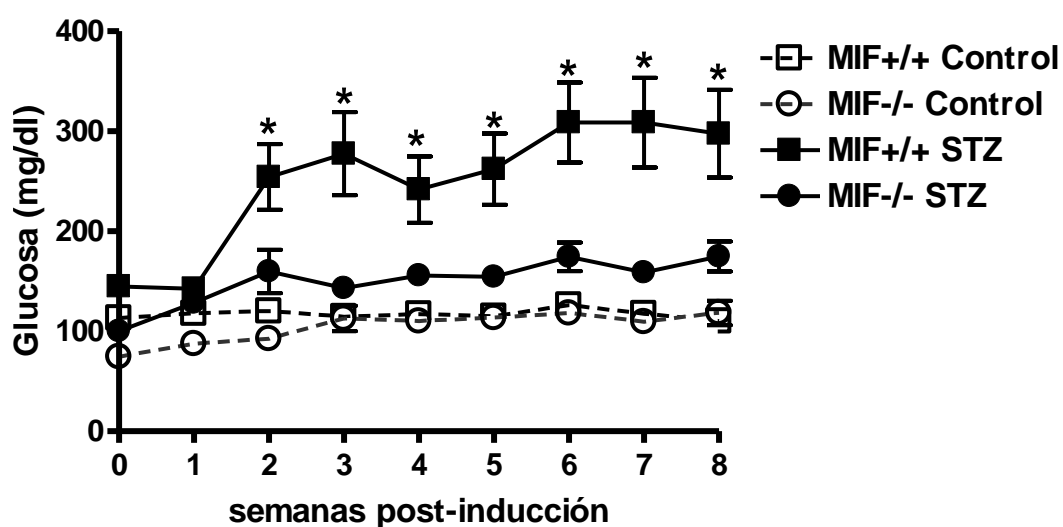


Fig. 15. **Glicemias de glucosa en sangre en los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ y MIF<sup>-/-</sup> STZ.** Cinética de los niveles de glucosa antes de la inducción con STZ y de la semana 1 a la 8 post-inducción. Se expresan los datos de 3 experimentos independientes con 5 ratones por grupo. \*  $p < 0.05$  *t* de Student,  $n=15$ .

## IX. 11 Histología de páncreas.

El corte de páncreas de ratón MIF+/+ control a 20x muestra los ácinos pancreáticos representa la mayor parte del órgano. El islote de Langerhans la porción endocrina de páncreas se encuentran dispersos en toda la porción exocrina de la glándula. Ellos reciben irrigación de los vasos sanguíneos casi siempre cercanos, tejido conectivo interlobular son bastantes extensos en ciertas regiones y muy delgados en las zonas interlobulillares como se observa en la Fig. 16.

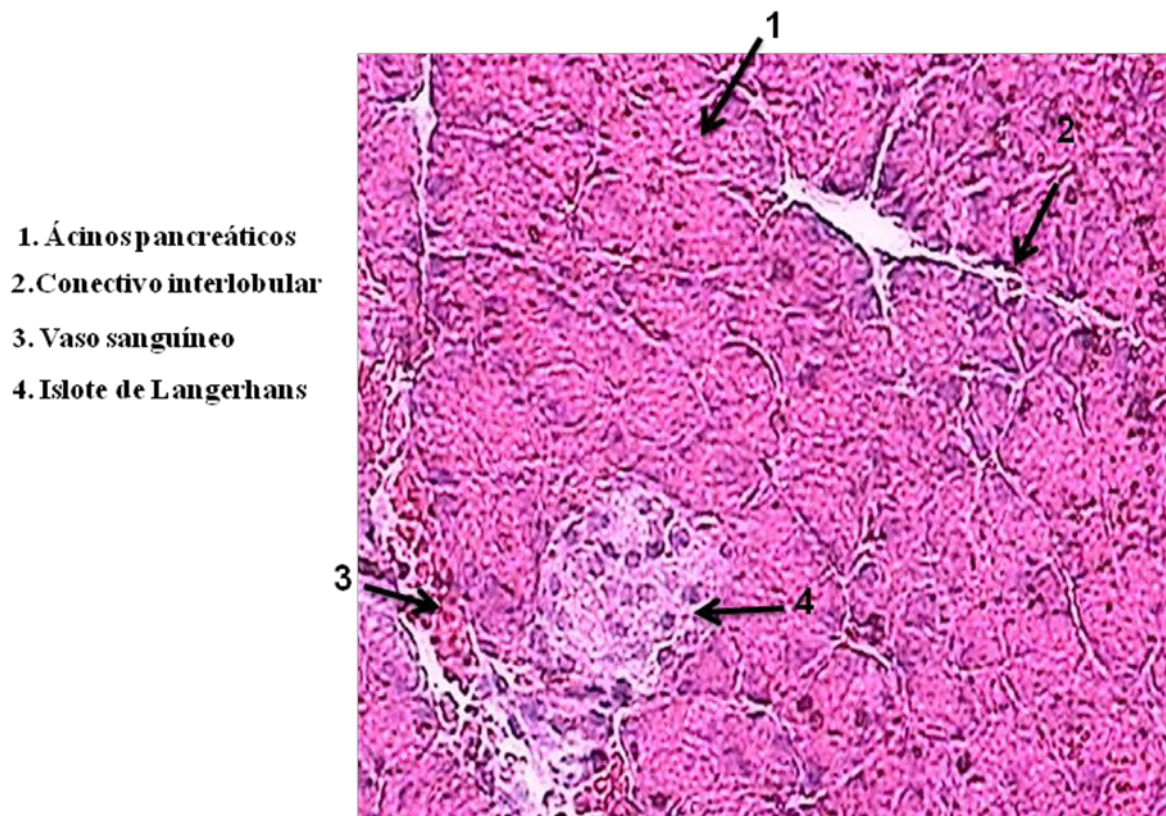


Fig. 16. Corte histológico de páncreas de ratón MIF+/+ Control a 20x. Muestra el tejido parenquimatoso glandular del páncreas con múltiples estructuras acinosas, agrupadas en lóbulos, separadas por tabiques de tejido conectivo interlobular, vasos sanguíneos [34]. Se observa además la presencia de una formación redondeada de color rosa pálido y numerosos núcleos pequeños, es el islote de Langerhans [35].

## IX. 12- Cortes histológicos de páncreas ratones controles

Páncreas de ratón MIF+/+ control a 40x muestra islote de Langerhans con cordones celulares característico de la conservación de la arquitectura histológica de un islote integro. Además se observa a 100x célula con núcleo eucromático. En páncreas de ratón MIF-/- control 40x encontramos células abundantes y células bien definidas agrupadas en ambos grupos MIF+/+ y MIF-/- controles encontramos integridad del islote de Langerhans como integridad celular como se puede observar en la Fig. 17.

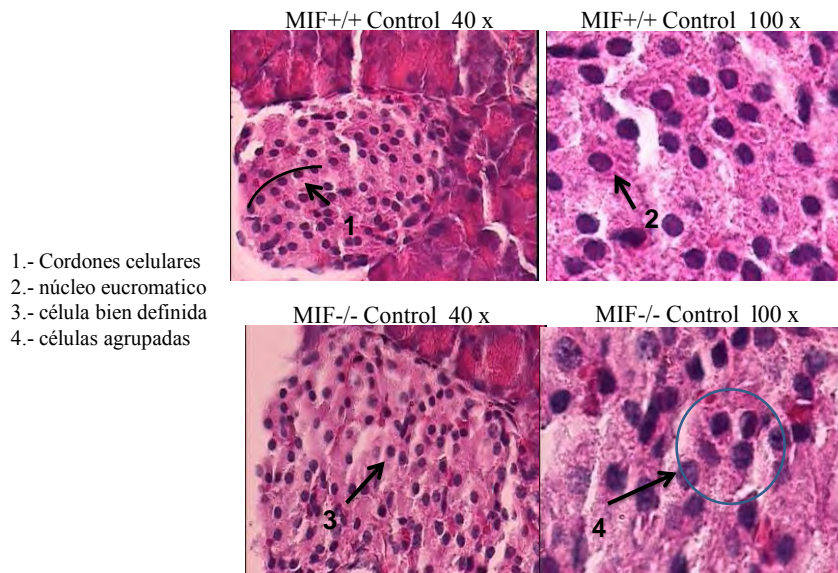


Fig. 17. **Islote de ratón MIF+/+ control y MIF-/- control.** Los islotes de Langerhans tienen una configuración más o menos esférica, las células están dispersas al azar conservando cordones celulares. Cada islote consta de células A, B, G y D, Cabe destacar que en humanos, son más abundantes las células  $\beta$ , que se suelen ubicar en el centro del islote, mientras que las células  $\alpha$  por lo general, están en la periférica. En roedores la célula  $\beta$  esta rodeada por células  $\alpha$  [36].

### IX. 13 Cortes histológicos de páncreas de ratones MIF+/+ STZ y MIF-/- STZ

Páncreas de ratón MIF+/+ STZ a 40x muestra islote de Langerhans característico de la conservación de la arquitectura histológica. Además se observa a 100x células bien definidas. En páncreas de ratón MIF-/- STZ 40x encontramos células agrupadas y a 100x hay células binucleadas. En ambos grupos MIF+/+ y MIF-/-STZ encontramos integridad del islote de Langerhans como integridad celular como se observa en la Fig- 18. No hay infiltración leucocitaria.

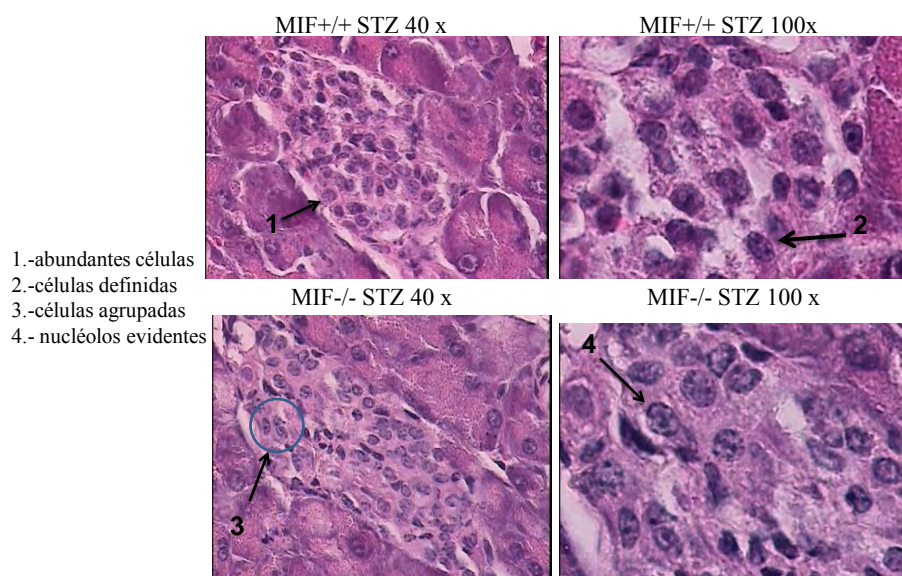


Fig. 18. **Islote de ratón MIF+/+ STZ y MIF-/- STZ.** Las células del islote se observan abundantes, bien definidas y agrupadas. Las células presentan nucléolos evidentes. No se encontró insulitis en ningún islote de Langerhans.

### IX. 14 Número de islotes de Langerhans.

Con la finalidad de comprobar si las glicemias no tan elevadas, observadas en ratones MIF<sup>-/-</sup> STZ, se debía a un menor daño en el islote pancreático generado por la administración de STZ, contamos los islotes de Langerhans de ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ y MIF<sup>-/-</sup> STZ comparados con sus respectivos controles. Los ratones se sacrificaron a la 8<sup>a</sup> semana post-inducción en donde tomamos la cantidad de islotes del grupo MIF<sup>+/+</sup> control como el 100%. Como se muestra en la Fig. 19 encontramos 92% para el grupo MIF<sup>-/-</sup> control, 13 % islotes en el grupo MIF<sup>+/+</sup> STZ, 35% de islotes en el grupo MIF<sup>-/-</sup> STZ.

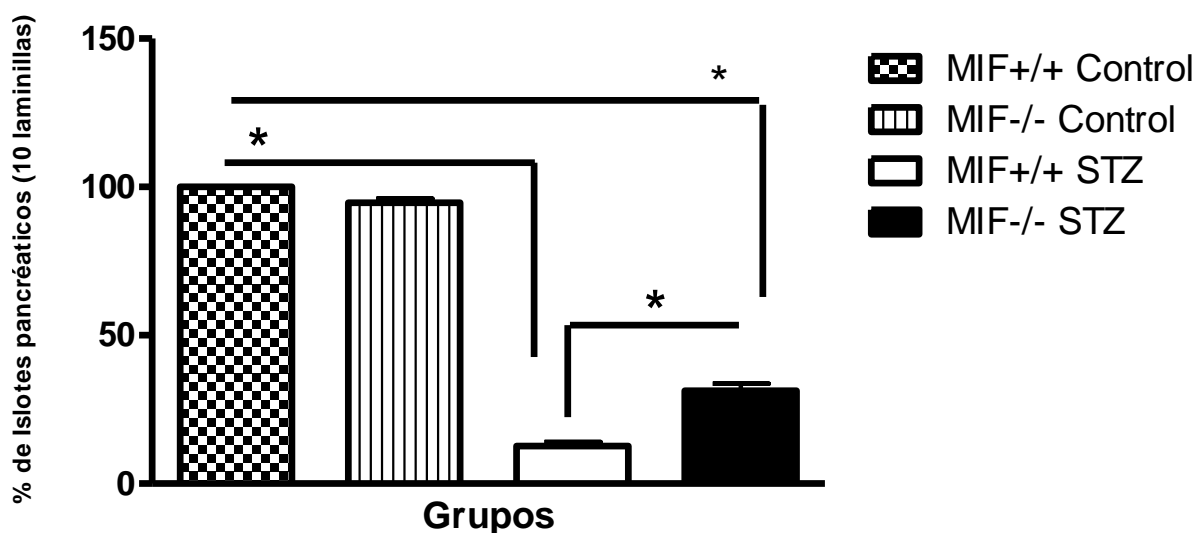


Fig. 19. Número de Islotes pancreáticos MIF<sup>+/+</sup> STZ y MIF<sup>-/-</sup> STZ después de 8 semanas post-inducción. Se expresan los datos de 3 experimentos independientes con 5 ratones por grupo. \*  $p < 0.05$  *t* de Student.  $n=15$

### IX. 15 Determinación de RNAm de insulina.

Con la finalidad de establecer si había diferencias en la producción de insulina entre los ratones MIF<sup>-/-</sup> STZ vs MIF<sup>+/+</sup> STZ, se hizo RT-PCR para el transcrito de insulina. La abundancia del RNAm de insulina en los ratones MIF<sup>+/+</sup> control fue normalizado a 1%. En la Fig. 20 se puede apreciar que los ratones MIF<sup>-/-</sup> controles expresan menos abundancia del RNAm, 0.75% de insulina, que los MIF<sup>+/+</sup> controles, sin que esto afecte su salud. Una vez que los ratones MIF<sup>+/+</sup> y MIF<sup>-/-</sup> recibieron la STZ expresaron una reducción de la abundancia del RNAm de insulina de 0.21% y 0.25% respectivamente.

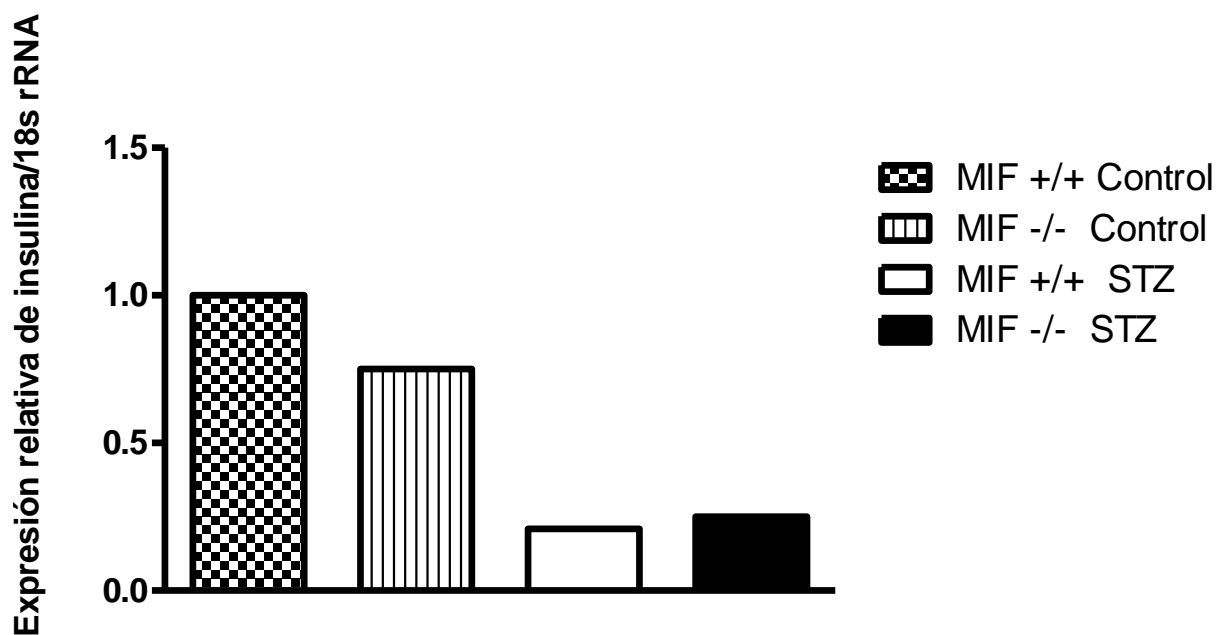


Fig. 20. Medición de la abundancia del RNAm de insulina de los islotes pancreáticos MIF<sup>+/+</sup> STZ y MIF<sup>-/-</sup> STZ. Se expresan los datos de 1 experimento con 5 ratones por grupo.

## IX. 16 Determinación de TNF- $\alpha$

En el grupo MIF+/+ control en el tiempo 0, la concentración de TNF- $\alpha$  fue  $160. \pm 65.63$  pg/ml y para el grupo MIF-/- control  $120 \pm 22.93$  pg/ml. En los ratones MIF+/+ STZ existe un incremento de TNF- $\alpha$  y sostenido, a la 6 semana se observo un pico máximo de  $665 \pm 1.89$  ng/ml en comparación con el grupo MIF-/- STZ  $117.5 \pm 25.69$ , posteriormente se observo una disminución en la concentración de TNF- $\alpha$ . Durante toda la cinética se observo mayores concentraciones de TNF- $\alpha$  en ratones MIF+/+ STZ en comparación con los ratones MIF-/- STZ, como se observa en la figura 21.

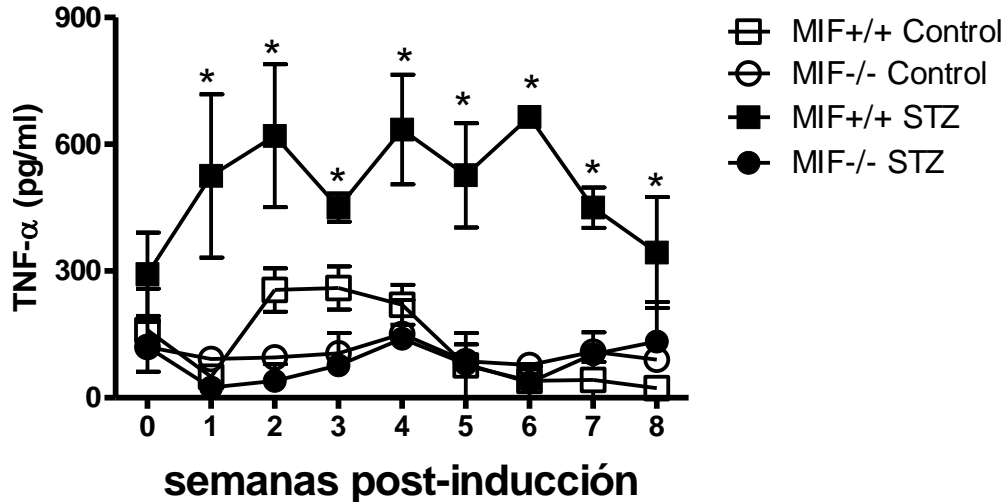


Fig. 21. Cinética de TNF- $\alpha$  en los ratones MIF+/+ STZ y MIF-/- STZ de la semana 1 a la 8 post-inducción. La medición en el tiempo 0 representa el grupo control. Se expresan los datos de 2 experimentos independientes con 5 ratones por grupo. \*  $p < 0.05$  *t* de Student.  $n = 10$

## IX. 17 Determinación de IL-1 $\beta$

El grupo MIF<sup>+/+</sup> control la concentración de IL-1 $\beta$  fue de  $1320 \pm 44.72$  pg/ml en el tiempo 0, el grupo MIF<sup>-/-</sup> control fue de  $470 \pm 93.91$  pg/ml la diferencia fue estadísticamente significativa desde el inicio. En los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ incremento la concentración de IL-1 $\beta$  hasta la 6 semana concentraciones de  $2260 \pm 250$  a. Los ratones MIF<sup>-/-</sup> STZ sus niveles estuvieron bajos desde la 1<sup>a</sup> semana de  $290 \pm 60.17$  hasta la 8<sup>a</sup> semana de  $1029 \pm 207.9$  como se observa en la Fig. 22. Lo que hace pensar que la ausencia de MIF favorece una disminución de IL-1 $\beta$  en los ratones MIF<sup>-/-</sup> STZ.

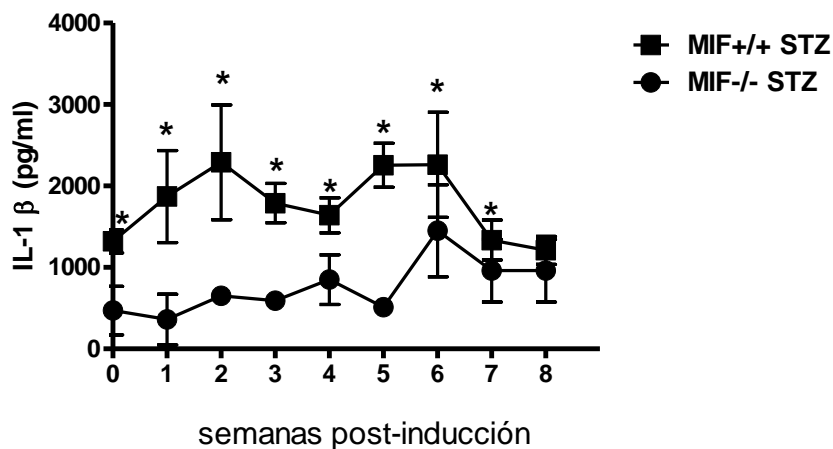


Fig. 22. Cinética de IL-1 $\beta$  en los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ y MIF<sup>-/-</sup> STZ. De la semana 1 a la 8 post-inducción. La medición en el tiempo 0 representa el grupo control. Se expresan los datos de un experimento con 5 ratones por grupo. \*  $p < 0.05$   $t$  de Student.  $n=10$ .



## IX. 18 Determinación de IL-10

La citocina IL-10 es un inhibidor de los macrófagos activados y, por tanto, participa en el control de las reacciones inmunitarias innatas. IL-10 se produce fundamentalmente en los macrófagos activados y los linfocitos T, es un regulador por retroalimentación negativa.

En los ratones MIF<sup>-/-</sup> STZ encontramos cifras similares a los MIF<sup>+/+</sup> y MIF<sup>-/-</sup> Controles  $503.6 \pm 124$ . En ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ la producción de IL-10 se incremento a partir de la 5<sup>a</sup>  $2242 \pm 346$  y hasta la 8<sup>a</sup> semana  $1940 \pm 328$ . En los ratones MIF<sup>-/-</sup> STZ las concentración máxima fue a la 8 semana con  $1029 \pm 207$  como se observa en la Fig. 23. La elevación de la concentración en suero de IL-10 es estadísticamente significativa en los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ.

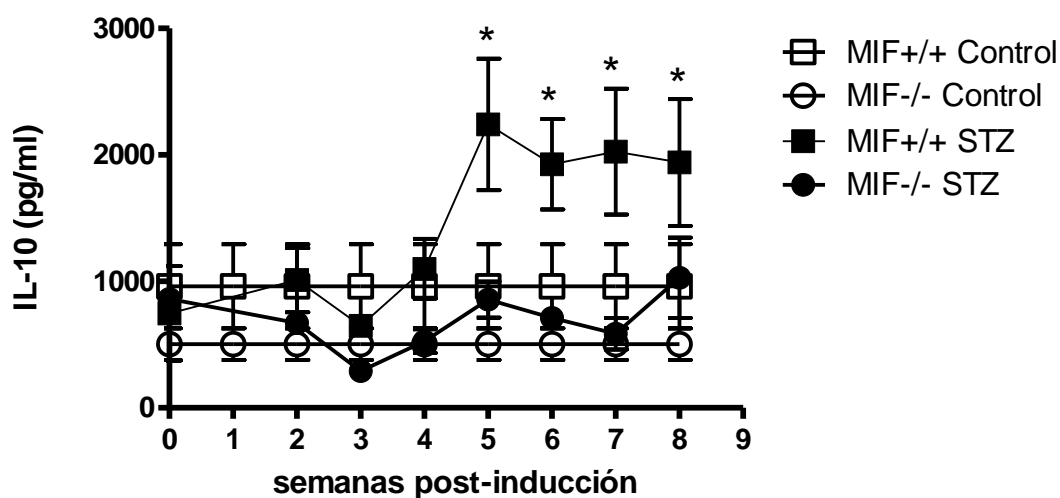


Fig. 23. **Cinética de IL-10 en los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ y MIF<sup>-/-</sup> STZ.** De la semana 0 a la 8 post-inducción. Se expresan los datos de dos experimentos independientes con 7 ratones por grupo. \*  $p < 0.05$  *t* de Student.  $n = 14$ .

## IX.19 Determinación de IL-4

La principal fuente de IL-4 son los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de la subpoblación TH2 una de las principales funciones de IL-4 es la supresión de las reacciones que dependen de los macrófagos. La producción de IL-4 en los ratones MIF<sup>+/+</sup> control y MIF<sup>-/-</sup> control fue de  $17.13 \pm 0.30$  y  $15.72 \pm 1.36$  respectivamente. Sin embargo, a partir de la 3<sup>a</sup> semana las concentraciones se incrementaron en los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ a  $242 \pm 26.73$  y en los ratones MIF<sup>-/-</sup> STZ a  $15.73 \pm 1.36$  en la 6<sup>a</sup> semana se observo un pico máximo en los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ a  $598 \pm 114.4$  y en ratones MIF<sup>-/-</sup> STZ  $244.4 \pm 48.9$  el incremento de la concentración de IL-4 fue observado de la 3<sup>a</sup> y hasta la 8<sup>a</sup> semana en el grupo de los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ como se observa en la Fig.24.

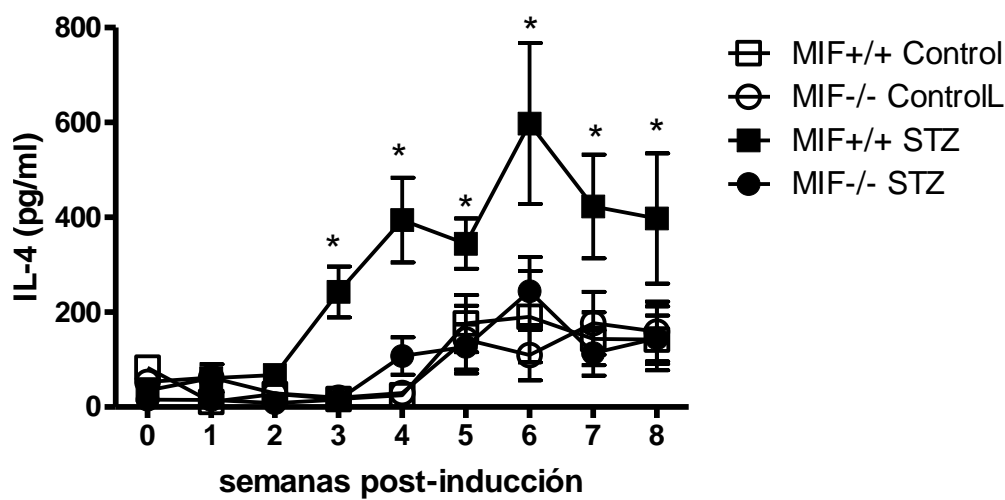


Fig. 24. Cinética de IL-4 en los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ y MIF<sup>-/-</sup> STZ. De la semana 0 a la 8 post-inducción. Se expresan los datos de dos experimentos independientes con 7 ratones por grupo. \*  $p < 0.05$  *t* de Student.  $n=14$ .

## X. DISCUSIÓN

El modelo de diabetes se desarrolló administrando una única dosis de 130 mg/Kg de STZ en ratones MIF<sup>+/+</sup> y MIF<sup>-/-</sup>. El modelo cumplió con las características principales de la enfermedad como son la poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso y glucosuria (Fig. 7-15). Aún cuando no existen cifras oficiales de glucemia para determinar diabetes en los modelos murinos hay coincidencias entre varios autores en los niveles de la glucosuria para establecer la diabetes tipo 2, Ming Zhang y cols. consideraron el diagnóstico de diabetes tipo 2 con cifras de glicemia por arriba de 11.1 mmol/L (equivalente a 200 mg/dl) empleando múltiples dosis de 35 mg/kg de STZ [37]. Ito y cols. consideraron diabetes tipo 2 cuando las cifras de glicemia eran alrededor de  $266 \pm 58$  mg/dl con una sola dosis de 100 mg/kg de STZ [38]. En este trabajo el diagnóstico de diabetes se hizo con las glicemias en ayuno de 6 horas por arriba de 140 mg/dl apoyados además con la curva de tolerancia a la glucosa (CTG) 2 determinaciones por arriba de 200 mg/dl en ayuno de 8 h.

Los resultados aquí presentados muestran que las glicemias en los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ estuvieron más elevadas en comparación con los ratones MIF<sup>-/-</sup> STZ (Fig. 15). De tal manera que los ratones MIF<sup>-/-</sup> STZ presentaron signos menos severos de la diabetes.

En la diabetes mellitus tipo 1 (DMT1) se ve afectada la talla con una retención significativa del crecimiento. Fisiológicamente se ha observado un aumento en la secreción de la hormona de crecimiento, el mecanismo de este exceso no está claro, pero existe evidencia de un trastorno en la regulación hipotalámica tanto de los estímulos positivos como en los negativos por parte de la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH) sin embargo también hay una disminución de los receptores de la hormona de crecimiento [39].

En este modelo de tesis los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ tuvieron talla significativamente disminuida asociada a hiperglicemia, a diferencia de los ratones MIF<sup>-/-</sup> STZ que tuvieron talla semejante a los ratones MIF<sup>-/-</sup> controles (sanos) (Fig. 12).

Por otro lado, también observamos una pérdida de peso significativa en los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ con respecto a los MIF<sup>-/-</sup> STZ, esta pérdida de peso seguramente estuvo asociada a la talla disminuida que tuvieron, y posiblemente a dos efectos adicionales; por un lado la descompensación metabólica que conlleva a lipólisis y proteólisis, y por otro lado al

incremento de la producción de TNF- $\alpha$  observada en los MIF<sup>+/+</sup> STZ (Fig.22), ya que es bien conocido que la síntesis prolongada de TNF- $\alpha$  provoca pérdida de células musculares y adiposas, lo que se conoce como caquexia [40].

El mecanismo de acción de la STZ es dañar el DNA de la célula  $\beta$  por alquilación llevando a la célula a apoptosis o necrosis. La STZ favorece la producción de óxido nítrico (ON) el cual contribuye a la destrucción del islote pancreático [41]. Una sola dosis alta de STZ (100 a 200 mg/Kg) ocasiona un daño severo al islote pancreático pero no favorece la infiltración leucocitaria, como en el caso del modelo de DMT 1 inducida por múltiples dosis bajas de STZ (35 a 45 mg/Kg), el cual se caracteriza por un proceso inflamatorio crónico que conlleva a la infiltración de linfocitos y otras células.

En el modelo aquí reportado de una sola dosis de 130 mg/Kg de STZ se observó el daño inicial generado por la administración de la STZ reflejado en la pérdida de islotes pancreáticos. En el caso de los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ esta pérdida fue del 87% mientras que en los ratones MIF<sup>-/-</sup> STZ fue menor, apenas del 65%. Al parecer la deficiencia de MIF protegió al páncreas de una pérdida mayor de islote generada por la STZ.

Además, las histologías de los páncreas demostraron que los islotes que quedaron tanto de los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ y MIF<sup>-/-</sup> STZ no tuvieron cambios morfológicos y tampoco encontramos infiltración leucocitaria (Fig. 18), a diferencia del modelo de bajas dosis continuas de STZ para desarrollar DMT-1. Sin embargo, habría que determinar la presencia de macrófagos y medir la concentración de ON en los islotes ya que es producido al ser destruido el islote por la STZ, así mismo faltaría determinar si la ausencia de MIF protege al islote de la producción de ON y por tanto esto pudiera disminuir el daño al islote.

Con los datos aquí presentados no podemos establecer claramente el tipo de diabetes generada con este modelo de una única dosis, pues aunque no presenta características de diabetes tipo 1, tampoco es del todo convincente de una diabetes tipo 2, como ha sido previamente reportado [38]. Esto debido a que los niveles de RNAm para insulina fueron bajos para ambos grupos (MIF<sup>+/+</sup> STZ y MIF<sup>-/-</sup>STZ) en comparación con los controles (Fig. 20). En el caso de los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ, a pesar de existir un menor número de islotes en comparación con los MIF<sup>-/-</sup>STZ (Fig.19), los niveles de RNAm de insulina

fueron semejantes a los niveles de MIF<sup>-/-</sup> STZ, lo que sugiere que los islotes que no murieron de MIF<sup>+/+</sup> STZ fueron capaces de compensar los niveles de insulina (Fig. 15). La disminución observada del transcrito de insulina en ambos grupos pudo estar en función de la pérdida de islotes pancreáticos más que atrofia de los mismos. De manera interesante se observó que el grupo de ratones MIF<sup>-/-</sup> control el transcrito para insulina fue ligeramente menor que el MIF<sup>+/+</sup> control (Fig. 20), lo que apoya que la expresión del gen de MIF está participando en la síntesis de insulina como ha sido previamente reportado [11,13].

También se determinó la secreción de insulina de los islotes pancreáticos, bajo el estímulo de glucosa en concentración basal (5mM) y concentración alta de glucosa (15mM), encontrando que los islotes provenientes de ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ escasamente liberaron insulina en ambas concentraciones de glucosa, mientras que los islotes provenientes de ratones MIF<sup>-/-</sup> STZ liberaron insulina con baja glucosa (5mM) y con alta glucosa (15mM) al igual de ratones MIF<sup>+/+</sup> controles. Esta última observación no es coincidente con el transcrito de insulina detectado para los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ por lo cual por lo que habría que hacer nuevamente el experimento para confirmar ó descartar este dato.

Por otro lado, se ha sugerido que la citocina TNF- $\alpha$  es un potente mediador de las anormalidades en la homeostasis de glucosa [42-44]. En cultivos celulares se ha observado que TNF- $\alpha$  y otras citocinas alteran el metabolismo de la glucosa en tejido adiposo, músculo esquelético e hígado. Se ha encontrado que ratas y pacientes obesos expresan niveles elevados de TNF- $\alpha$  [27,31]. *In vivo* la neutralización de TNF- $\alpha$  mejora dramáticamente la sensibilidad a la insulina y mejora la captación de glucosa por tejidos periféricos [43].

La producción incrementada de TNF- $\alpha$  en la DMT-2 ha sido relacionada con la hipertrofia de adipocitos [5]. TNF- $\alpha$  es una citocina incrementada en el proceso de tipo inflamatorio tanto de procesos infecciosos como no infecciosos [45]. En este trabajo de tesis se determinó la concentración de TNF- $\alpha$  en suero de los diferentes grupos de ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ y MIF<sup>-/-</sup> STZ así como en sus respectivos controles (ratones sanos).

Los niveles de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ fueron altos y constantes desde el inicio del tratamiento con STZ, a diferencia de los ratones MIF<sup>-/-</sup> STZ con niveles

normales. Los niveles elevados de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ , coincidieron con la hiperglucemia en ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ (Fig.15, 22, 23). Mientras que en los MIF<sup>-/-</sup> STZ los niveles de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$  fueron casi normales y coincidieron con una menor patología diabética. Por lo que puedo sugerir que la deficiencia de MIF podría estar regulando de manera negativa la expresión de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  a nivel sistémico, faltaría determinar la expresión de estas citocinas en el islote pancreático de ambos grupos experimentales.

El incremento de TNF- $\alpha$  observado en los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ podría estar relacionado con una posible resistencia a la insulina es un mecanismo temprano de la DMT-2. Dado que la hiperglucemia observada en este grupo de ratones debe influir de manera positiva en la secreción de la insulina, pero no se observa una regulación de las glicemias, posiblemente también haya resistencia a la insulina en este modelo por lo que es necesario hacer una curva de resistencia a la insulina para establecer si hay o no hay resistencia a la insulina.

El incremento de IL-1 $\beta$  observado en los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ podría estar relacionado con un proceso de inflamación inherente al tratamiento con STZ, si están concentraciones de IL-1 $\beta$  estuvieran elevadas en los islotes, con el tiempo provocará pérdida de los islotes pancreáticos [46].

Por otro lado, se sabe que las citocina anti-inflamatorias como la IL-4 e IL-10 tiene efectos benéficos disminuyendo la glucemia. La actividad física incrementa los niveles de citocinas anti-inflamatorias (IL-10 e IL-4) y de adiponectina y disminuyen las citocinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ ), la proteína C reactiva y los niveles de glucemia [47].

Particularmente, la IL-4 favorece la sensibilidad a la insulina a través de la regulación de la fosforilación de Akt y de inhibir el depósito de lípidos [48]. Mientras que la IL-10 suprime los efectos de las citocina TNF- $\alpha$ , además incrementa las funciones de las células  $\beta$  en respuesta a la glucosa previniendo el desarrollo de la diabetes. Además la IL-10 se ha propuesto como un regulador positivo de la sensibilidad a la insulina ya que incrementa la captación a la glucosa en el músculo [49]. Un estudio reciente con una población de Holanda demostró una correlación directa de concentraciones disminuidas de IL-10 con un

incremento significativo de glucemia y triglicéridos, mientras que niveles incrementados de IL-10 correlacionaron con protección contra la DMT2 y el Síndrome Metabólico [50].

Contrario a lo esperado, los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ (con mayor patología diabética) tuvieron niveles incrementados de IL-10 e IL-4 en suero a partir de la semana 5 y 3 respectivamente, después de la inducción con STZ, a diferencia de los ratones MIF<sup>-/-</sup> STZ que sus niveles de IL-10 fueron semejantes a los ratones MIF<sup>+/+</sup> y MIF<sup>-/-</sup> controles (Fig.23 y 24).

Los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ posiblemente tuvieron incrementada la concentración de IL-10 e IL-4 como reflejo de un mecanismo regulador de inflamación intentando suprimir los efectos inflamatorios de los macrófagos productores de TNF- $\alpha$  e IL-1  $\beta$ . Esto último tiene que ser estudiado a mayor profundidad.

Por todo lo arriba expuesto puedo decir que el modelo de diabetes por una única dosis de STZ es un modelo viable para el estudio de la patología diabética. Sin embargo hay que establecer con mayor claridad el tipo de diabetes que se desarrolla, o si es una combinación de DMT1 y DMT2. En cualquiera de los casos se puede establecer que MIF tiene una influencia importante para el desarrollo de la patología diabética.

## **X CONCLUSIONES**

**Los ratones MIF<sup>-/-</sup> y MIF<sup>+/+</sup> sanos (controles) tuvieron un comportamiento semejante.**

**Los ratones MIF<sup>-/-</sup> STZ fueron diferentes que los ratones MIF<sup>+/+</sup> STZ. Los ratones MIF<sup>-/-</sup> STZ presentaron patología diabética menos severa, la concentración de glucemia fue baja, mientras que las concentraciones en suero de citocinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) y citocinas anti-inflamatorias (IL-10 e IL-4) fueron iguales los controles.**

**La ausencia de MIF protege de la hiperglicemia y disminuye la inflamación sistémica.**



## XII BIBLIOGRAFIA

- [1] Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes care* 2006;29 Suppl 1:S43-48.
- [2] Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes research and clinical practice*;87:4-14.
- [3] Roglic G, Unwin N. Mortality attributable to diabetes: estimates for the year 2010. *Diabetes research and clinical practice*;87:15-19.
- [4] Fernández-Olaiz Gustavo RR, Aguilar-Salinas, Aguilar-Salinas CA, Rauda J, Villalpando S. Diabetes mellitus en adultos mexicanos. Resultados de la Encuesta Nacional de Salud 2000. *Salud Pública de México* 2007;49:S331-S337.
- [5] Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nature reviews* 2006;6:772-783.
- [6] Bogna ZDW-W. Type 2 diabetes mellitus as inflammatory disease. *Diabetes research and clinical practice* 2006;74S:S12-S16.
- [7] Bastard JP, Maachi M, Lagathu C, Kim MJ, Caron M, Vidal H, Capeau J, Feve B. Recent advances in the relationship between obesity, inflammation, and insulin resistance. *European cytokine network* 2006;17:4-12.
- [8] Badawi A, Klip A, Haddad P, Cole DE, Bailo BG, El-Soheemy A, Karmali M. Type 2 diabetes mellitus and inflammation: Prospects for biomarkers of risk and nutritional intervention. *Diabetes Metab Syndr Obes*;3:173-186.
- [9] Rabe K, Lehrke M, Parhofer KG, Broedl UC. Adipokines and insulin resistance. *Molecular medicine (Cambridge, Mass)* 2008;14:741-751.
- [10] Berg AH, Scherer PE. Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circulation research* 2005;96:939-949.
- [11] Toso C, Emamaullee JA, Merani S, Shapiro AM. The role of macrophage migration inhibitory factor on glucose metabolism and diabetes. *Diabetologia* 2008;51:1937-1946.
- [12] Bucala R. Neuroimmunomodulation by macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Annals of the New York Academy of Sciences* 1998;840:74-82.
- [13] Waeber G, Calandra T, Roduit R, Haefliger JA, Bonny C, Thompson N, Thorens B, Temler E, Meinhardt A, Bacher M, Metz CN, Nicod P, Bucala R. Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet beta cell macrophage migration inhibitory factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997;94:4782-4787.
- [14] Calandra T, Roger T. Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity. *Nature reviews* 2003;3:791-800.
- [15] Leng L, Metz CN, Fang Y, Xu J, Donnelly S, Baugh J, Delohery T, Chen Y, Mitchell RA, Bucala R. MIF signal transduction initiated by binding to CD74. *The Journal of experimental medicine* 2003;197:1467-1476.
- [16] Matza D, Kerem A, Shachar I. Invariant chain, a chain of command. *Trends in immunology* 2003;24:264-268.
- [17] Schwartz V, Lue H, Kraemer S, Korbil J, Krohn R, Ohl K, Bucala R, Weber C, Bernhagen J. A functional heteromeric MIF receptor formed by CD74 and CXCR4. *FEBS letters* 2009;583:2749-2757.
- [18] Lue H, Dewor M, Leng L, Bucala R, Bernhagen J. Activation of the JNK signalling pathway by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and dependence on CXCR4 and CD74. *Cellular signalling*;23:135-144.

- [19] Roger T, David J, Glauser MP, Calandra T. MIF regulates innate immune responses through modulation of Toll-like receptor 4. *Nature* 2001;414:920-924.
- [20] Roger T, Glauser MP, Calandra T. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) modulates innate immune responses induced by endotoxin and Gram-negative bacteria. *Journal of endotoxin research* 2001;7:456-460.
- [21] Froidevaux C, Roger T, Martin C, Glauser MP, Calandra T. Macrophage migration inhibitory factor and innate immune responses to bacterial infections. *Critical care medicine* 2001;29:S13-15.
- [22] Skelin M, Rupnik M, Cencic A. Pancreatic beta cell lines and their applications in diabetes mellitus research. *Altex*;27:105-113.
- [23] Benigni F, Atsumi T, Calandra T, Metz C, Echtenacher B, Peng T, Bucala R. The proinflammatory mediator macrophage migration inhibitory factor induces glucose catabolism in muscle. *The Journal of clinical investigation* 2000;106:1291-1300.
- [24] Atsumi T, Cho YR, Leng L, McDonald C, Yu T, Danton C, Hong EG, Mitchell RA, Metz C, Niwa H, Takeuchi J, Onodera S, Umino T, Yoshioka N, Koike T, Kim JK, Bucala R. The proinflammatory cytokine macrophage migration inhibitory factor regulates glucose metabolism during systemic inflammation. *J Immunol* 2007;179:5399-5406.
- [25] Zerneck A, Weber C. Chemokines in the vascular inflammatory response of atherosclerosis. *Cardiovascular research*;86:192-201.
- [26] Verschuren L, Kooistra T, Bernhagen J, Voshol PJ, Ouwens DM, van Erk M, de Vries-van der Weij J, Leng L, van Bockel JH, van Dijk KW, Fingerle-Rowson G, Bucala R, Kleemann R. MIF deficiency reduces chronic inflammation in white adipose tissue and impairs the development of insulin resistance, glucose intolerance, and associated atherosclerotic disease. *Circulation research* 2009;105:99-107.
- [27] Herder C, Kolb H, Koenig W, Haastert B, Muller-Scholze S, Rathmann W, Holle R, Thorand B, Wichmann HE. 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;29:368-371.
- [28] Makino A, Nakamura T, Hirano M, Kitta Y, Sano K, Kobayashi T, Fujioka D, Saito Y, Watanabe K, Watanabe Y, Kawabata K, Obata JE, Kugiyama K. High plasma levels of macrophage migration inhibitory factor are associated with adverse long-term outcome in patients with stable coronary artery disease and impaired glucose tolerance or type 2 diabetes mellitus. *Atherosclerosis*;213:573-578.
- [29] Yabunaka N, Nishihira J, Mizue Y, Tsuji M, Kumagai M, Ohtsuka Y, Imamura M, Asaka M. Elevated serum content of macrophage migration inhibitory factor in patients with type 2 diabetes. *Diabetes care* 2000;23:256-258.
- [30] Sanchez-Nino MD, Sanz AB, Ihalmo P, Lassila M, Holthofer H, Mezzano S, Aros C, Groop PH, Saleem MA, Mathieson PW, Langham R, Kretzler M, Nair V, Lemley KV, Nelson RG, Mervaala E, Mattinzoli D, Rastaldi MP, Ruiz-Ortega M, Martin-Ventura JL, Egido J, Ortiz A. The MIF receptor CD74 in diabetic podocyte injury. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:353-362.
- [31] Sanchez-Zamora Y, Terrazas LI, Vilches-Flores A, Leal E, Juarez I, Whitacre C, Kithcart A, Pruitt J, Sielecki T, Satoskar AR, Rodriguez-Sosa M. Macrophage migration inhibitory factor is a therapeutic target in treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Faseb J*;24:2583-2590.
- [32] Ganong WF. *Fisiología Médica*. 19ed. Ed. El Manual Moderno. México. 2004.
- [33] Kahn SE, Hull RL, Utzschneider KM. Mechanisms linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nature* 2006;444:840-846.

- [34] Finn G, editor *Histología: México*,1997.
- [35] Piezzi R, editor *Nuevo atlas de histología normal de Di Fiore: Buenos Aires*,2006.
- [36] Talchai C, Lin HV, Kitamura T, Accili D. Genetic and biochemical pathways of beta-cell failure in type 2 diabetes. *Diabetes, obesity & metabolism* 2009;11 Suppl 4:38-45.
- [37] Zhang M, Lv XY, Li J, Xu ZG, Chen L. The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model. *Experimental diabetes research* 2008;2008:704045.
- [38] Ito M, Kondo Y, Nakatani A, Hayashi K, Naruse A. Characterization of low dose streptozotocin-induced progressive diabetes in mice. *Environmental toxicology and pharmacology* 2001;9:71-78.
- [39] Bedard K, Strecko J, Theriault K, Bedard J, Veyrat-Durebex C, Gaudreau P. Effects of a high-glucose environment on the pituitary growth hormone-releasing hormone receptor: type 1 diabetes compared with in vitro glucotoxicity. *American journal of physiology* 2008;294:E740-751.
- [40] Lichtman. *AKAyAH. Inmunología celular y molecular*. 5ed. ELSERVIER.España. 2005.
- [41] Szkudelski T. The mechanism of alloxan and streptozotocin action in B cells of the rat pancreas. *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 2001;50:537-546.
- [42] Kroder G, Bossenmaier B, Kellerer M, Capp E, Stoyanov B, Muhlhofer A, Berti L, Horikoshi H, Ullrich A, Haring H. Tumor necrosis factor-alpha- and hyperglycemia-induced insulin resistance. Evidence for different mechanisms and different effects on insulin signaling. *The Journal of clinical investigation* 1996;97:1471-1477.
- [43] Hotamisligil GS, Murray DL, Choy LN, Spiegelman BM. Tumor necrosis factor alpha inhibits signaling from the insulin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994;91:4854-4858.
- [44] Liu LS, Spelleken M, Rohrig K, Hauner H, Eckel J. Tumor necrosis factor-alpha acutely inhibits insulin signaling in human adipocytes: implication of the p80 tumor necrosis factor receptor. *Diabetes* 1998;47:515-522.
- [45] Calandra T. Macrophage migration inhibitory factor and host innate immune responses to microbes. *Scandinavian journal of infectious diseases* 2003;35:573-576.
- [46] Eshes JA, Boni-Schnetzler M, Faulenbach M, Donath MY. Macrophages, cytokines and beta-cell death in Type 2 diabetes. *Biochemical Society transactions* 2008;36:340-342.
- [47] Hopps E, Canino B, Caimi G. Effects of exercise on inflammation markers in type 2 diabetic subjects. *Acta diabetologica*;48:183-189.
- [48] Chang YH, Ho KT, Lu SH, Huang CN, Shiau MY. Regulation of glucose/lipid metabolism and insulin sensitivity by interleukin-4. *International journal of obesity* (2005).
- [49] Hong EG, Ko HJ, Cho YR, Kim HJ, Ma Z, Yu TY, Friedline RH, Kurt-Jones E, Finberg R, Fischer MA, Granger EL, Norbury CC, Hauschka SD, Philbrick WM, Lee CG, Elias JA, Kim JK. Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle. *Diabetes* 2009;58:2525-2535.
- [50] van Exel E, Gussekloo J, de Craen AJ, Frolich M, Bootsma-Van Der Wiel A, Westendorp RG. Low production capacity of interleukin-10 associates with the metabolic syndrome and type 2 diabetes : the Leiden 85-Plus Study. *Diabetes* 2002;51:1088-1092.

### **XIII. APENDICES**

## SOLUCIONES Y REACTIVOS

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

80g NaCl (J. T Baker)

11.6g Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> (J. T Baker)

2g KH<sub>2</sub> PO<sub>4</sub> (J. T Baker)

2g KCL (ICN Biomedicals)

### **Buffer TBE 10x**

Tris base (890mM) (Sigma Chemicals)

Ácido Bórico (890mM) (J. T Baker)

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

Se ajusta todo a pH 8,0 y se afora a 500ml con agua destilada

### **Buffer de pegado (ELISA)**

0.1M de Na<sub>2</sub> HPO<sub>4</sub> (J. T Baker)

Para 1L con agua destilada

### **Solución de bloqueo (ELISA)**

1000ml de PBS más 1% de Albumina sérica bovina (ICN Biochemicals)

### **Solución de lavado (ELISA)**

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

### **Sustrato ABTS para revelado (ELISA)**

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

## **Soluciones para la extracción de los islotes de Langerhans**

### A. Hanks completo (Hanks + BSA + Antibiótico)

500 mL de Hanks con rojo fenol

500 µl de Gentamicina o antibiótico/antimicótico (PEF)

12.5 mL de BSA (disuelta al 4% en sales de Spinner)

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

10.8 g de Ficoll

29.2 mL de Hanks completo

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

### C. Diluciones de Ficoll en Hanks completo

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

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

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