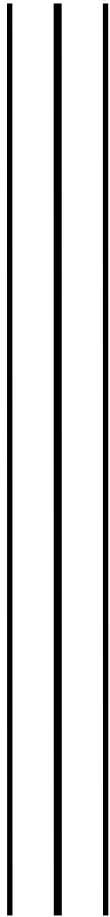




UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“EVALUACIÓN HISTOLÓGICA Y DE LA FUNCIÓN
MITOCONDRIAL DEL HÍGADO EN RATONES DEFICIENTES EN
EL FACTOR INHIBIDOR DE LA MIGRACIÓN DE MACRÓFAGOS
(MIF).”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ALEJANDRA LIRA LEÓN

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. EMMA BERTA GUTIÉRREZ CIRLOS-MADRID

Los Reyes Iztacala, Edo. De México, 2016



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.

RECONOCIMIENTO

El siguiente trabajo se realizó en el laboratorio de Bioquímica y Bioenergética ubicado en la Unidad de Biomedicina, perteneciente a División de Investigación y Posgrado de la Facultad de Estudios Superiores plantel Iztacala. Con la colaboración del laboratorio de Inmunidad Innata ubicado en la misma unidad de investigación bajo la dirección de la Dra. Miriam Rodríguez Sosa y el laboratorio de Histología de la Unidad de Morfofisiología de la misma facultad, coordinado por el Biólogo José del Carmen Benítez Flores.

El siguiente trabajo fue dirigido por la Dra. Emma Berta Gutiérrez Cirlos-Madrid, en colaboración con la Dra. Miriam Rodríguez Sosa. Este trabajo fue apoyado por los donativos: CONACYT: 152224 (MRS) y 102102 (EBGCM); UNAM-DGAPA-PAPIIT IN221611 (EBGCM), 215915 (EBGCM) y IN212412 (MRS); PAPCA-50-2013 (EBGCM y MRS).

Agradecimientos:

A la Dra. Ember por su guía en este proyecto, al igual por la paciencia, apoyo y tolerancia brindada durante este tiempo.

A todos los compañeros del laboratorio: Led, Dulce, Laura, Millán, Ana, Gerardo, Viri y Obed; siempre tan sonrientes y trabajadores. Los quiero Lab. 2.

A la técnico M. en C. Tecilli quien por su gran apoyo (académico y emocional), paciencia, esfuerzo, enseñanza, amistad y cariño fue posible concluir esta etapa.

A Thalí y a Yuriko por ser mis primeras asesoras del modelo murino, gracias por las carcajadas, graaan paciencia y apoyo. Al igual a Ime por enseñarme PCR y auxiliarme cuando era necesario. Y a la Dra. Miriam por su asesoría en el entendimiento del modelo y su apoyo.

Al laboratorio de Histología de la UMF, a usted sabio Carmelo por enseñarme a ver la histología más allá de HE, al igual su gran paciencia y amistad. A la Dra. Rosario por el apoyo y guía ante dudas y consejos de vida. Y a todos los latosos: los chicos de Optometría (Thoribio, Adriana y Daniel), a los colegas biólogos (Ale niño, Frank y Fer) y a Aidín por ser una gran e inusual veterinaria.

A mis compañeros de la carrera donde aún encuentro apoyo, burlas y cariño. Especialmente a Iván Bautista, Viri J. Miguel, Daniel Cazares, Gaby Hernández y Alfonso Isaias. También quienes nos conocimos al principio de este camino: Ingrid Antillón. Los quiero mucho y sé que puedo contar con ustedes.

A mis profesores de la carrera cuyo tiempo y dedicación a la docencia no sería posible lograr nuestra formación como futuros biólogos. Los aprecio a cada uno de ustedes y los recuerdo de la mejor manera.

“However vast the darkness,
we must supply our own light.”
Stanley Kubrick

Dedicatoria:

A mi grandiosa familia, papá, mamá, gemela y la más pequeña. Soy muy afortunada por tenerlos a mí lado ya que siempre me han apoyado con su cariño, paciencia, regaños, consejos, abrazos y confianza. Gracias por no dejarme caer nunca y creer en mí. Los amo inmensamente y este logro es por ustedes.

A mis amigos de hace 22 años: Miguelito, Tephaz, Annie, Rie, Mishel y Pris que a pesar del tiempo es una alegría reencontrarnos y saber que no ha cambiado esa amistad.
¡Calidad CC!

A mis amigos de la UAM-I: Ace, Joss, Betho y Gibran por ser un ejemplo a seguir y echarme porras; gracias por las bromas, confianza y trabajo en equipo. Y a mis compañeros del Politécnico (ESIA) donde conocí grandes personalidades y tuve muuuuy divertidos momentos: Jess Jess, Migue, Alan y Mishael.

A los amigos de mi sista que también son mis amigos :P, a Jobab por ser un amigo en todo este tiempo, por tus consejos, tus bromas bobas y vibra “disfruta la vida”. A Cadaa por ser quien se ríe de mis ocurrencias y que le agrada escucharme, por brindarme tu amistad en tan poco tiempo.

A Norberto, has sido quien ha vivido muy de cerca lo que pensé, sentí, grité y disfruté durante este tiempo; y en el que compartimos muchas de nuestras alegrías como fracasos. Me has brindado lo mejor de tí y de tu tiempo, te amo.

ÍNDICE	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	9
ÍNDICE DE TABLAS	10
ABREVIATURAS	11
RESUMEN	14
ABSTRACT	15
INTRODUCCIÓN	16
1. El sistema inmune	16
2. La inflamación	16
2.1 Efectos de la inflamación	17
2.2 Estados de la inflamación	17
2.3 El metabolismo y la inflamación crónica	18
3. Factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF)	18
3.1 MIF y su función en la respuesta inflamatoria	19
3.2 MIF y su función en el metabolismo	19
4. La mitocondria	20
4.1 Tamaño y estructura	20
4.2 Funcionamiento: La cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa	21
4.3 ROS mitocondrial	24
4.4 La inflamación crónica y el estrés oxidativo: disfunción mitocondrial	25
5. El hígado	27
ANTECEDENTES	31
1.- Relación del hígado con MIF	31
2.- Biomodelo murino mutante de MIF	32
HIPÓTESIS	33
JUSTIFICACIÓN	33
OBJETIVO GENERAL	34

OBJETIVOS PARTICULARES	34
MATERIALES Y MÉTODOS	36
– <i>Animales experimentales</i>	35
– <i>Caracterización genética.....</i>	35
– <i>Extracción del hígado</i>	37
– <i>Aislamiento de mitocondrias hepáticas (Frezza et al., 2007).....</i>	37
– <i>Cuantificación de proteínas.....</i>	38
– <i>Determinación de la concentración de citocromos en mitocondrias hepáticas de ratón Mif^{+/+} y Mif^{-/-}</i>	38
– <i>Medición del consumo de oxígeno de mitocondrias hepáticas utilizando un electrodo tipo Clark (Frezza et al., 2007).....</i>	39
– <i>Medición de complejos respiratorios mitocondriales por oximetría (Kunz et al., 1993).....</i>	39
– <i>Análisis estadístico</i>	40
– <i>Histología</i>	40
RESULTADOS	42
Verificación de la interrupción del gen <i>Mif</i> en los ratones.....	42
Obtención de los hígados y parámetros físicos	43
Aspecto macroscópico del hígado	43
Histología	43
<i>Aspecto microscópico.</i>	43
Determinación de proteína mitocondrial hepática total por UV y método de Lowry.	48
Evaluación de la mitocondrias aisladas de hígado	49
<i>Identificación de citocromos por espectros de absorción diferenciales</i>	49
<i>Comparación de la concentración relativa de citocromos de las mitocondrias obtenidas.</i>	50
<i>Medición de la respiración mitocondrial hepática.....</i>	51
<i>Medición de la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales</i>	56
DISCUSIÓN.....	58
<i>Peso corporal e hígado.....</i>	58
<i>Histología del hígado</i>	58

<i>Control respiratorio de mitocondrias hepáticas</i>	61
<i>Actividad de los complejos enzimáticos mitocondriales en hígado</i>	62
CONCLUSIONES	65
<i>Perspectivas</i>	65
REFERENCIAS	66
APÉNDICE	71

ÍNDICE DE FIGURAS

- **Figura 1.** Componentes de la cadena respiratoria en la membrana interna de la mitocondria. **22**
- **Figura 2.** Los estados basales de energía en la mitocondria. **23**
- **Figura 3.** Ubicación de los citocromos *a*, *b* y *c* en los complejos respiratorios de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria. **24**
- **Figura 4.** La producción de ROS dentro de la cadena respiratoria mitocondrial..... **25**
- **Figura 5.** Fotomicrografías que ilustran la organización tisular del lobulillo hepático de un ratón silvestre de 18 semanas de edad. **28**
- **Figura 6.** Aislamiento de mitocondrias hepáticas..... **37**
- **Figura 7.** Gel de agarosa al 1% para ADN teñido con bromuro de etidio de la reacciones de PCR. **42**
- **Figura 8.** Fotomicrografías de secciones histológicas de hígados *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-}..... **46**
- **Figura 9.** Fotomicrografías de secciones histológicas de hígados *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-}..... **47**
- **Figura 10.** Espectro de absorción diferencial (reducido con ditionita menos oxidado) representativo de las mitocondrias de hígado extraídas de los grupos control *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-} en un rango de 500 a 650 nm. **49**
- **Figura 11.** Concentración relativa de citocromos *c*, *b* y *a* (expresada en nmoles de citocromo/mg de proteína) en mitocondrias hepáticas de los grupos *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-}..... **50**
- **Figura 12.** Trazos polarográficos de la respiración de mitocondrias de hígado (1mg) de los grupos silvestre y mutante para *Mif* en presencia de 10 mM-5 mM glutamato-malato (**A** y **B**), 5 mM succinato (**C** y **D**) y 100 μM ADP. **52**
- **Figura 13.** Velocidad de los Estados 3 y 4 de mitocondrias hepáticas de los grupos *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-} en presencia de los diferentes sustratos utilizados..... **53**
- **Figura 14.** Control respiratorio (**A**) y P:O (**B**) en mitocondrias hepáticas de los grupos *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-} en presencia de diferentes sustratos. **55**
- **Figura 15.** Trazos polarográficos representativos de los complejos respiratorios mitocondriales de hígado (1 mg de proteína) del grupo *Mif*^{+/+} (**1**) y *Mif*^{-/-} (**2**). ... **56**

- **Figura 16.** Actividad de los complejos respiratorios mitocondriales en hígado de los grupos controles *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-} en presencia de diferentes sustratos..... **57**
- **Figura 17.** Esquema que resume la relación entre los eventos histológicos y la función mitocondrial en el hígado de los ratones *Mif*^{-/-}..... **63**

ÍNDICE DE TABLAS

- **Tabla 1.** Tipos celulares dentro del lobulillo hepático (Kuntz y Kuntz, 2008). **30**
- **Tabla 2.** Parámetros físicos de los grupos control *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-}. **43**
- **Tabla 3.** Datos de la proteína mitocondrial total extraída de hígados de los grupos *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-}..... **49**
- **Tabla 4.** Cocientes obtenidos para los citocromos *c*, *b* y *a* en mitocondrias hepáticas de los grupos controles *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-}. **51**

ABREVIATURAS

ADN	Ácido dexosirribonucleico
ADP	Adenín difosfato
AH	Arteria hepática
AMPK	AMP-activated protein kinase
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
BALB/c	Tipo de cepa de ratón
BSA	Albúmina sérica de bovino
C57BL/6	Tipo de cepa de ratón
CB	Conducto biliar (CB)
CD74	Centro de diferenciación 74
CK	Células de Kupffer
CKr	Células de Kupffer reactivas
COX2	Ciclooxigenasa 2
CR	Control respiratorio
CXCR2	Receptor de quimiocina tipo 2
CXCR4	Receptor de quimiocina tipo 4
DBH ₂	Decilbenzoquinol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EGTA	Ácido etilenglicol tetraacético
ERO	Especies reactivas de oxígeno
ETC	Cadena transportadora de electrones
ETF	Flavoproteína transportadora de electrones
FADH ₂	Dinucleótido de flavín adenina reducido
G-M	Glutamato-malato

HB	Hepatocitos binucleados
HE	Hematoxilina-eosina
IC	Infiltrado celular (IC)
IFN- γ	Interferón gamma
kDa	Kilodaltons
MIF	Factor inhibidor de la migración de macrófagos
<i>Mif</i> ^{-/-}	Ratones deficientes de la expresión de <i>Mif</i>
<i>Mif</i> ^{+/+}	Ratones silvestres
MOPS	Ácido 3-(<i>N</i> -morfolino)propanosulfónico
NADH	Dinucleótido de nicotinamida adenina
NAFLD	Hígado graso del tipo no alcohólico
NK	Natural killer
O ₂ ^{•-}	Superóxido
OXPHOS	Fosforilación oxidativa
P:O	Relación de nmoles ADP fosforilado/ nanoátomos de O ₂ consumido
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
RH	Regeneración hepática
S	Sinusoides
S	Succinato
SDS	Dodecilsulfato sódico
TBE	Amortiguador de Tris, borato y EDTA
TMPD	N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilenediamina dihidrocloruro
TNF- α	Factor necrótico tumoral alfa
TP	Triada(s) portal(es)
UV	Ultravioleta

VC	Vena central
VP	Vena portal
$\Delta\mu_{\text{H}^+}$	Potencial químico
ΔpH	Gradiente de pH
$\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$	Gradiente electroquímico de protones
$\Delta\Psi$	Potencial eléctrico
ε	Coefficiente de extinción molar

RESUMEN

El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF, siglas en inglés) es una citocina tipo quimiocina pleitrópica que actúa en la inmunidad innata. Su función principal es aumentar la respuesta inflamatoria y de reclutar células inflamatorias hacia el sitio de inflamación (Toso *et al.*, 2008). Recientemente, se le ha asociado con el metabolismo energético debido a su expresión en diversos tejidos metabólicamente activos, como el tejido adiposo y el hígado (Verschuren *et al.*, 2009; Hirokawa *et al.*, 1997). Dentro de las enfermedades crónicas del metabolismo están la obesidad y la diabetes mellitus en las cuales se ha visto altos niveles de MIF plasmáticos (Morrison y Kleeman, 2015). Sin embargo, modelos deficientes de MIF han mostrado una mejora en la progresión de estas patologías (Sánchez *et al.*, 2010; Morrison y Kleeman, 2015). El hígado es un órgano metabólicamente importante debido a su diversidad funcional, pero principalmente por su alto contenido mitocondrial - de 1000-2000 mitocondrias por célula (Alberts *et al.*, 2011). También expresa MIF en varios tipos celulares como son: las células de Kupffer, los hepatocitos y las células de Ito. Por lo tanto, si la falta de expresión del gen *Mif* tiene un efecto positivo ante el desarrollo de alguna enfermedad crónica inflamatoria entonces no afectará el estado y función del hígado.

En este estudio se evaluó el hígado a nivel fisiológico y estructural en un modelo murino que no expresa MIF. En un primer nivel, el estructural, se hizo la observación histológica del lobulillo hepático por la tinción hematoxilina-eosina y microscopía óptica. La histología del hígado en la mutante mostró daño e inflamación, principalmente, y como respuesta a esto se presentó la regeneración hepática. En un segundo nivel, se evaluaron las mitocondrias aisladas tanto del hígado mutante como del silvestre a las cuales se midió el control respiratorio y la actividad enzimática de los complejos respiratorios por oximetría. Las mitocondrias de la mutante presentaron un buen acoplamiento pero no hubo diferencia significativa. Aunque la velocidad de actividad del complejo II (SDH) aumentó de forma significativa ($*p < 0.05$) respecto al silvestre. Por lo tanto, la falta de expresión de *Mif* en hígado en un ratón adulto genera daño e inflamación tisular lo cual permite la activación de la regeneración hepática, que a su vez evita el desbalance de la respiración mitocondrial.

Palabras clave: MIF, inflamación innata, hígado, mitocondria, control respiratorio, histología.

ABSTRACT

The macrophage migration inhibitory factor (MIF) is a pleiotropic, proinflammatory cytokine with chemokine-like functions that has a participation in the innate immune response. Its principal function is to increase the inflammatory response and the inflammatory cells recruitment to the inflammatory site (Toso *et al.*, 2008). Recently, it has been associated to energetic metabolism because of its expression in diverse metabolic active tissues such as the adipose tissue and the liver (Verschuren *et al.*, 2009; Hirokawa *et al.*, 1997). The chronical metabolism diseases we can find are obesity and diabetes mellitus where MIF plasmatic levels are increase (Morrison and Kleeman, 2015). However, biological models deficient in MIF expression have shown an improvement in the progression of these pathologies (Sánchez *et al.*, 2010; Morrison y Kleeman, 2015). The liver is an important metabolic organ due to its functional diversity, but mainly because of its high mitochondrial amount – from 1000-2000 mitochondria per cell (Alberts *et al.*, 2011). Also, MIF expression is found in different types of liver cells, like: hepatocytes, Kupffer and Ito cells. Therefore, the lack of *Mif* expression has a positive effect over inflammatory chronic diseases therefore it will not affect the liver physiology and function.

In this study, the physiologic and structural characteristics of the liver were evaluated in a *Mif* knockout murine model. For the structural part, the histological examination of the hepatic lobule was observed by hematoxylin eosin dye and optical microscopy. The knockout liver showed damage and inflammation, we believe that as a response the organ showed hepatic regeneration. For the physiological part, the isolated mitochondria from the knockout liver as well as the wild type liver were evaluated and compared. We obtained the mitochondrial respiratory control and the enzymatic activity of the respiratory complexes by oximetry. The knockout mitochondria presented good respiratory coupling but there was not significant difference with the wild type. Complex II (SDH) activity increased significantly ($*p<0.05$) compared to the wild type. We conclude that, the lack of *Mif* expression in an adult mice generates hepatic damage and inflammation in the liver, which allows activation of hepatic regeneration, which in turn avoids mitochondrial respiratory unbalance.

Key words: MIF, innate immune response, liver, mitochondria, respiratory control, histology.

INTRODUCCIÓN

1. El sistema inmune

Los vertebrados están protegidos contra organismos extraños o patógenos por un sistema de defensa que comprende una compleja red de enzimas, proteínas y células. Por sus características la respuesta inmune se ha dividido en respuesta inmune innata y respuesta inmune adaptativa. La respuesta inmune innata comprende los mecanismos de defensa contra organismos extraños o patógenos, que están listos para activarse de inmediato cuando entran en contacto con el hospedero. Esta respuesta incluye barreras físicas, químicas y celulares. Las principales barreras físicas son la piel y las mucosas. Entre las barreras químicas se incluyen la acidez del estómago y moléculas solubles especializadas con actividad antimicrobiana, mientras que la respuesta celular está principalmente representada por las células fagocíticas como macrófagos y células dendríticas (Kindt *et al.*, 2007).

A pesar de que la respuesta inmune innata es eficiente en la mayoría de los casos, es posible que algunos patógenos logren evadir esas defensas. Por ello existe una segunda respuesta llamada de inmunidad adaptativa (o inmunidad adquirida) que es inducida por la exposición a microorganismos invasores. La respuesta inmune adaptativa combate la infección con una respuesta específica, a la medida del patógeno atacante, con una gran población de linfocitos T y B, que con ayuda de las células presentadoras de antígenos (CPA), reconocen al invasor de manera específica. El establecimiento de esta respuesta requiere de tiempo, no es inmediata como la innata, puede tardar varios días antes de ser totalmente eficaz. Además, se caracteriza por el fenómeno de memoria inmunitaria, es decir, una vez que es activada por un patógeno específico, las exposiciones posteriores a éste inducen respuestas más rápidas y a menudo más potentes. El reconocimiento de los invasores es mediado por anticuerpos producidos por las células B y por los receptores de las células T, llamados “sensores” de la inmunidad adaptativa (Kindt *et al.*, 2007).

2. La inflamación.

La respuesta o reacción inflamatoria es uno de los mecanismos naturales o innatos (forma parte de la respuesta inmune innata) de defensa del cuerpo humano que actúa cuando algún tejido es dañado de cualquier forma. Las causas principales de inflamación

son: trauma físico, radiación, exposición excesiva al frío, químicos irritantes y corrosivos, también por infecciones microbianas originadas por virus, bacterias, protozoos, hongos y varios parásitos (Kindt *et al.*, 2007). El censo y la eliminación de los microorganismos invasores (patógenos) se requieren para la sobrevivencia de los seres vivos, por lo que la respuesta inflamatoria evita la propagación de agentes perjudiciales hacia los tejidos cercanos, dispone de los desechos celulares y patógenos, y establece las bases para el proceso de reparación. Aunque otro factor causal de la inflamación es la hipersensibilidad a la reacción inflamatoria, es decir, cuando el estado de la respuesta inflamatoria está alterado generando una reacción inapropiada y excesiva que daña al tejido. Otra consecuencia es la muerte del tejido (necrosis), dada por la falta de oxígeno y nutrientes que resulta de la inadecuada irrigación sanguínea, siendo un estímulo potente de la inflamación (Abbas *et al.*, 2004).

2.1 Efectos de la inflamación

Los efectos pueden ser benéficos o dañinos. En el primer caso se encuentra la inhibición de toxinas, mediante la participación de anticuerpos los cuales eliminan cualquier sustancia ajena al hospedero, la formación de fibrina (componente de la coagulación sanguínea), envía nutrientes y oxígeno, y estimula la respuesta inflamatoria mediada por células (o reacción inmunitaria celular, principalmente por la infiltración de leucocitos). En el segundo caso, el efecto dañino se debe a la constante liberación de citocinas, la destrucción del tejido normal, el hinchamiento del tejido, y la respuesta inflamatoria celular exacerbada que puede destruir tejidos. Los efectos pueden ser de tipo local o sistémico. El efecto sistémico incluye fiebre, malestar y leucocitosis (un alto y anormal número de leucocitos plasmáticos). El efecto local es un efecto localizado que intenta destruir a los agentes patógenos en el sitio de infección. Esta respuesta localizada puede ser eficiente; no suficiente de tal manera que puede no estar realizando alguna función, o excesiva que pueda dañar el tejido (Abbas *et al.*, 2004).

2.2 Estados de la inflamación

Existen diferentes grados de inflamación, el agudo y el crónico. La diferencia principal entre ambos estados es el tiempo en que comienza la inflamación. El estado inflamatorio de bajo grado (o inflamación aguda) es la primera línea de defensa ante el daño y se caracteriza por los cambios en la microcirculación sanguínea (vasodilatación), la acumulación de fluidos (edema) y proteínas plasmáticas y la migración de leucocitos de

los vasos sanguíneos hacia el área dañada, es de corta duración y su principal interés es remover el agente infeccioso o dañino.

El estado inflamatorio crónico ocurre cuando el cuerpo pierde la habilidad o capacidad de inhibir la respuesta inflamatoria y comienza a dañar otros tejidos sanos; ya que ésta es de forma prolongada y persistente. Bajo esta condición se genera daño tisular, fibrosis y disfunción celular (Hernández-Aguilera *et al.*, 2013).

2.3 El metabolismo y la inflamación crónica

Se ha sugerido una relación entre el estado energético y el proceso inflamatorio, lo cual se encontró en la investigación sobre el progreso de la obesidad. La inflamación crónica se observa ampliamente en la obesidad (el cual es un factor de riesgo dentro del síndrome metabólico). La obesidad asociada a la inflamación está involucrada en la patogénesis de la diabetes mellitus tipo 2, hipertensión, aterosclerosis, hígado graso, cáncer y asma en la obesidad (Ye y Keller, 2010). Además de ser una patología con mayor incidencia entre la población tanto adulta como infantil debido a la falta de ejercicio físico. Por lo tanto, la reducción del gasto de energía conlleva a la acumulación de energía en el cuerpo y como consecuencia el aumento de la adiposidad visceral. Estas consecuencias contribuyen al incremento de la respuesta inflamatoria ya que los adipocitos poseen una capacidad máxima de almacenaje, pero si es rebasada se origina la disfunción del tejido y la infiltración de células inmunes que en conjunto van a producir mediadores inflamatorios que se diseminan a través del torrente sanguíneo, de forma que afectan o dañan a otros tejidos (Gregor y Hotamisligil, 2011). En este sentido, varias evidencias sobre la patogénesis de la obesidad sugieren que un factor importante que podría estar contribuyendo a la inflamación metabólica es la citocina denominada factor Inhibitorio de la migración de macrófagos (Morrison y Kleemann, 2015).

3. Factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF).

El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF, Macrophage migration Inhibitory Factor) es una citocina pleiotrópica pro-inflamatoria con funciones similares a las de una quimiocina. Es una proteína altamente conservada no glicosilada de 12.5 kDa. Actualmente, se considera un mediador crucial en la respuesta inmune innata y de la inflamación ya que promueve la activación y el reclutamiento de leucocitos (Bernhagen *et al.*, 2007).

MIF actúa de forma autocrina o paracrina, sus células blanco incluyen los linfocitos T y B, macrófagos, granulocitos y otras células del sistema inmune, así como también una diversidad de células parenquimatosas, epiteliales, endoteliales y tumorales. La expresión y la secreción de MIF se describieron por primera vez en células del sistema inmune, pero también se almacena en células de varios órganos incluyendo el hígado, el pulmón, la vejiga, el riñón, el intestino y la piel (Bacher *et al.*, 1997; Calandra *et al.*, 1994; Lue *et al.*, 2002). MIF se libera rápidamente ante un estímulo inflamatorio y de estrés (Calandra y Roger, 2003; Schober *et al.*, 2008).

3.1 MIF y su función en la respuesta inflamatoria

El efecto proinflamatorio de MIF en la respuesta a la inmunidad innata actúa a diferentes niveles, por ejemplo, la expresión de MIF aumenta por la acción de otras citocinas, como el factor necrótico tumoral alfa (TNF- α) y el interferón gamma (IFN- γ). La liberación de MIF estimula la producción de TNF- α , ciclooxigenasa 2 (COX2) y prostanglandina E₂ (PGE₂) logrando que la respuesta inflamatoria sea mayor. De igual forma, mejora la producción de receptores transmembranales involucrados en la identificación de citocinas y patógenos. MIF se une a los receptores de quimioquinas CXCR2 y CXCR4 que reclutan células inflamatorias (monocitos y linfocitos) hacia el área de inflamación, además de promover la expresión de receptores de adhesión que ayudan a este proceso (Toso *et al.*, 2008).

Esta citocina juega un papel importante en varias enfermedades inflamatorias incluyendo sepsis (Bernhagen *et al.*, 1993; Calandra *et al.*, 2000), artritis reumatoide (Baugh *et al.*, 2002; Morand *et al.*, 2006) y aterosclerosis (Bernhagen *et al.*, 2007; Zerneck *et al.*, 2008). Muchas de estas enfermedades mejoraron por la modificación genética o la neutralización de MIF, por lo que se ha considerado que las terapias anti-MIF poseen un potencial valor clínico (Heinrichs *et al.*, 2011).

3.2 MIF y su función en el metabolismo

De MIF se conoce más sobre el papel que desarrolla en la respuesta inmune. Sin embargo, se ha observado que posiblemente esta citocina esté ligada al metabolismo energético; ya que se expresa en diversos tejidos metabólicamente activos tales como el tejido adiposo y el hígado (Verschuren *et al.*, 2009; Hirokawa *et al.*, 1997). La expresión de MIF en los adipocitos está regulado por la glucosa y la insulina (Sakaue *et al.*, 1999) y también ha mostrado tener efectos catabólicos en el músculo (Benigni *et al.*, 2000).

Otra evidencia, es la co-localización de MIF con la insulina dentro de los gránulos secretorios de las células beta pancreáticas, es un modulador de la liberación de insulina (Waeber *et al.* 1997). Por otra parte, referente al metabolismo del corazón, se ha sugerido el efecto de MIF en la activación de la vía de señalización AMPK (AMP-activated protein kinase, siglas en inglés), vía que detecta el estado energético de la célula e induce diversas señales para el incremento en la producción de ATP (Miller *et al.*, 2008 revisar!).

La obesidad y la diabetes mellitus son enfermedades crónicas del metabolismo en las cuales se han realizado estudios para comprender la función de MIF. En el modelo de obesidad (tanto en estudios humanos como de animales) en el estado temprano y el estado tardío se ha observado la presencia de altos niveles de MIF plasmáticos lo que está asociado al incremento e inflamación del tejido adiposo (Morrison y Kleeman, 2015). Sin embargo, la condición de deficiencia de MIF parece brindar protección al tejido adiposo ante la inflamación y prevenir la progresión de otras patologías como es la resistencia a la insulina y la diabetes mellitus tipo II (Sánchez *et al.*, 2010), esta última enfermedad se observó la disminución de glicemia en ratones mutantes inducidos por estreptozotocina. Cabe resaltar que la inflamación *per se* es un factor causal de este tipo de enfermedades pero no un factor de riesgo (Hernández-Aguilera *et al.*, 2013).

4. La mitocondria

La mitocondria es el sitio principal de la respiración celular, que es un proceso bioquímico por el cual a partir de moléculas provenientes del metabolismo (como carbohidratos, grasas y proteínas) se produce Adenosín trifosfato (ATP), necesario para el crecimiento celular y las actividades biológicas.

4.1 Tamaño y estructura

El tamaño (0.5-10 μm) y forma (alargada u ovalada) de este organelo es similar al de una bacteria, aunque estas características pueden variar según el tipo de célula. También poseen una gran movilidad dentro de la célula, por lo que cambian constantemente de forma y posición. El número de mitocondrias presentes en los distintos tejidos es muy variable y puede modificarse según la energía que necesita cada célula (Alberts *et al.*, 2011).

Cada mitocondria está delimitada por dos membranas. La membrana externa es lisa y cubre al organelo, en ella se encuentran proteínas transportadoras denominadas

porinas que son canales acuosos anchos que permiten la entrada de moléculas de 5000 daltons o menos (Alberts *et al.*, 2011). La membrana interna es impermeable al paso de iones y de la mayoría de las moléculas pequeñas, además está plegada en numerosas capas llamadas crestas. Entre ambas capas se encuentra el espacio intermembranal que químicamente equivale al citosol (Raju y Raju, 2010). La matriz mitocondrial (o espacio intercresta) contiene enzimas del ciclo de Krebs, de síntesis de lípidos y proteínas, el propio material genético (ADN y ARN) y ribosomas, que les permiten sintetizar algunas de sus propias proteínas. Además de ser estructuras celulares semiautónomas que pueden dividirse y crecer para producir más de ellas (Raju y Raju, 2010).

4.2 Funcionamiento: La cadena transportadora de electrones y la fosforilación oxidativa

La mitocondria transforma los elementos pro-energéticos en la reducción de dinucleótido de nicotinamida adenina (NADH) y/o dinucleótido de flavín adenina (FADH₂), a través de la β -oxidación y el ciclo de Krebs. Estos equivalentes reductores son asimilados por la cadena respiratoria mitocondrial en un proceso transformador de energía global (fosforilación oxidativa) donde los electrones liberados por la oxidación de NADH y FADH₂ fluyen a través de una serie de transportadores agrupada bajo el nombre de “cadena respiratoria” o cadena transportadora de electrones (ETC, electron transport chain, siglas en inglés), y por último, transferidos al oxígeno molecular. La ETC se localiza en la membrana interna mitocondrial, consta de cuatro complejos enzimáticos (complejos I-IV), y dos transportadores móviles de electrones (coenzima Q y el citocromo c; **Fig. 1**) (Nelson y Cox, 2008).

Además de los componentes clásicos de la ETC, otras proteínas involucradas en la oxidación de equivalentes redox de nutrientes son: la deshidrogenasa tipo flavoproteína transferidora de electrones (ETF, electron transport flavoprotein, siglas en inglés), compuesto de las proteínas $ETF_{A/B}$ y de las proteínas ETF-QO (**fig. 1**), las cuales conectan la oxidación de ácidos grasos con la reducción de la coenzima Q y la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, la cual oxida el NADH citosólico para reducir al FAD mitocondrial, también soporta la fosforilación oxidativa y participa en la homeostasis REDOX (Obre y Rossignol, 2015).

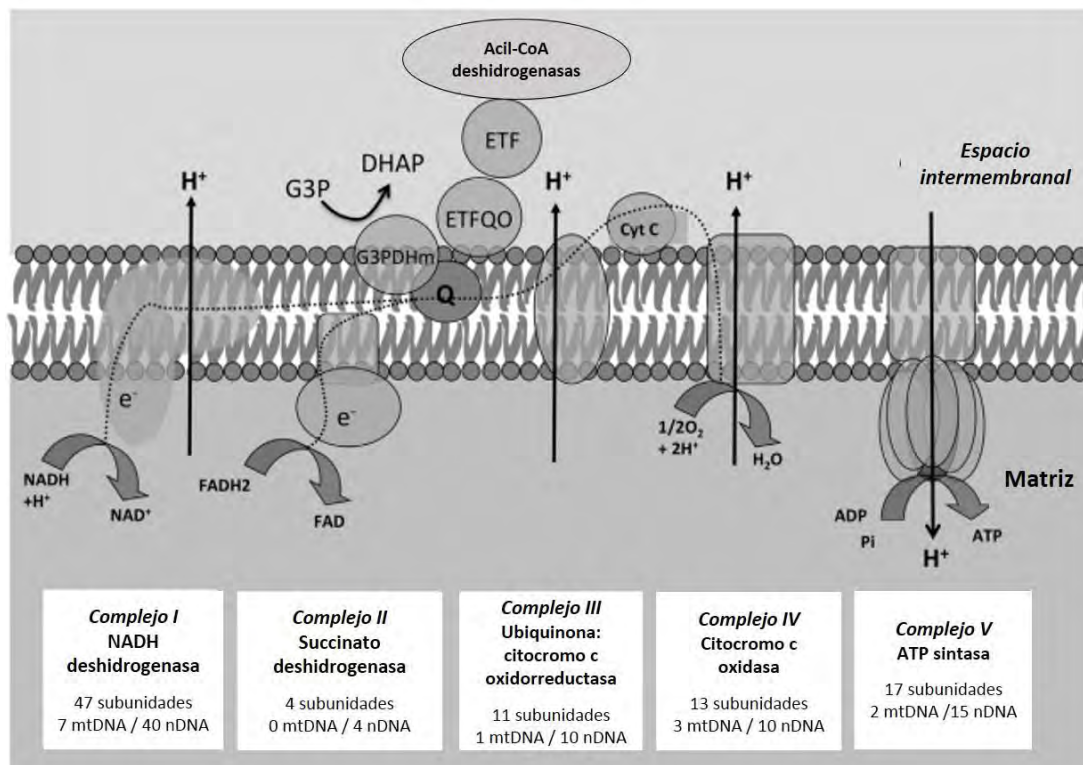


Figura 1. Componentes de la cadena respiratoria en la membrana interna de la mitocondria. En la figura se muestran los nombres de cada complejo, el número de subunidades y el número de subunidades codificadas en el ADN mitocondrial (Obtenida de Obre y Rossignol, 2015).

NADH: dinucleótido de nicotinadima adenina reducido; **NAD⁺:** dinucleótido de nicotinadima adenina oxidado; **FADH₂:** dinucleótido de flavín adenosín reducido; **FAD:** dinucleótido de flavín adenosín oxidado; **H⁺:** protón; **e⁻:** electrón; **O₂:** oxígeno; **H₂O:** agua; **ADP:** adenosín difosfato; **Pi:** fosfato inorgánico; **ATP:** adenosín trifosfato; **Q:** ubiquinona; **G3PDHm:** glicerol 3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial; **G3P:** glicerol 3-fosfato; **DHAP:** dihidroxiacetona fosfato; **ETF:QO:** flavoproteína transferidora de electrones: ubiquinona oxidorreductasa; **ETF:** flavoproteína transferidora de electrones deshidrogenasa; **cyt c:** citocromo c.

Por último, la lanzadera de NADH y la lanzadera malato-aspartato también alimentan a la fosforilación oxidativa (OXPHOS, oxidative phosphorylation, siglas en inglés) y soportan la vía de homeostasis REDOX mediante la entrega indirecta de NADH citosólico a la matriz mitocondrial (Nelson y Cox, 2008). La oxidación de NADH o FADH₂ por el complejo I o el complejo II, respectivamente, desencadena la transferencia de electrones a partir del complejo I (ó II) hasta el complejo IV y controla el bombeo de protones de la matriz al espacio intermembranal, de forma que genera el gradiente electroquímico de protones ($\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$) el cual es finalmente utilizado por la F₁F₀ ATP sintasa (complejo V) para producir ATP (**Fig. 1**). Este gradiente tiene dos componentes: el potencial eléctrico ($\Delta\Psi$) que depende de la diferencia de cargas de cada lado de la membrana y el potencial químico ($\Delta\mu_{H^+}$) que también puede expresarse como un gradiente de pH (ΔpH) que representa la diferencia de concentración de protones a cada lado de la membrana (Brand y Nicholls, 2011).

Bajo condiciones fisiológicas, la producción de energía mitocondrial se puede alternar entre dos estados basales de energía: básicamente, el estado 4 (también denominado “estado respiratorio de fuga de protones”), en éste la velocidad de la respiración es lenta y no se produce ATP ($\Delta\Psi$ es alto), mientras que durante el estado 3, la velocidad del consumo de oxígeno es rápida y el ATP se produce en gran medida ($\Delta\Psi$ es bajo) (Obre y Rossignol, 2015; **figura 2**).

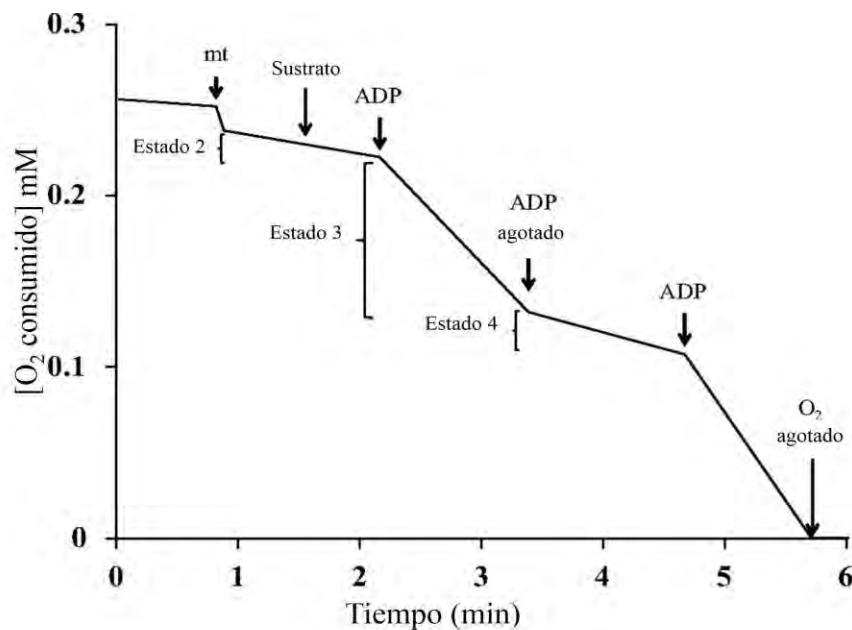


Figura 2. Los estados basales de energía en la mitocondria. Se ilustra el consumo de O₂ (mM) contra tiempo (min). Dentro la cámara se agregan primero las mitocondrias (mt, estado 2), después el sustrato específico que actúa sobre la mitocondria (ciclo de Krebs o la β -oxidación) para generar la fuerza protón motriz. Al adicionar el ADP se produce el *estado 3*, esto indica la síntesis de ATP por el rápido consumo de O₂ pero una vez agotado el ADP regresa a lo que se conoce como *estado 4*, no hay producción de ATP y el consumo de O₂ es lento. (Obtenido de Puente *et al* 1985)

Las mitocondrias contienen tres clases de citocromos que se distinguen por diferencias en su espectro de absorción de la luz visible y que se designan como *a*, *b* y *c* (Fig. 2). Los citocromos son proteínas que contienen grupos prostéticos hemo cuya función es transportar un electrón. El grupo hemo está involucrado en la transferencia de un electrón mediante los estados oxidativos del ion ferroso (Fe^{2+}) y el ion férrico (Fe^{3+}) (Nelson y Cox, 2008).

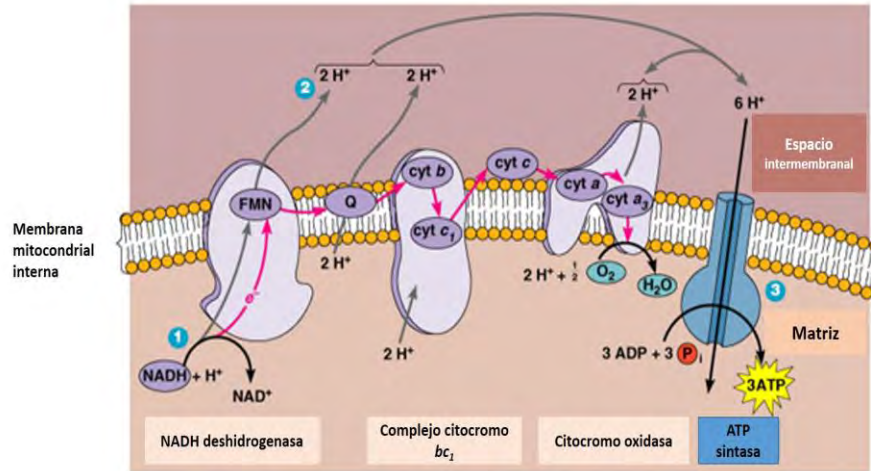


Figura 3. Ubicación de los citocromos *a*, *b* y *c* en los complejos respiratorios de la cadena transportadora de electrones de la mitocondria.

4.3 ROS mitocondrial

El metabolismo energético mitocondrial también es reconocido como fuente principal de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, reactive oxygen species, siglas en inglés). La generación de ROS mitocondrial es un proceso requerido para la regulación de varios procesos celulares, por el ejemplo, el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), molécula estable y difusible, está involucrado en la regulación de múltiples procesos vitales dentro y fuera de la mitocondria tales como el ciclo celular, la respuesta al estrés, el metabolismo energético, el balance redox y daño al ADN (Hamanaka y Chandel, 2010). Se ha propuesto que distintas concentraciones/niveles de ROS regulan distintas vías de señalización: 1) niveles bajos de superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) mitocondrial se requieren para la proliferación y la diferenciación celular; 2) el estrés celular moderado induce niveles de $\text{O}_2^{\bullet-}$ que activan sistemas adaptativos, incluyendo la regulación activa de genes antioxidantes; 3) a altos niveles, las ROS manda señal a la activación inicial de la senescencia y la muerte celular (Hamanaka y Chandel, 2010).

La producción de ROS dentro de la cadena respiratoria mitocondrial está dada en al menos cinco sitios: los sitios de unión entre la ubiquinona y los complejos I y III, el flavín mononucleótido (FMN, grupo prostético) del complejo I (**Fig. 3**), la flavoproteína transferidora de electrones (ETF), la ubiquinona óxido-reductasa y la glicerol 3-fosfato deshidrogenasa (Figueria *et al.*, 2013).

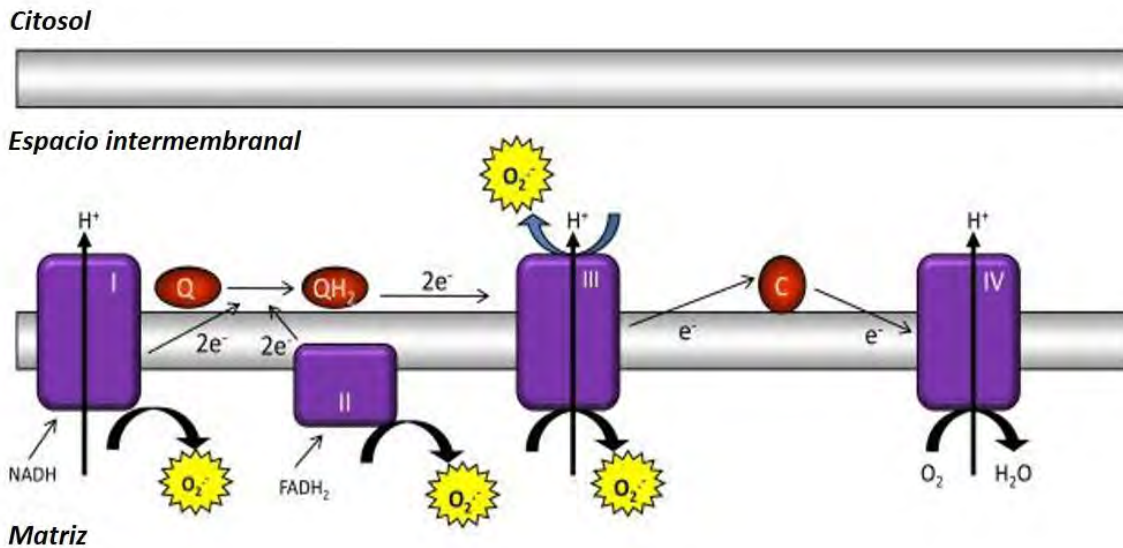


Figura 4. La producción de ROS dentro de la cadena respiratoria mitocondrial. Los complejos I, II y III producen superóxido a través de la reducción incompleta del oxígeno a superóxido. Mientras que los complejos I y II producen O₂^{•-} únicamente a la matriz mitocondrial, el CIII produce O₂^{•-} tanto en la matriz como en el espacio intermembranal. (Obtenida de Hamanaka y Chandel, 2010)

Además de los procesos fisiológicos controlados por ROS mitocondrial, otras evidencias indican que el daño oxidante mitocondrial es responsable del desarrollo y la progresión de una serie de patologías como son el cáncer, la diabetes, las enfermedades inflamatorias, hipertensión, enfermedades neurodegenerativas e isquemia, y el envejecimiento (Figueira *et al.*, 2010).

4.4 La inflamación crónica y el estrés oxidante: disfunción mitocondrial

El cuerpo humano mantiene un balance de óxido-reducción constante, preservando el equilibrio entre la producción de pro-oxidantes que se generan como resultado del metabolismo celular y los sistemas de defensa antioxidantes. La pérdida en este balance de óxido-reducción lleva aun estado de estrés oxidativo que se caracteriza por un

aumento en los radicales libres y las especies reactivas, que no alcanza a ser compensado por los sistemas de defensa antioxidantes causando daño y otras veces muerte celular (Dorado *et al.*, 2003).

El estrés oxidante actúa a nivel de las mitocondrias y el retículo endoplásmico debido al exceso de nutrientes almacenado dentro de la célula, un claro ejemplo es la obesidad. El daño oxidante celular generado por el exceso de la producción de ROS favorece el inicio de la inflamación y del envejecimiento.

En la obesidad, la inflamación es una condición que favorece a la disfunción mitocondrial, esto se ve reflejado en la acumulación de lípidos (tejido adiposo) y a la condición de resistencia a la insulina (músculo esquelético) (Morrison y Kleeman, 2015).

Las enfermedades que se relacionan con la disfunción mitocondrial, aparte de la obesidad, son las llamadas enfermedades crónicas, las cuales son de larga duración y por lo general evolucionan lentamente. Los cuatro tipos principales de enfermedades no transmisibles o crónicas son las enfermedades cardiovasculares (como ataques cardíacos y accidentes cerebrovasculares), el cáncer, las enfermedades respiratorias crónicas (como la enfermedad pulmonar obstructiva crónica y el asma) y la diabetes (OMS, 2015). Los factores para el desarrollo de estas enfermedades son: la inflamación crónica, la resistencia a la insulina, la intolerancia a la glucosa, la distribución del tejido adiposo, los patrones de secreción de adipocinas y la edad. Esta última está correlacionada con la enfermedad y la disfunción mitocondrial.

La alteración mitocondrial, la inflamación sistémica y el estrés oxidativo son las principales causas del desarrollo de este tipo de enfermedades crónicas, por lo que, la manipulación activa de los sensores energéticos y efectores puede ser un posible procedimiento terapéutico alternativo, tal es la base de la terapia anti-MIF (Morrison Y Kleeman, 2015).

5. El hígado

Como se mencionó, el hígado es un órgano con metabolismo activo, la biosíntesis de proteínas plasmáticas y los factores de coagulación, además del almacenamiento de glucógeno, triglicéridos y vitaminas son algunos ejemplos. El hígado también es una enorme glándula secretora del cuerpo, produce bilis la cual es secretada por los conductos biliares. Además, a través de la producción y degradación de hormonas, el hígado forma parte del sistema endocrino. Es el primer órgano irrigado por la sangre proveniente del intestino. Esta sangre portal está enriquecida con nutrientes pero también contiene patógenos y toxinas de forma que el hígado ejecuta importantes funciones tanto del sistema inmune innato como del adaptativo, además de ser el responsable de la detoxificación de la sangre (Lalor y Adams, 2002). Por otra parte, el hígado está constituido por unidades estructurales y funcionales: el lobulillo hepático y el acino hepático. El lobulillo hepático es la unidad estructural que modela el flujo sanguíneo dentro del órgano y es comúnmente utilizado para describir alguna patología y para dar el diagnóstico morfológico (Thoolen *et al.*, 2010). Mientras que la unidad funcional, el acino modela el flujo sanguíneo y el metabolismo.

El lobulillo hepático es una unidad que en sección histológica se identifica por su forma hexagonal (en el ratón no es tan definido como en un hígado de cerdo). Está formado por hepatocitos poliédricos los cuales están arreglados en cordones que irradian a partir de la vena central hasta las áreas portales que constituyen la tríada portal. La triada a su vez está constituida por un conducto biliar, por una ramificación terminal de la arteria hepática y por una vénula portal terminal (**figura 5**) Entre la pared sinusoidal y una cara del hepatocito se encuentra el espacio de Disse, en el que los hepatocitos están expuestos a los fluidos del órgano (sangre y bilis). La pared de los sinusoides está formada por células endoteliales fenestradas que sintetizan prostaglandinas.

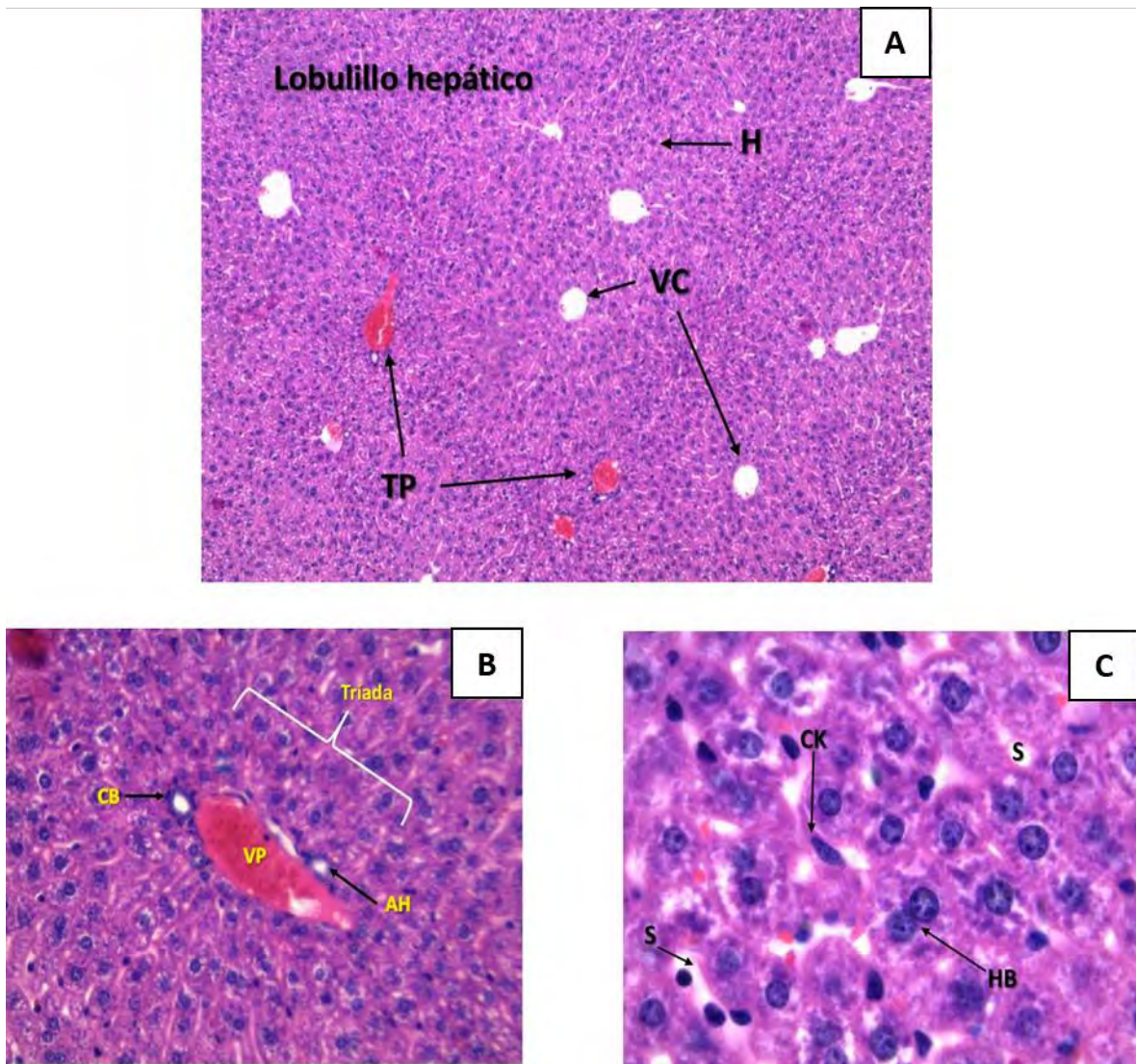
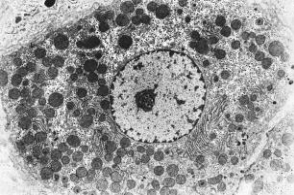
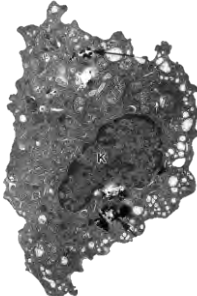
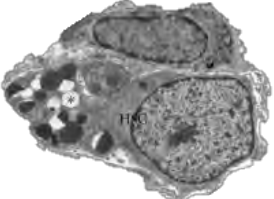
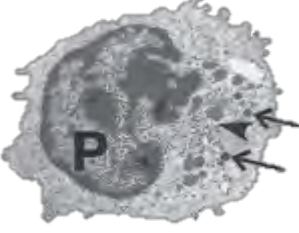


Figura 5. Fotomicrograffas que ilustran la organización tisular del lobulillo hepático de un ratón silvestre de 18 semanas de edad. En **A** se muestran algunos lobulillos cuyo elemento principal es la vena central (VC), a partir de la cual se organizan los cordones de hepatocitos (H). En **B** y **C** se muestran imágenes de mayor aumento en las que se identifican otros elementos importantes como los sinusoides (S), las triadas portales (TP), formadas por arteria hepática (AH), vena portal (VP) y conducto biliar (CB), así como células de Kupffer (CK). A-100 X; B-C 400X. Tinción de H-E. Microscopía óptica: A 100X; B, C 1000X.

Las células de Kupffer son macrófagos que se renuevan automáticamente y constituyen el 10% del total de los tipos celulares dentro del hígado. Además de ser células fagocíticas, secretan mediadores de inflamación y metabolizan lípidos y proteínas. Las células estrelladas o de Ito son células peri-sinusoidales que almacenan vitamina A y también son una gran fuente de colágeno. Finalmente las células Pit son linfocitos del tipo natural killer (NK) y se ubican en las áreas periportales (Thoolen *et al.*, 2010). Estos tipos celulares se muestran en la **tabla 1**.

Los hepatocitos contienen entre 1000-2000 mitocondrias por célula (Alberts *et al.*, 2011). Por este motivo, se ha sugerido que la carcinogénesis hepática, la hepatitis C crónica y la enfermedad del hígado graso alcohólico y del tipo no alcohólico (NAFLD siglas en inglés) son resultado de la producción de ROS debido a la disfunción mitocondrial y como consecuencia, a la inflamación crónica (Hamanaka y Chandel, 2010).

Tabla 1. Tipos celulares dentro del lobulillo hepático (Kuntz y Kuntz, 2008).

Tipo celular	Ubicación	Tamaño	Función	Imagen
Hepatocitos	Cordones hepáticos	20-30 μm	Representan el mayor tipo celular dentro del hígado, son responsables del metabolismo y la detoxificación. Estos reciben oxígeno, nutrientes, toxinas y desechos del cuerpo por el sistema circulatorio dual.	
Células de Kupffer	Distribuidos de forma aleatoria entre los capilares hepáticos (sinusoides)	15-20 μm	La principal función es la fagocitosis. Además están: la pinocitosis, la secreción de sustancias señalizadoras (ej. citocinas, factores de crecimiento, eritropoyetina, eicosanoides) o proteínas y/o enzimas, y limpieza de toxinas, antígenos, complejos anticuerpo-antígeno y purinas.	
Células de Ito (o estrelladas)	Yacen en el espacio de Disse.	5-10 μm	Células estrelladas o lipocitos son almacenadoras de lípidos. Contienen numerosos gotitas de grasas citoplasmáticas además de un gran reservorio de vitamina A.	
Células PITT	En los sinusoides y el espacio de Disse.	0.2 μm de diámetro	Estos linfocitos con largos gránulos y vesículas de centro en forma de bastón. Son asesinos naturales que destruyen células tumorales como células extrañas y células necrosadas.	

ANTECEDENTES

1.- Relación del hígado con MIF

La expresión constitutiva de MIF en el hígado se ha detectado en hepatocitos adyacentes a la vena centro-lobulillar y débilmente en los espacios sinusoidales y en las células epiteliales biliares (Bacher *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2012). MIF está implicada en diversas patologías hepáticas, en muchas de las cuales se han visto niveles incrementados de expresión de MIF, por ejemplo, en el plasma de pacientes con hepatocarcinoma celular y cirrosis hepática (Akbar *et al.*, 2001) y en pacientes con hepatitis alcohólica y cirrosis alcohólica. En estos pacientes, la expresión de MIF en el hígado podría estar localizada en hepatocitos e infiltrados celulares (Kumagi *et al.*, 2001). En un experimento con ratas alimentadas con etanol, éstas expresaron mayores niveles de MIF, lo cual correlacionó con el aumento en la inflamación y la necrosis (Nanji *et al.*, 2001). En el hígado graso no alcohólico (NAFLD), los elevados niveles de MIF coinciden con la etapa de fibrosis. Sin embargo, se ha sugerido que son secundarios a la inflamación en vez de ser causales, ya que se encontraron promotores de polimorfismos de MIF distribuidos uniformemente entre los pacientes sanos y aquellos con NAFLD (Akyildiz *et al.*, 2010). Además, existe una correlación entre la expresión de MIF y la severidad de la hepatitis B por virus en la que se presenta la necroinflamación hepática (Zhang *et al.*, 2005).

La expresión de MIF también aumentó en hígados fibrosos de ratas tratadas con tioacetamida, agente tóxico que a dosis constantes genera la producción de fibras de colágeno en el hígado. Los niveles de MIF se asociaron con el incremento numérico de macrófagos, y se encontró que los hepatocitos deformados adyacentes a las zonas fibrosas presentaban bajos niveles de expresión de MIF (Hori *et al.*, 2003). En un modelo de daño agudo en hígado de ratón inducido por concavalina A, se identificó que en ausencia de MIF, los ratones fueron protegidos del daño hepático. La protección en estos ratones no fue controlada por el cambio en los niveles de TNF- α o IFN- γ pero sí por el bajo número de leucocitos activados (Nakajima *et al.*, 2006). MIF tiene un papel regulatorio implicado en el daño isquémico de corazón, de cerebro y de intestino. En hígado con esta patología, se ha asociado a MIF como posible mediador de la respuesta inflamatoria. Un estudio reciente mostró un aumento en los niveles de MIF en hígado y en el plasma sanguíneo, junto con el aumento de la expresión del receptor de MIF, CD74 (Grupo de diferenciación 74) después de un proceso de isquemia/perfusión y a la expresión de mediadores pro inflamatorios (Liu *et al.*, 2012).

En resumen podemos decir que, tanto en pacientes humanos, como en modelos de roedores de enfermedades humanas, hay una contribución importante de MIF a la patogénesis de enfermedades hepáticas, ya que ha sido asociada con la progresión de la inflamación en este órgano.

2. Biomodelo murino mutante de MIF

Para el estudio de la función biológica de MIF se utilizó una cepa de ratón deficiente del gen *Mif* generada mediante la técnica de “*gene targeting*” en células madres embrionarias. Se utilizó un vector *targeting* que contiene un cassette resistente a neomicina que reemplaza el fragmento genómico que contiene parte de los exones 2 y 3. La construcción fue electroporada en células madres embrionarias la cuales fueron inyectadas en blastocitos de ratón C57BL/6. Los animales quimera resultantes fueron cruzados con ratones BALB/c para generar los mutantes con fondo genético BALB/c (The Jackson Laboratory, <https://www.jax.org/strain/003830>).

Así, existen dos cepas carentes de MIF de fondo genético distinto pero con el mismo origen, C57BL/6 y BALB/c. El C57BL/6 es la cepa más utilizada para estudiar modelos patológicos como de insulino resistencia, diabetes mellitus, obesidad, NAFLD y fibrosis hepática por su característica de desarrollar una respuesta inmune inflamatoria-Th1 bastante agresiva (Morrison y Kleeman, 2015). Sin embargo, en este trabajo, se ha decidido trabajar con la cepa BALB/c *Mif*^{-/-} debido a que es un biomodelo con una respuesta inmune inflamatoria-Th1 menos agresiva que la cepa C57BL/6.

Los ratones homocigotos a la alteración del gen *Mif* son viables, fértiles, de tamaño normal y no presentan ningún aumento físico o algún compartimiento anormal. No se ha detectado algún producto (RNAm o proteína) del gen *Mif* (The Jackson Laboratory, <https://www.jax.org/strain/003830>).

El uso de este ratón puede ser útil para la investigación en varias áreas como el estudio de procesos inmunológicos así como la inflamación. Los fenotipos encontrados en esta cepa incluyen: 1) disminución de los niveles plasmáticos de TNF- α , 2) disminución a la susceptibilidad a una infección bacteriana, 3) disminución a la susceptibilidad a choque por endotoxina, 4) disminución a la incidencia tumoral inducida por químicos (Zimmermann, <http://otd.harvard.edu/explore-innovation/technologies/migration-inhibitory-factor-mif-knockout-mouse/>).

HIPOTESIS:

Si la eliminación de la expresión del gen *Mif* tiene un efecto positivo contra el desarrollo de enfermedades crónico-inflamatorias, entonces la ausencia de MIF en animales sanos no afectará la estructura del hígado y el funcionamiento de sus mitocondrias.

JUSTIFICACIÓN:

Utilizar MIF como un blanco terapéutico podría ser una solución para disminuir el proceso inflamatorio en las patologías del hígado. Por lo que nos interesa conocer si la aplicación de esta posible terapia, es decir, anular su expresión, afectará o no al hígado; ya que hasta el momento no existe algún estudio sobre el estado del hígado en ratones carentes de la expresión del gen *Mif*.

OBJETIVOS

Objetivo general

Comparar el hígado del ratón mutante a *Mif* con el del ratón silvestre evaluando sus características generales e histológicas además de su función mitocondrial.

Objetivos particulares:

- Verificar el genotipo de ratones silvestres (*Mif*^{+/+}) y ratones deficientes de la expresión de MIF (*Mif*^{-/-}) machos para determinar la interrupción del gen *Mif* por PCR (Polymerase chain reaction, siglas en inglés).

A partir de la obtención y aislamiento de mitocondrias de los hígados de ratones *Mif*^{+/+} y ratones *Mif*^{-/-}:

- Evaluar la condición histológica de hígados de ratones *Mif*^{+/+} y ratones *Mif*^{-/-}.
- Medir la concentración de citocromos *a*, *b* y *c* de mitocondrias hepáticas aisladas de ratones *Mif*^{+/+} y ratones *Mif*^{-/-} mediante espectrofotometría de absorción.
- Medir el control respiratorio y la actividad de los complejos enzimáticos respiratorios de mitocondrias hepáticas aisladas de ratones *Mif*^{+/+} y de ratones *Mif*^{-/-} mediante oximetría.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales experimentales

En este estudio se utilizaron ratones machos de 18 semanas de edad con fondo genético BALB/c deficientes de la expresión del gen que codifica para MIF (*Mif*^{-/-}). Estos animales fueron donados por el Dr. John R. David de la Escuela de Salud Pública de Harvard. Se utilizaron como controles ratones silvestres del mismo fondo genético (*Mif*^{+/+}) de la misma edad y peso. Los ratones se mantuvieron en ambiente libre de patógenos en el bioterio de la FES-Iztacala de acuerdo con las normas nacionales e institucionales. Además de recibir una dieta balanceada (marca Teklad Global 18% Protein Rodent Dye con 8.2% de proteína, 48% de carbohidratos y 5.8% de lípidos) y agua esterilizada.

Caracterización genética

Todos los animales fueron genotipificados para determinar la ausencia del gen *Mif* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

- *Obtención de la muestra.* Se cortó aproximadamente 0.5 cm de la parte final de la cola de los ratones tanto experimentales como controles, y fueron coladas en tubos Eppendorf con 500 µL de amortiguador de lisis (Tris-HCl 100 mM pH 8.5, EDTA 5 mM, SDS 0.2 % y NaCl 200 mM) y 20 µL de proteínasa K (INVITROGEN 100 µg/mL) los cuales se dejaron incubando a 55°C durante toda la noche.
- *Obtención del ADN.* Los tubos eppendorf con la cola fragmentada se centrifugaron a 14,000 rpm durante 10 minutos, el sobrenadante se transfirió a tubos Eppendorf nuevos y se agregaron 500 µL de isopropanol frío, se resuspendió suavemente con la micropipeta hasta observar un precipitado (el ADN). Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 14,000 rpm por 1 minuto para concentrar el precipitado, se decantó la fase líquida y el botón de DNA se lavó con 75% de etanol frío y se centrifugó a 14,000 rpm durante 5 minutos. El etanol se evaporó a temperatura ambiente aproximadamente 40 minutos. Una vez seco el botón de DNA, se resuspendió en el tubo con 200 µL de agua grado biología molecular.

- *PCR*. Para la amplificación del gen de MIF se utilizaron los siguientes cebadores específicos:

MIF (F) 5'-AGACCACGTGCTTAGCTGAG -3'

MIF (R) 5'-GCATCGCTACCGGTGGATAA-3'

Para la amplificación del gen de NEO se utilizaron los siguientes cebadores específicos:

NEO (F) 5'-ATTGAACAAGATGGATTGCAC-3'

NEO (R) 5'-CGTCCAGGATCATCCTGATC-3'

En este proceso se utilizaron tubos nuevos libres de DNAsas-RNAsas de 0.2 mL, se llevó a cabo la reacción con un volumen final de 25 µL colocando los siguientes reactivos en el siguiente orden:

Reactivo	Para MIF	Para NEO
Amortiguador 10 X	2.5 µL	2.5 µL
MgCl ₂ (50 mM)	0.75 µL	0.75 µL
dNTP's mix (10 mM) in vitrogen	0.5 µL	0.5 µL
Primer F (15 pM)	5.6 µL	5.6 µL
Primer R (15 pM)	4.1 µL	4.1 µL
AND Taq polimerasa (5U/µL) Invitrogen	0.5 µL	0.5 µL
Agua (Sigma)	10.5 µL	10.5 µL
Muestra ADN	1 µL	1 µL

En un termociclador se realizó la amplificación bajo las siguientes condiciones:

Fases	Ciclo	Duración del ciclo	Temperatura (°C)
Desnaturalización	1	2-5 min	95
Desnaturalización		20- 30 min	95
Alineación	25-35	20-40 min	56
Elongación		30min	72
Elongación final	1	5 min	72

Electroforesis. Una vez amplificado el gen por PCR, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1X y bromuro de etidio. A cada uno de los tubos (reacción) se les agregó 8 μ L de colorante Blue-Juice (Invitrogen). De las muestras diluidas se colocaron 2 μ L en cada pozo, dejando el primero para colocar 3 μ L de marcador de peso molecular 100 pb (Invitrogen). Las muestras se corrieron en la cámara a 80 volts, 300 miniamperes (mA) por 30 minutos. El gel se observó en un transiluminador de luz UV (BioRAD Gel Doc E2 Imager) y se capturó una imagen usando el programa Image Lab.

Extracción del hígado

Los machos sin ayuno tanto controles como mutantes de 18 semanas de edad fueron sacrificados empleando una cámara de cloroformo. Se registró el peso corporal y el peso del hígado con una balanza analítica.

Aislamiento de mitocondrias hepáticas (Frezza et al., 2007).

En hielo, cada hígado fue lavado con un medio de aislamiento (Tris-MOPS 10 mM, EGTA-Tris 1 mM y sacarosa 200 mM, a pH 7.4 en frío), se cortó en pedazos pequeños, los cuales fueron homogenizados empleando el poter de teflón y, finalmente, se obtuvieron las mitocondrias por centrifugación diferencial (**fig. 6**).

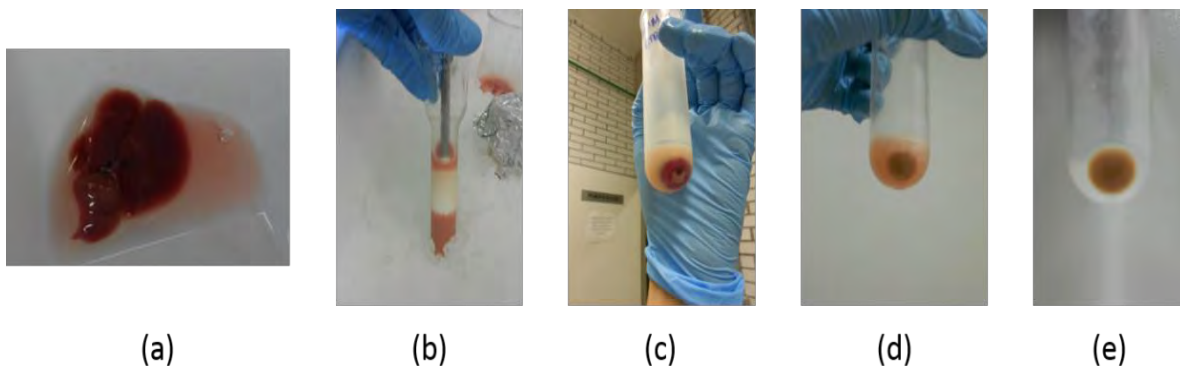


Figura 6. Aislamiento de mitocondrias hepáticas. (a) Extracción y lavado de hígado en fresco, 4°C. (b) Los pedazos de hígado cortado fueron homogenizados (homogenado 1). (c) 1° Centrifugación a 600 *xg*, para recuperar el sobrenadante. (d) 2° Centrifugación a 7000 *xg*, para quitar sobrenadante y resuspender el botón. (e) 3° Centrifugación a 7000 *xg*, dejar con el mínimo de sobrenadante y resuspender suavemente (homogenado 2). Se utilizó la centrifuga SORVALL con el rotor SS-34.

Cuantificación de proteínas

La determinación de proteínas se hizo de acuerdo al método de Lowry (Lowry, 1951; Markwell, 1978). Con una solución 100 μ g/mL de BSA se preparó una curva patrón por duplicado de un intervalo de concentración de 0 a 20 μ g/mL; a cada tubo se le agregó 1 mL de una mezcla de: 99 partes de "A" (Na_2CO_3 2%, 0.4% NaOH 0.4%, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.2 % y SDS 1%) y 1 parte de "B" ($\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 4%), y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después a cada tubo se le añadió 100 μ L del reactivo de Folin-Ciocalteu fenol diluido 1:1 con agua destilada y se dejó incubar por 30 minutos más.

Las mitocondrias hepáticas obtenidas (homogenado 2) fueron diluidas a 1:200 con agua bi-destilada y se colocaron por duplicado cantidades crecientes de las mitocondrias (20, 40 y 80 μ L), agregando de igual manera solución A+B y Folin diluido. Las lecturas de todas las muestras fueron registradas a 750 nm en un espectrofotómetro BioMate 3 Thermo, tomando como blanco el tubo de 0 μ L de BSA de la curva patrón. Las absorbancias de la proteína mitocondrial se interpolaron a los obtenidos de la curva patrón para determinar la concentración de proteína mitocondrial hepática en μ g/ μ L. Esto se realizó también para el homogenado 1 (total de proteínas contenidas en el hígado).

Cuantificación de proteína por UV (Glick y Pon, 1993). Para estimar la concentración de proteína por UV se tomaron 10 μ L de la suspensión de mitocondrias hepáticas aisladas (homogenado 2) y se agregaron a 1.0 mL de 0.6% de SDS en agua. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 280 nm en un espectrofotómetro BioMate de Thermo. El cálculo se realizó con la siguiente regla: $A_{280} = 0.21$ corresponde a una concentración de 10 mg/mL de proteína mitocondrial. De la misma forma, se realizó la determinación para el homogenado 1 (total de proteínas).

Determinación de la concentración de citocromos en mitocondrias hepáticas de ratón $Mif^{+/+}$ y $Mif^{-/-}$

Se realizaron espectros de absorción en un rango de 400-650 nm en un espectrofotómetro con doble haz de luz marca Aminco DW2 con modernización OLIS (Bogart, GA). Se colocó un amortiguador de 100 mM de fosfatos de potasio pH 6.6 en la celdilla y se calibró a 0 de absorbancia para obtener la línea base. Posteriormente, se colocó 1 mg de mitocondrias hepáticas diluidas en un 1 mL de amortiguador de 100 mM de fosfatos de potasio pH 6.6 en la celdilla de muestra de la que se obtuvo el espectro de

absorción oxidado. A continuación se le agregaron unos granos de hiposulfito de sodio (ditionita de sodio) fresco para obtener el espectro de absorción en su forma reducida. Finalmente, se obtuvo el espectro diferencial restando el espectro reducido menos el espectro oxidado, a partir del cual se obtuvieron los datos de absorbancia de los valles y picos alfa de los citocromos: $a= 600$ nm, $b= 560$ nm y $c=550$ nm; utilizando la Ley de Lambert-Beer y los ϵ de cada citocromo ($a= 24$ mM⁻¹ cm⁻¹, $b = 25$ mM⁻¹ cm⁻¹ y $c = 17.5$ mM⁻¹ cm⁻¹ (Yuet *al*, 1972; Degli *et al.*, 1986) para calcular la concentración.

Medición del consumo de oxígeno de mitocondrias hepáticas utilizando un electrodo tipo Clark (Frezza et al., 2007).

La medición del control respiratorio (CR) de las mitocondrias hepáticas se realizó en un amortiguador de trabajo (o de respiración) que contenía: KCl 125 mM, Tris-MOPS 10 mM, EGTA-Tris 1 mM y KH₂PO₄ 10 mM, ajustado a pH 7.4 con Tris base a temperatura ambiente. En este amortiguador se incubó 1 mg de las mitocondrias obtenidas con glutamato 10 mM y malato 2.5 mM, o de succinato 5 mM, y se agregaron 100 μ M de ADP. Los trazos polarográficos fueron capturados utilizando el software O₂ View del oxímetro modelo Oxygraph Plus (Hansatech Instruments, UK).

La ETC se alimentó por dos vías: para el complejo I (CI) se usó glutamato-malato como sustrato mientras que para el complejo II (CII), el succinato, con el fin de generar donadores de electrones. Por otra parte, para determinar tanto el estado 3 que comprende la velocidad de síntesis de ATP, como el estado 4, que consiste en la restauración estado basal, se añadió ADP (100 μ M) a las mitocondrias, previamente incubadas con su respectivo sustrato.

Medición de complejos respiratorios mitocondriales por oximetría (Kunz et al., 1993)

Utilizando un electrodo tipo Clark, se incubó 1 mg de mitocondrias hepáticas en un medio que contenía manitol 75 mM, sacarosa 25 mM, KCl 100 mM, KH₂PO₄ 10 mM, Na₂EDTA 0.5 mM, BSA 1 mg/mL y Tris-HCl 20 mM (pH 7.4 a temperatura ambiente.). Para la evaluación de cada complejo se agregaron los siguientes sustratos e inhibidores en este orden:

- glutamato 10 mM –malato 5 mM, ADP 5 mM y rotenona 20 μ M (Complejo I);
- succinato 10 mM y malonato 20 mM (Complejo II);

- decilbenzoquinol (DBH₂) 26 μM y antimicina 6.5 μM (Complejo III);
- ascorbato 2 mM –N,N,N',N'-tetrametil-p-fenilenediamina dihidrocloruro (TMPD) 5 μM, citocromo c oxidado 10 μM y cianuro de potasio (KCN) 1 mM (Complejo IV), en un 1 mL como volumen final.

Análisis estadístico

Todos los parámetros estudiados se analizaron con la prueba *t* de student, por el cual se comparó el grupo *Mif*^{-/-} respecto al grupo control (*Mif*^{+/+}). El estado 3, estado 4, control respiratorio y la P:O, el análisis estadístico utilizado fue el análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías seguido por la prueba de Tukey. Esto se realizó empleando el software GraphPadPrism 6.

Histología

Para la evaluación histológica se utilizó el lóbulo medio de cada hígado de ratón control y ratón *Mif*^{-/-}.

La técnica histológica utilizada consistió en: fijación de la fracción de hígado en formaldehído al 10% por 24 horas a temperatura ambiente; lavado con agua de la llave durante dos horas realizando cambios cada 15 minutos. Terminado el tiempo de lavado, las muestras se procesaron de la siguiente manera:

Tren de deshidratación:

– Etanol 70%	90 min
– Etanol 80%	90 min
– Etanol 90%	90 min
– Etanol 96%	90 min
– Etanol 100% (I)	90 min
– Etanol 100% (II)	90 min
– Xilol (I)	5-10 min
– Xilol (II)	5-10 min

Inclusión por parafina

– Parafina I	90 min/ 36°C
– Parafina II	90 min/ 36°C*
– Parafina III	90 min/ 36°C

Con parafina III se incluyó la muestra formando el bloque el cual se dejó solidificar. Se realizaron secciones de 5 µm de grosor. En una canastilla metálica se colocaron las laminillas y se dejaron en el horno (60°C) con el fin de que la parafina se derritiera y el corte quedara bien adherido al portaobjetos.

Tinción HE:

– Xilol I entrada	5 min
– Xilol II entrada	5 min
– Etanol 100% entrada	5 min
– Etanol 96% entrada	5 min
– Etanol 90% entrada	5 min
– Etanol 80% entrada	5 min
– Etanol 70% entrada	5 min
– Agua	5 min
– Hematoxilina	7 min
– Agua	Enjuague (10 seg)
– Alcohol ácido	3 segundos
– Agua	Enjuague (10 seg)
– Agua amoniacal	30 segundos
– Agua	Enjuague (10 seg)
– Eosina	3 min
– Etanol 96% salida	5 min
– Etanol 100% I salida	5 min
– Etanol 100% II salida	5 min
– Xilol I salida	5 min
– Xilol II salida	5 min

RESULTADOS

Verificación de la interrupción del gen *Mif* en los ratones

Para verificar que los ratones deficientes en *Mif* tuvieran el gen interrumpido en los ratones *Mif*^{-/-} y presente en los ratones silvestres, se realizó la amplificación mediante PCR del gen *Mif* y el cassette resistente a la Neomicina (*Neo*, que únicamente se expresa en los ratones *Mif*^{-/-}) en cada grupo. La figura 7A corresponde a un gel de agarosa 1% para ADN donde se observan los productos de la amplificación de los ratones *Mif*^{+/+} que si expresan el gen *Mif* con 200 pb. En el grupo *Mif*^{-/-}, figura 7B, se amplificó *Neo* a 500 pb. Esto confirmó que los ratones utilizados fueron homocigotos en el correspondiente grupo.

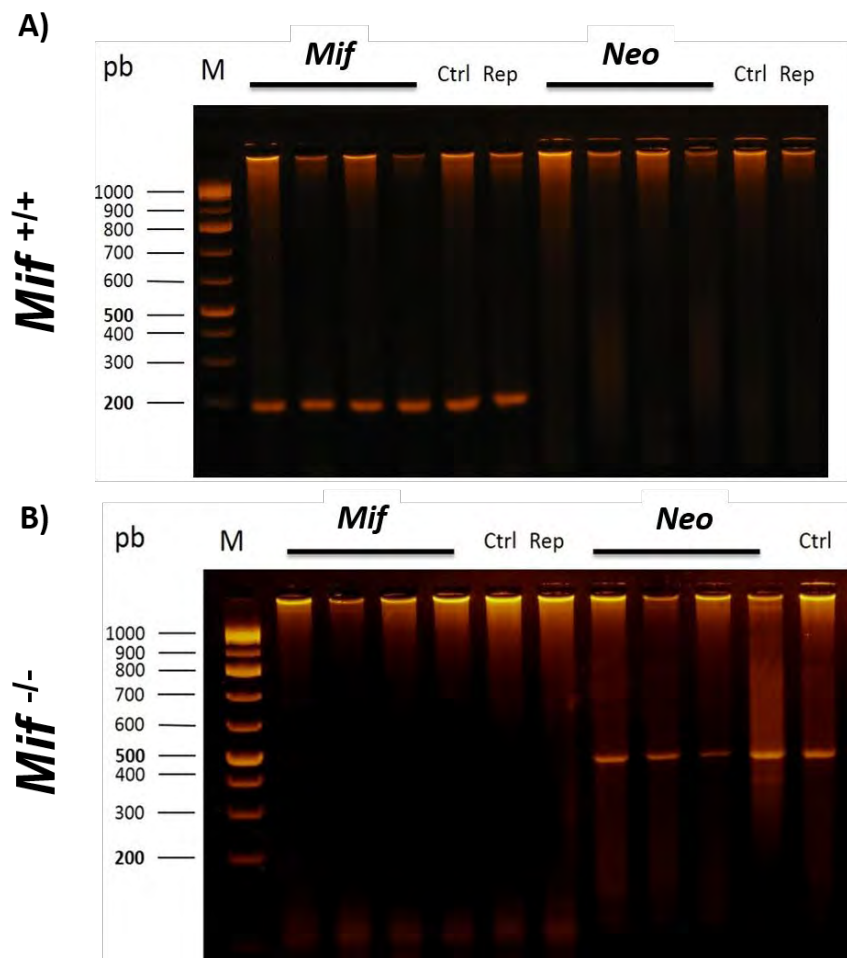


Figura 7. Gel de agarosa al 1% para ADN teñido con bromuro de etidio de la reacciones de PCR. **A)** amplificación del gen *Mif* a 200 pb en el ADN extraído de ratones control (*Mif*^{+/+}). **B)** amplificación del cassette resistente a la NEO a 500 pb en el ADN extraído de ratones mutantes (*Mif*^{-/-}). **pb:** pares de bases; **M:** marcador de pesos moleculares de 1000-200 pb; ***Mif*:** macrophage inhibitor factor; ***Neo*:** neomicina; **Ctrl:** control *Mif/Neo*; **Rep:** repetición del control para *Mif/Neo*.

Obtención de los hígados y parámetros físicos

Se utilizaron 6 ratones machos *Mif*^{+/+} y 8 ratones machos *Mif*^{-/-} de 18-19 semanas de edad. Los parámetros físicos evaluados fueron el peso corporal y el peso total del hígado. En la **Tabla 2** se muestra el peso corporal final promedio de 22.38 ± 1.73 en ambos grupos. La misma tendencia se observó en el peso total del hígado entre los dos grupos. Se calculó la relación PH/PC con el fin de determinar si el hígado era más grande respecto al peso del ratón. Sin embargo, no hubo diferencia significativa.

Tabla 2. Parámetros físicos de los grupos control *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-}.

GRUPO	EDAD (semanas)	PESO CORPORAL (gr)	PESO TOTAL DEL HÍGADO (gr)	PH/PC	n
<i>Mif</i> ^{+/+}	18-19	22.15 ± 3.15	1.23 ± 0.17	0.057 ± 0.014	6
<i>Mif</i> ^{-/-}	18-19	22.38 ± 1.73	1.12 ± 0.17	0.050 ± 0.007	8

Mif^{+/+}: silvestre control; *Mif*^{-/-}: mutante control; gr: gramos; PH/PC: relación Peso del hígado/ Peso corporal; n: el número de individuos utilizados.

Aspecto macroscópico del hígado

El hígado es un órgano de color café rojizo, que en un ratón adulto *Mif*^{+/+} pesa alrededor del 4-5% del peso corporal (25-30 gr) y presenta una superficie lisa. El hígado del ratón *Mif*^{-/-} no se observó diferencia en el color ni en el peso respecto al ratón silvestre; sin embargo, en la superficie se observó ligeramente globosa, lo cual sugiere edema.

Histología

En este trabajo se revisó detalladamente la estructura del parénquima hepático en el hígado de ratones *Mif*^{+/+} comparando con el hígado de ratones *Mif*^{-/-}. A continuación se describe el aspecto microscópico de ambos grupos.

Aspecto microscópico.

La evaluación histológica del parénquima hepático de individuos silvestres nos permitió determinar que la organización general corresponde a la que se ha descrito para el

hígado de los mamíferos, es decir, se constituye por lobulillos hepáticos los cuales contienen los elementos conocidos.

Una característica que identificamos en los hígados estudiados es que los lobulillos presentaron algunas variaciones histológicas que corresponden a diferentes estados fisiológicos (**fig 6, 7, 8 y 9**).

Los hígados de los individuos *Mif*^{-/-} presentaron un parénquima hepático que como el silvestre evidenció cambios regionales que son reflejo de diferentes estados fisiológicos. Aunado a esto, encontramos cambios en todos los elementos que constituyen el lobulillo hepático.

Los cambios identificados se encuentran en las siguientes estructuras:

a) Cordones hepáticos y hepatocitos.

Hepatocitos necróticos. Estos hepatocitos se pudieron identificar por la presencia de núcleos picnóticos, cariólisis y eosinofilia del citoplasma (**fig. 8-F; 9 -E**).

Hepatocitos con cariomegalia y citomegalia (aumento del tamaño del núcleo y de la célula), así como microhepatocitos (**fig. 9-B, -C, -D**).

Hepatocitos con esteatosis (microesteatosis) (**fig. 8-F**).

Pérdida de la organización en cordones (en zonas de inflamación) (**fig. 8-B, -E**).

b) Espacio portal

Infiltrado celular por células de Kupffer reactivas (presencia en dos individuos) (**fig. 8-C, C1**).

c) Inflamación en la zona periportal

Infiltrado celular leve (neutrófilos) (**fig. 8-B, -E**).

d) Células de Kupffer

Células de Kupffer reactivas identificadas en la zona periportal (**fig. 8-C, C1**).

Pleomorfismo de células de Kupffer. Presencia de abundantes células de Kupffer entre los sinusoides de tamaños diferentes (grandes y pequeñas con diferentes estados de condensación de la cromatina) (**fig. 9 -C, -D, -F**).

En las **figuras 7, 8 y 9** se muestran micrografías comparativas de hígado silvestre e hígado *Mif*^{-/-}.

Mif^{+/+}

Mif^{-/-}

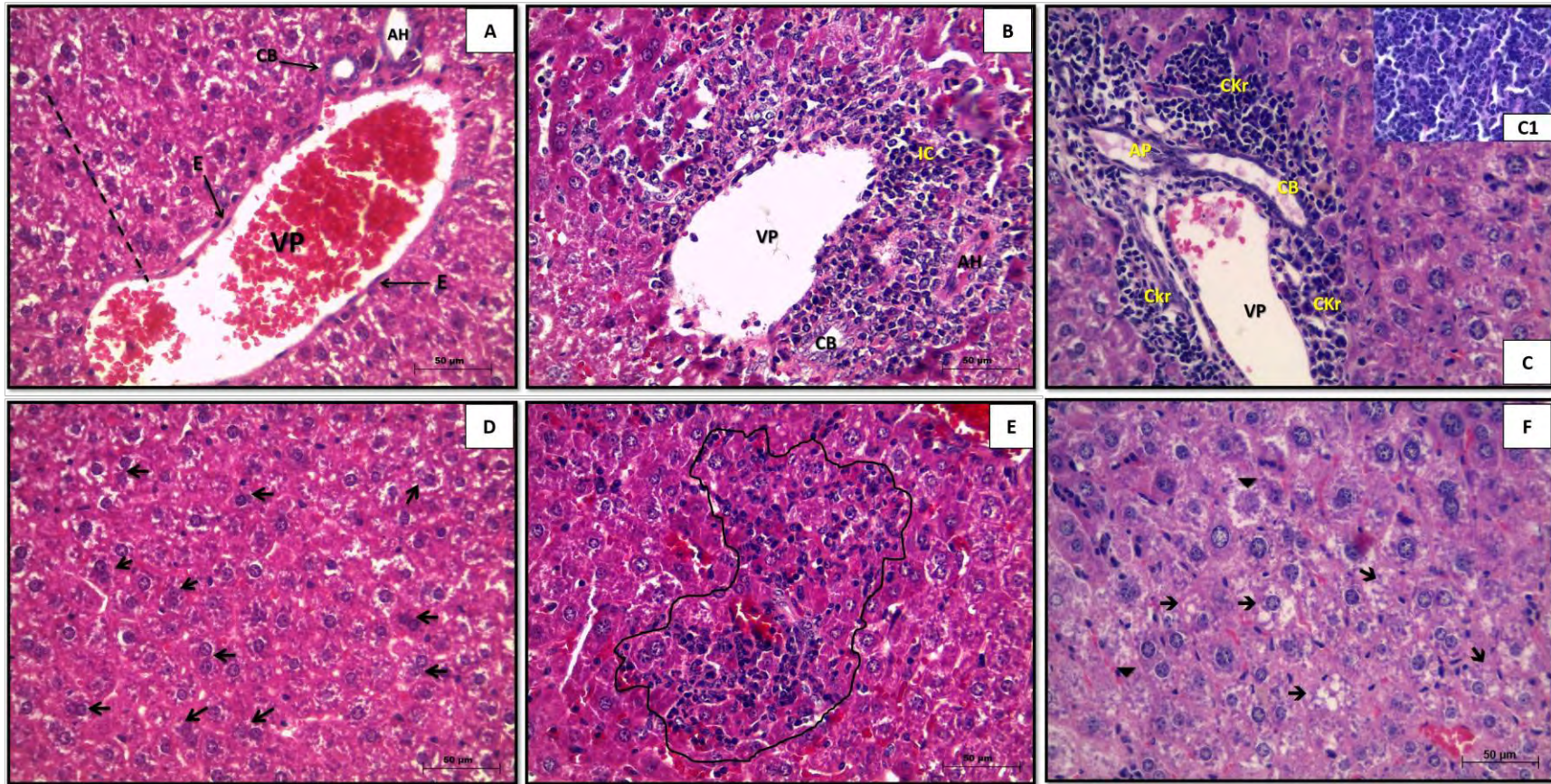


Figura 8. Fotomicrografías de secciones histológicas de hígados *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-}. **A)** se observa la vena porta revestida por endotelio (E), conducto biliar (CB), arteria hepática (AH) y cordones hepáticos (---). **B)** Se observa un triada portal rodeada por infiltrado celular de neutrófilos (IC) lo cual indica inflamación. **C)** se observan hepatocitos y células de Kupffer de localización perisinusoidal normal, se identifican además los elementos de la triada portal, así como los cúmulos de células de Kupffer reactivas (CKr). En **C1)** se observa un detalle de las células de Kupffer reactivas. Note la homogeneidad de la población celular y la ausencia de linfocitos y otras células inflamatorias. **D)** se observa hepatocitos binucleados (→) y en buen estado. **E)** se observa infiltrado celular (—) de neutrófilos. La presencia de neutrófilos sugiere fagocitosis de restos celulares. **F)** se observan hepatocitos con esteatosis (▲) así como con cariólisis (—). Tinción de H.E. A, B, C, D, E, F 400X; C1 1000X.

Mif^{+/+}

Mif^{-/-}

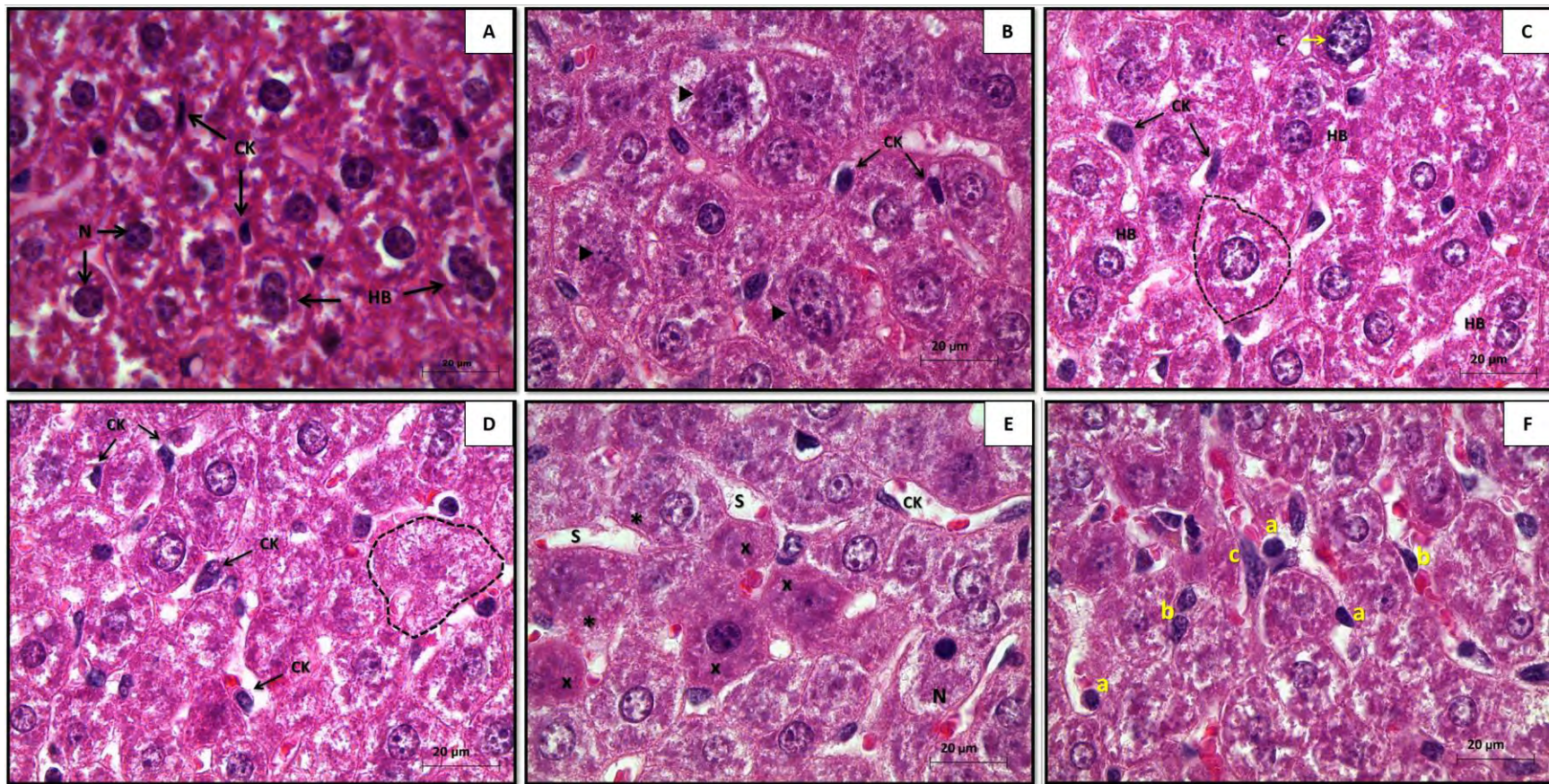


Figura 9. Fotomicrografías de secciones histológicas de hígados *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-}. **A)** se observa hepatocitos binucleados (HB) y células de Kupffer (CK) en un ratón silvestre. **B)** se observan hepatocitos binucleados de tamaño variado. Al igual, entre los sinusoides, las células de Kupffer y hepatocitos con cario-citomegalia (►). **C)** se observan hepatocitos binucleados, y con cariomegalia (C) y citomegalia(---), además células de Kupffer hipertróficas con núcleos que sugieren diferente actividad metabólica. **D)** se observan hepatocitos binucleados, definidos y de tamaño variado. Al igual, entre los sinusoides, células de Kupffer. Y un hepatocito con citomegalia y cariólisis (---). **E)** se observan hepatocitos binucleados, células de Kupffer de diferentes tamaños entre los sinusoides (S). Un hepatocito en necrosis (N) y otros con un citoplasma eosinofílico (x). Además de hepatocitos con microesteatosis (pequeñas gotitas de lípidos,*). **F)** se observan diferentes tipos de células de Kupffer, (a) pequeñas con núcleo condensado y ovoide, (b) células de mayor tamaño con núcleo esférico y cromatina dispersa, (c) células grandes con núcleo hipertrófico entre los sinusoides. Tinción de H-E: A, B, C, D, E, F 1000X

Determinación de proteína mitocondrial hepática total por UV y método de Lowry.

Para la cuantificación de proteína mitocondrial total obtenida para cada grupo se utilizaron dos métodos: por UV y por el método de Lowry con el fin de validar las concentraciones determinadas.

El promedio de concentración de mitocondrias (mg/mL) determinadas en 5 individuos de cada grupo por ambos métodos mostraron valores similares, en el caso del *Mif*^{+/+} por UV fue 38.68 ± 9.57 mg/mL y por Lowry fue 40.55 ± 6.31 mg/mL mientras en el grupo *Mif*^{-/-} por UV fue 43.47 ± 7.43 mg/mL y por Lowry fue 41.86 ± 8.74 mg/mL por lo que se decidió promediar los valores obtenidos por cada método en cada grupo.

Para los mg totales de mitocondrias por hígado se multiplicó la concentración de mitocondrias (mg/mL) por el volumen total obtenido ($\sim 370 \pm 50$ μ L para *Mif*^{+/+} y $\sim 320 \pm 40$ μ L para *Mif*^{-/-}); del hígado *Mif*^{+/+} se obtuvieron 14.58 ± 3.83 mg totales de mitocondrias mientras del hígado *Mif*^{-/-} fueron 13.54 ± 2.60 mg totales de mitocondrias.

También se calcularon los mg totales de proteínas del homogenado 1, se multiplicó la concentración del homogenado 1 (mg/mL; determinado por UV y Lowry) por el volumen total del homogenado 1 ($\sim 16 \pm 2.0$ mL para *Mif*^{+/+} y $\sim 16.60 \pm 1.02$ mL para *Mif*^{-/-}). Los mg totales de proteínas del homogenado 1 fueron 171.65 ± 27.07 mg en *Mif*^{+/+} y 186.74 ± 44.23 mg en *Mif*^{-/-}.

Posteriormente, se calcularon dos cocientes: *mg de mitocondrias hepáticas/ mg proteína del homogenado 1* (proteína total del hígado); y *mg de mitocondrias hepáticas/ mg de hígado* (peso total) por cada método, los valores obtenidos también fueron promediados (**tabla 3**). El primer cociente fue calculado entre los mg totales de mitocondrias y los mg totales de homogenado 1. Mientras el segundo fue la relación de mg totales de mitocondrias y los mg totales de peso del hígado.

En la **tabla 3**, cada grupo control tuvo 5 individuos de los cuales se determinó la concentración de mitocondrias, mg totales de mitocondrias y los cocientes mencionados. Los valores entre ambos grupos no mostraron diferencia significativa, incluyendo el peso del hígado. Por lo tanto, la condición *Mif*^{-/-} no influye en la concentración mitocondrial hepática ni el peso del hígado durante la etapa adulta del ratón *Mif*^{-/-} respecto al ratón *Mif*^{+/+}.

Tabla 3. Datos de la proteína mitocondrial total extraída de hígados de los grupos *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-}.

Grupo	Concentración (mg/mL)	mg totales de mitocondrias	mg mitocondrias/mg proteína del homogenado 1	mg mitocondrias/mg de hígado	Peso hígado (gr)	n
<i>Mif</i> ^{+/+}	39.62 ± 7.94	14.58 ± 3.83	8.60 ± 2.29	1.37 ± 0.41	1.09 ± 0.18	5
<i>Mif</i> ^{-/-}	42.66 ± 8.09	13.54 ± 2.60	6.83 ± 1.73	1.17 ± 0.30	1.18 ± 0.12	5

Mif^{+/+}: silvestre control; *Mif*^{-/-}: mutante control; **mg**: miligramos; **g**: gramos; **n**: el número de individuos utilizados.

Evaluación de la mitocondrias aisladas de hígado

Identificación de citocromos por espectros de absorción diferenciales.
Se obtuvo el espectro de absorción diferencial (espectro reducido con ditionita menos el espectro oxidado) de cada preparación de mitocondrias, para determinar la concentración de citocromos *c*, *b* y *a* entre ambos grupos (**fig. 10**).

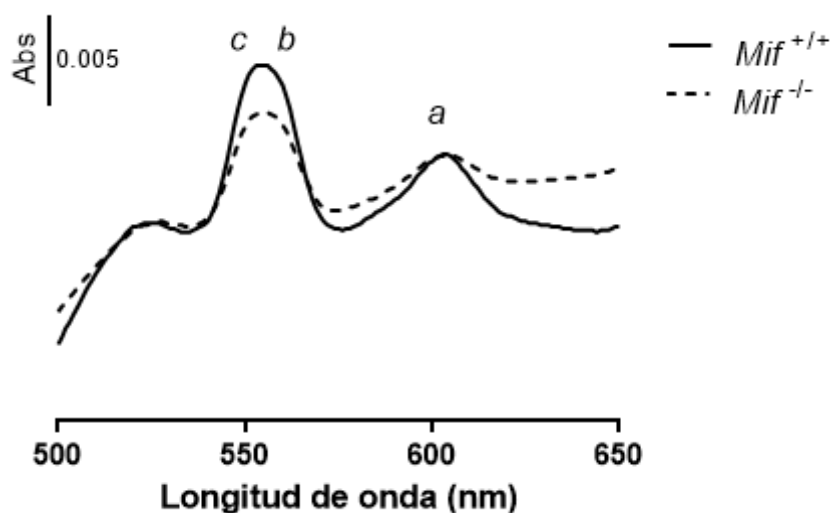


Figura 10. Espectro de absorción diferencial (reducido con ditionita menos oxidado) representativo de las mitocondrias de hígado extraídas de los grupos control *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-} en un rango de 500 a 650 nm. Se observan los picos de absorción de los citocromos *a*= 600 nm, *b*= 560 nm y *c*=550 nm en 1mg de mitocondrias hepáticas.

Comparación de la concentración relativa de citocromos de las mitocondrias obtenidas.

En la **figura 11**, se observan las concentraciones determinadas (nmoles de citocromo/ mg de proteína) de los distintos citocromos en 1 mg de proteína mitocondrial de *Mif*^{+/+} (barras blancas) y de *Mif*^{-/-} (barras grises), se realizaron 5 determinaciones por grupo. Entre los tres tipos de citocromos evaluados no existe diferencia significativa entre los dos grupos de mitocondrias; sin embargo, existe una diferencia significativa en la varianza entre los grupos del citocromo *b* (***p*<0.05) y el citocromo *c* (**p*<0.05). Por otra parte, se observó que las concentraciones de los tres tipos de citocromo varían en el orden *c*>*b*>*a* (siendo mayor la del citocromo *c*, menor que ésta la del citocromo *b* y la más baja la del citocromo *a*).

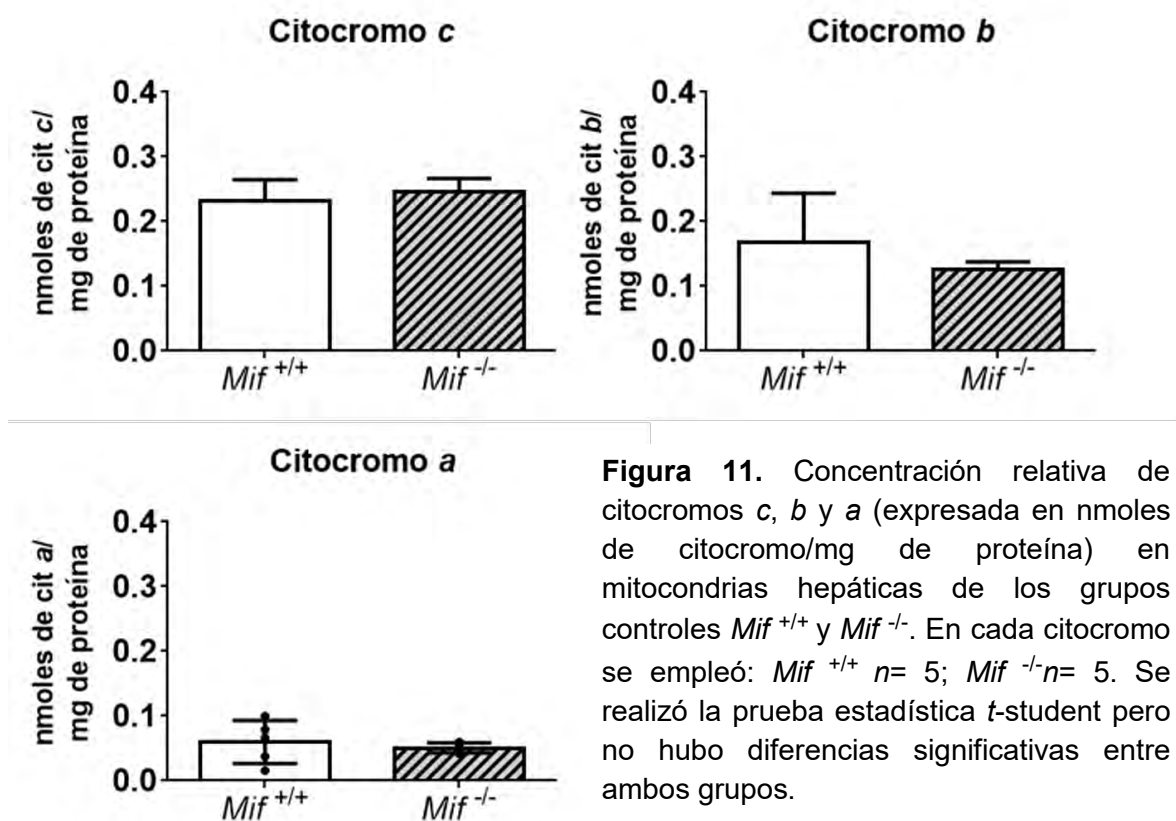


Figura 11. Concentración relativa de citocromos *c*, *b* y *a* (expresada en nmoles de citocromo/mg de proteína) en mitocondrias hepáticas de los grupos controles *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-}. En cada citocromo se empleó: *Mif*^{+/+} *n*= 5; *Mif*^{-/-} *n*= 5. Se realizó la prueba estadística *t*-student pero no hubo diferencias significativas entre ambos grupos.

Como se muestra en la **figura 2**, los citocromos *b* y *c* pertenecen al CIII más el acarreador móvil (citocromo *c*), respectivamente. Mientras el citocromo tipo *a* pertenece al CIV. Para comparar las concentraciones de los citocromos se obtuvieron los cocientes citocromo *b*:*c*, *a*:*c* y *b*:*a* utilizando las concentraciones relativas de cada citocromo (nmoles/mg de proteína) para cada grupo (**tabla 4**). No se obtuvieron diferencias significativas entre los cocientes determinados para los dos grupos. Sin embargo, los cocientes *b*:*c* y *b*:*a* en

Mif^{-/-} disminuyeron con respecto a *Mif*^{+/+}, mientras a:c se mantuvo similar en ambos grupos.

Tabla 4. Cocientes obtenidos para los citocromos *c*, *b* y *a* en mitocondrias hepáticas de los grupos controles *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-}.

Cociente	<i>Mif</i> ^{+/+}	<i>Mif</i> ^{-/-}
b:c	0.73 ± 0.31	0.51 ± 0.05
a:c	0.28 ± 0.16	0.21 ± 0.04
b:a	4.16 ± 2.89	2.54 ± 0.47

Medición de la respiración mitocondrial hepática

La función predominante de la mitocondria es la fosforilación oxidativa, pero también incluye otras funciones como la generación y detoxificación de ROS, la apoptosis, la regulación del calcio en el citoplasma y en la matriz mitocondrial, síntesis y catabolismo de metabolitos y el transporte de estos mismos organelos para la correcta ubicación dentro de la célula. Alguna anomalía en cualquier de estos procesos se le denomina disfunción mitocondrial (Brand y Nicholls, 2011).

El acoplamiento es el flujo de electrones y el bombeo de protones a través de los complejos enzimáticos mitocondriales, esto permite generar la fuerza protón motriz necesaria para la producción de ATP en este organelo (**figura 2**), por lo que para el grado de acoplamiento de las mitocondrias aisladas se realizó el ensayo de oximetría. En la **figura 12** se observan cuatro trazos polarográficos, dos trazos por cada grupo, en cada uno se registraron las nmoles de O₂ consumido contra tiempo (seg) por la adición de cada elemento (mitocondrias y sustratos). Y los valores numéricos corresponden a la velocidad de consumo de oxígeno (nmol O₂ min⁻¹ mg⁻¹). Con los resultados obtenidos de estas determinaciones también se estimó el acoplamiento, que consiste en la relación del estado 3 sobre el estado 4, o control respiratorio (CR). El CR tiene diferentes valores dependiendo el sustrato empleado, en nuestro caso se utilizaron dos sustratos. El primero puede ser glutamato-malato cuyo CR puede ser igual o mayor a 3; el segundo succinato cuyo CR puede ser igual o mayor a 1.5. En ambos casos indica un buen acoplamiento, pero si el valor es por debajo de este rango en uno o ambos sustratos señala una posible

disfunción mitocondrial. Un ejemplo es el grupo *Mif*^{+/+}, en la **figura 12A**, $CR_{G-M}=(25.71)/(7.26)= 3.54$ mientras en la **figura 12C**, $CR_S=(28.29)/(6.6)= 4.28$.

Otra medición de eficiencia obtenida por el electrodo es la relación P:O, que se calcula por la relación de la cantidad conocida de ADP agregado entre el número de átomos de oxígeno consumido durante el Estado 3. Un valor alto indica un proceso más eficiente ya que más ATP está siendo generado con menor consumo de oxígeno.

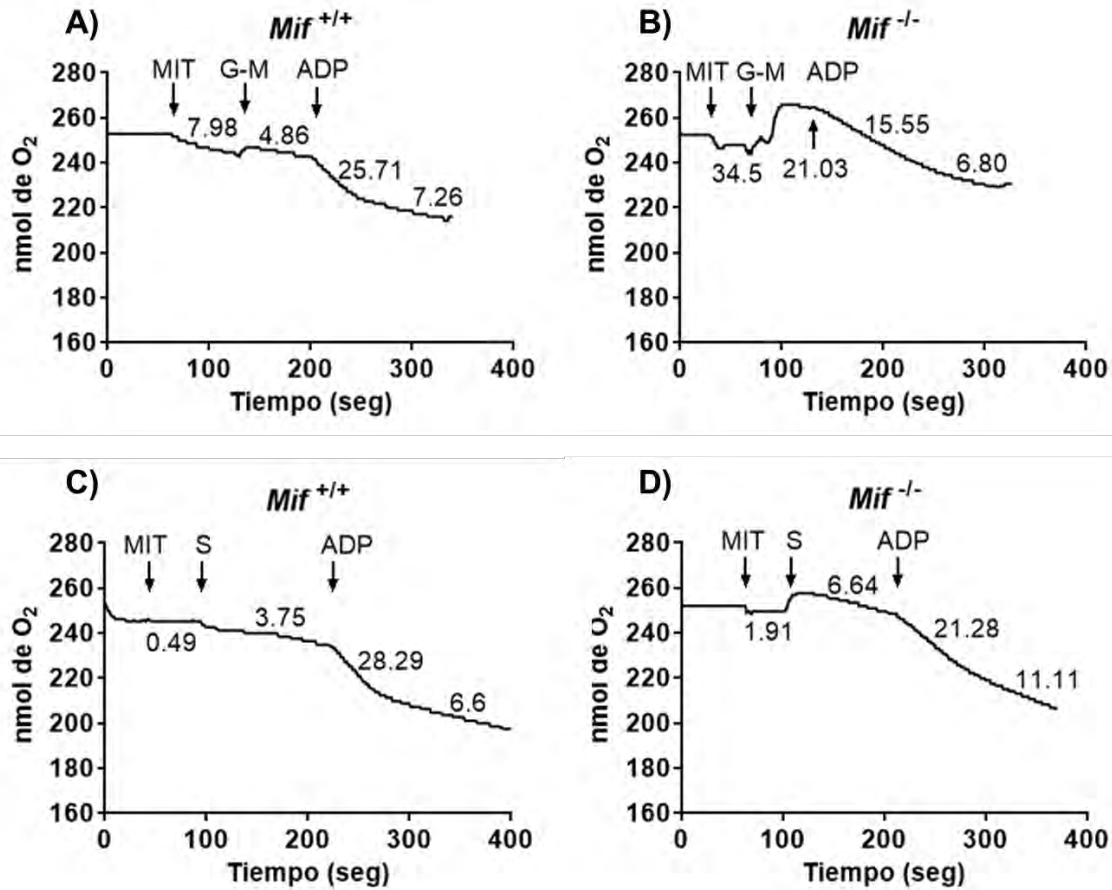


Figura 12. Trazos polarográficos de la respiración de mitocondrias de hígado (1mg) de los grupos *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-} en presencia de 10 mM-5 mM glutamato-malato (**A** y **B**), 5 mM succinato (**C** y **D**) y 100 μM ADP. **MIT**: mitocondrias; **G-M**: glutamato-malato; **S**: succinato; **ADP**: adenosín difosfato. Los valores numéricos corresponden a la velocidad de consumo de oxígeno (nmol O₂ min⁻¹ mg⁻¹).

El análisis de los datos de la velocidad de consumo de oxígeno del estado 3 y del estado 4 del grupo *Mif*^{-/-} (barras con líneas diagonales), no mostró diferencias significativas con respecto al grupo *Mif*^{+/+} (barras blancas) con ninguno de los sustratos utilizados. En el grupo *Mif*^{+/+}, la velocidad de consumo de oxígeno durante síntesis de ATP (estado 3) fue mayor de acuerdo al sustrato, ya que se observó una diferencia significativa cuando se empleó el succinato (**figura 13**), esto es, la velocidad es mayor en CII que en CI. Lo mismo se observó en el grupo *Mif*^{-/-}.

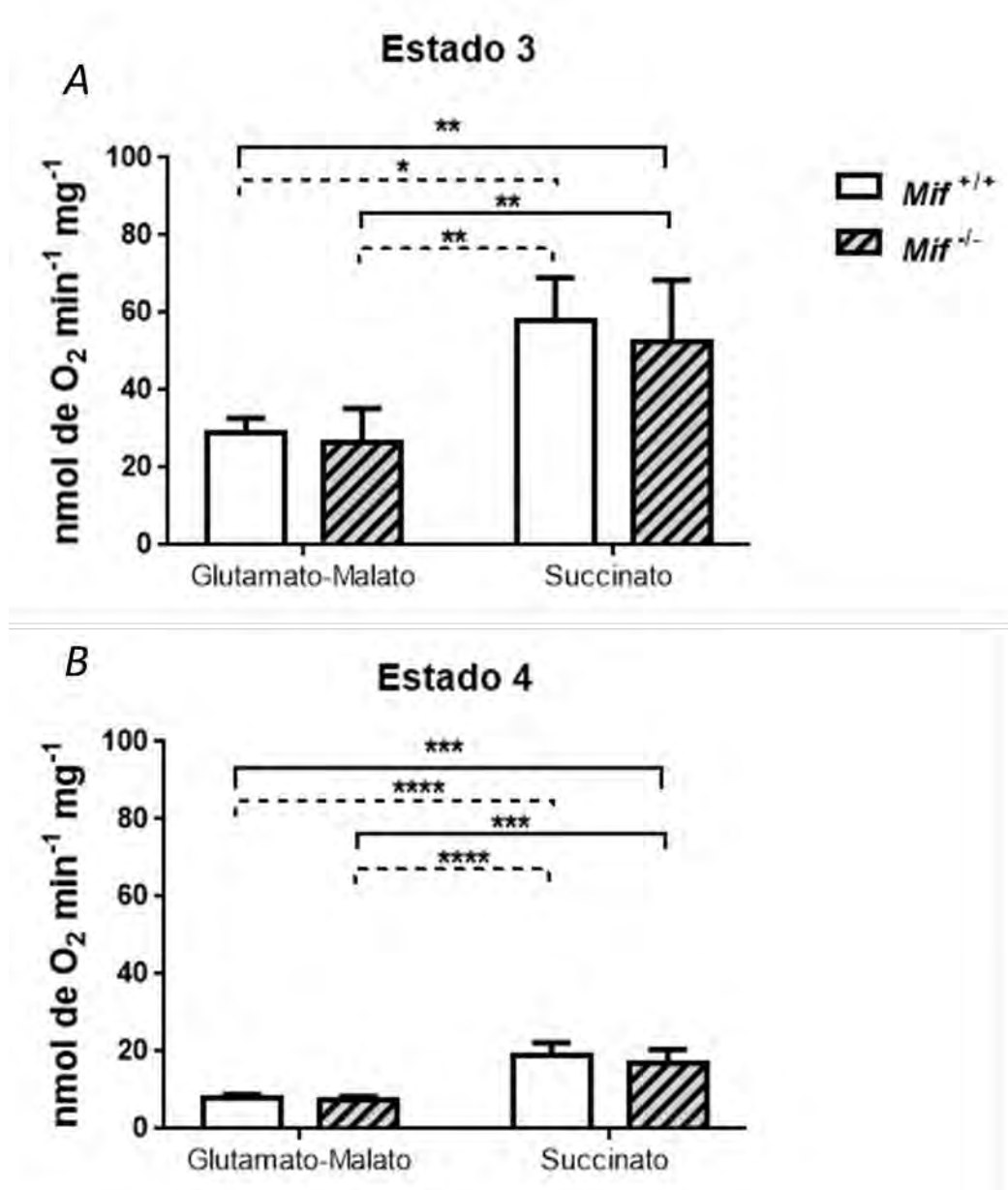


Figura 13. Velocidad de los Estados 3 y 4 de mitocondrias hepáticas de los grupos *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-} en presencia de los diferentes sustratos utilizados. Por cada sustrato se utilizó: *Mif*^{+/+} n= 5; *Mif*^{-/-} n=5. Prueba estadística: ANOVA de dos vías seguido por la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

En la **figura 14A** se muestran los valores de CR para mitocondrias incubadas con G-M y S. Las mitocondrias de *Mif*^{-/-} (barras con líneas diagonales) tuvieron un buen CR con ambos sustratos (G-M: 3.74 ± 0.91 y S: 3.10 ± 0.47). Las mitocondrias del grupo *Mif*^{+/+} (barras blancas) presentaron la misma tendencia de CR (G-M: 3.61 ± 0.41 y S: 3.08 ± 0.41) respecto a *Mif*^{-/-}. La prueba estadística indicó que no hubo diferencias significativas entre los grupos ni entre los sustratos.

Por otro lado, la relación P:O indica la eficiencia con que la ATP sintasa fosforila el ADP añadido por la cantidad de O₂ consumido. En la **figura 14.B**, las barras blancas de la gráfica corresponden a mitocondrias de *Mif*^{+/+} y las barras de rayas diagonales a mitocondrias *Mif*^{-/-}. La P:O no presentó diferencias significativas al comparar ambos sustratos dentro del grupo *Mif*^{+/+}, al alimentar el CI (G-M) se fosforiló 1.68 ± 0.20 nmol de ADP por nanoátomo de O₂ consumido mientras por el CII (S) fue 1.15 ± 0.23 nmol de ADP por nanoátomo de O₂ consumido. La misma tendencia se observó en el grupo *Mif*^{-/-} (G-M: 1.70 ± 0.43 y S: 1.33 ± 0.59 nmol de ADP por nanoátomo de O₂ consumido).

Al comparar entre los dos diferentes sustratos, glutamato-malato y succinato, y los grupos control se encontró una diferencia significativa de la velocidad del estado 3 (G-M *Mif*^{+/+} vs S *Mif*^{+/+}: ** $p=0.0027$; G-M *Mif*^{+/+} vs S *Mif*^{-/-}: * $p=0.1159$; G-M *Mif*^{-/-} vs S *Mif*^{+/+}: ** $p=0.0015$; y G-M *Mif*^{-/-} vs S *Mif*^{-/-}: ** $p=0.0074$) como del estado 4 (G-M *Mif*^{+/+} vs S *Mif*^{+/+}: **** $p<0.0001$; G-M *Mif*^{+/+} vs S *Mif*^{-/-}: *** $p=0.0004$; G-M *Mif*^{-/-} vs S *Mif*^{+/+}: **** $p<0.0001$; y G-M *Mif*^{-/-} vs S *Mif*^{-/-}: *** $p=0.0002$). Con succinato hay una mayor velocidad del estado 3 respecto a glutamato-malato en cada grupo; esto sucedió de igual forma para el estado 4. Sin embargo, el control respiratorio promedio con glutamato-malato (*Mif*^{+/+}: 3.61 ± 0.41 ; *Mif*^{-/-}: 3.74 ± 0.91) fue ligeramente mayor al CR promedio con succinato (*Mif*^{+/+}: 3.08 ± 0.41 ; *Mif*^{-/-}: 3.10 ± 0.47), esto debido a que la velocidad del estado 4 con G-M fue menor a la de succinato; pero no hubo diferencias significativas para el CR. Mientras la P:O utilizando succinato fue ligeramente menor a la cantidad de nmoles de ADP fosforilado; no hubo diferencia significativa.

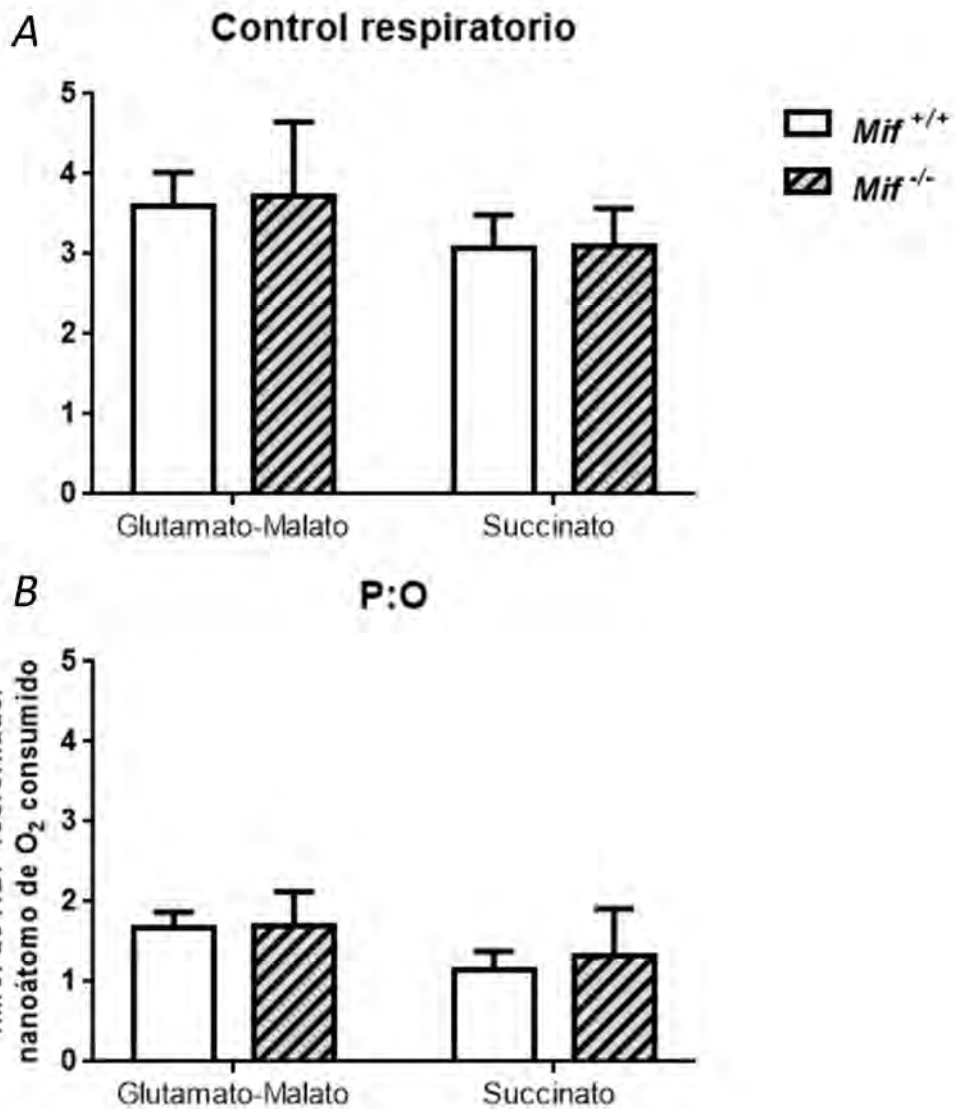


Figura 14. Control respiratorio (A) y P:O (B) en mitocondrias hepáticas de los grupos *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-} en presencia de diferentes sustratos. Por cada sustrato se utilizó: *Mif*^{+/+} n= 5; *Mif*^{-/-} n=5. Prueba estadística: ANOVA de dos vías seguido por la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

Medición de la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales

En la **figura 15** se muestran los trazos representativos de oximetría para la medición de la actividad de los cuatro complejos de la ETC con 1 mg de mitocondrias, las mismas que se aislaron para CR de *Mif*^{+/+} (**fig. 15-1**) y de *Mif*^{-/-} (**fig. 15-2**). Estas mitocondrias se congelaron y almacenaron a -70 C para su uso posterior. Del lado izquierdo se muestran los trazos polarográficos cuyos ejes representan: nmol de O₂ consumido (eje Y) contra tiempo (seg; eje X). De la parte inferior de la figura, se muestra una tabla con los símbolos, nombres y concentraciones utilizadas de cada sustrato o inhibidor añadidos. Además de las velocidades de consumo de oxígeno por minuto por mg de proteína utilizada (nmol O₂ min⁻¹ mg⁻¹).

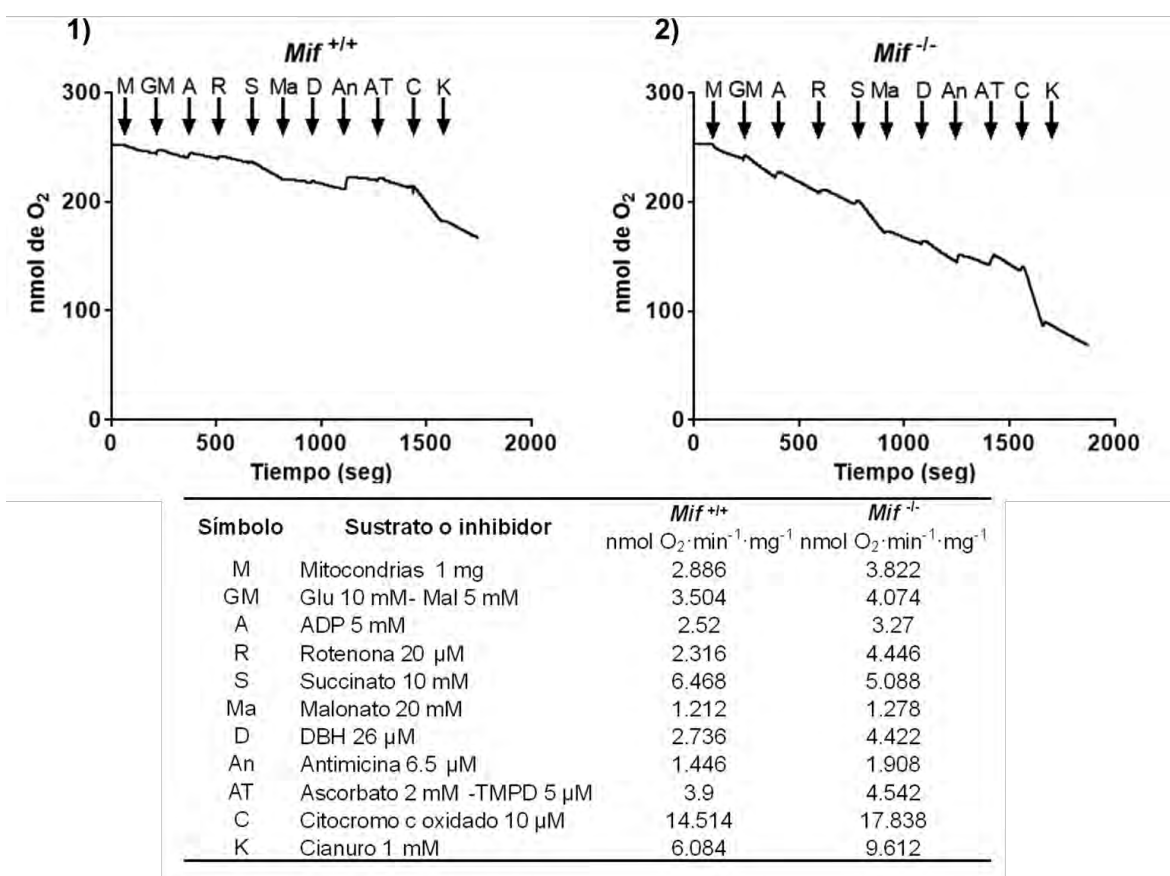


Figura 15. Trazos polarográficos representativos de los complejos respiratorios mitocondriales de hígado (1 mg de proteína) del grupo *Mif*^{+/+} (1) y *Mif*^{-/-} (2). En cada tabla se muestra los sustratos (M, GM, A, S, D, AT y C) e inhibidores (R, Ma, An y K) con sus respectivas concentraciones y velocidades de consumo de oxígeno (nmol O₂ min⁻¹ mg⁻¹).

En la **figura 16.**, se muestra la comparación de la velocidad ($\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) de actividad obtenida para los cuatro complejos mitocondriales comparados entre *Mif*^{+/+} (barras blancas) y *Mif*^{-/-} (barras de líneas diagonales). Los CI, CIII y CIV en *Mif*^{-/-} tuvieron una ligera disminución en la velocidad de actividad respecto a su contraparte en *Mif*^{+/+}, sin diferencias significativas. Sin embargo, el CII en *Mif*^{-/-} tuvo una mayor actividad en comparación a *Mif*^{+/+} alcanzando una diferencia significativa (** $p < 0.05$) como se muestra en la **figura 12.**

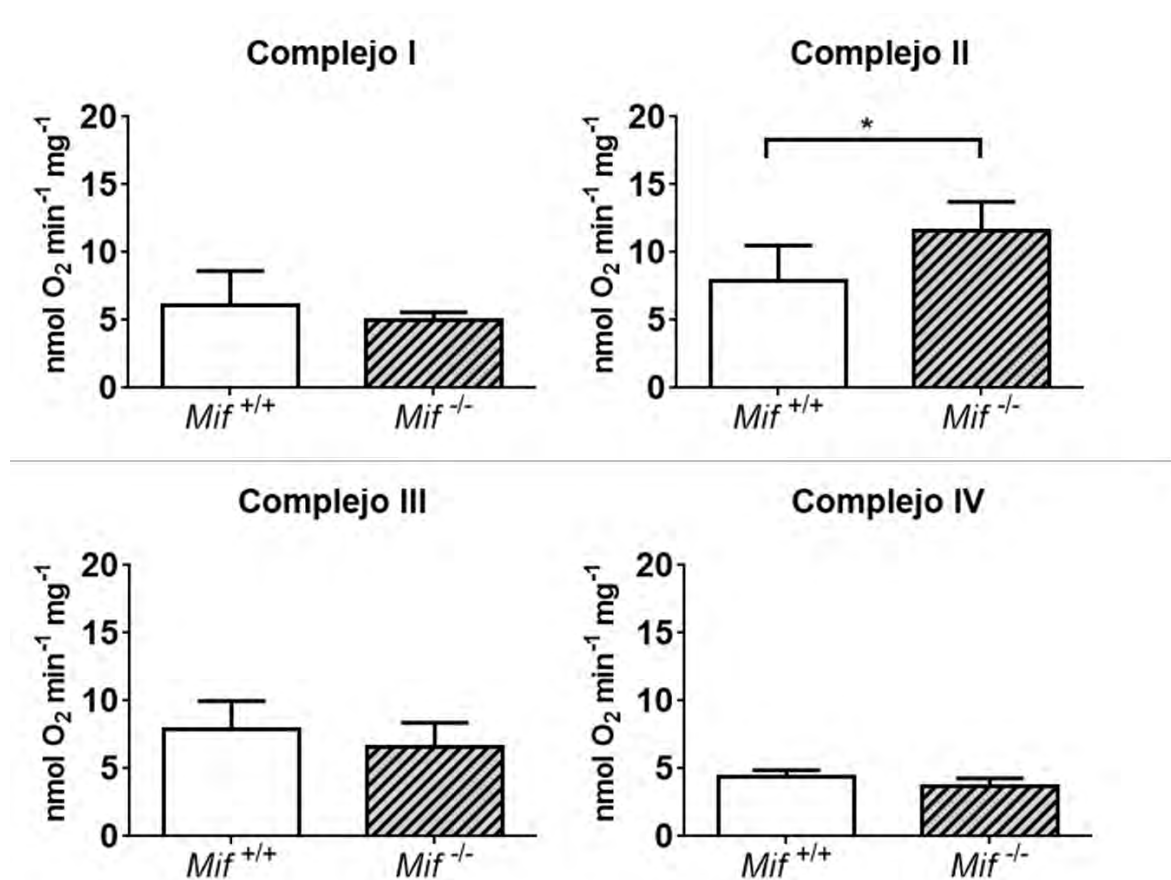


Figura 16. Actividad de los complejos respiratorios mitocondriales en hígado de los grupos controles *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-} en presencia de diferentes sustratos. Por cada complejo se utilizó: *Mif*^{+/+} $n = 5$; *Mif*^{-/-} $n = 5$. Se realizó la prueba estadística: *t*-student (* $p < 0.05$).

DISCUSIÓN

Peso corporal e hígado

De acuerdo a los parámetros físicos, el grupo mutante no presentó diferencia alguna entre el peso corporal y el peso del hígado respecto al grupo silvestre, esto se refleja en la relación PH/PC cuyo valor fue de 0.05 en ambos grupos. Esto indica que la ausencia de MIF no tuvo efecto en el tamaño del hígado.

Histología del hígado

El hígado posee la capacidad de responder rápidamente a una variedad de estímulos nocivos (patógenos y xenobióticos) con el fin de mantener su masa y funcionalidad normal. En este trabajo, aunque el grupo mutante *Mif*^{-/-} no fue tratado con algún patógeno o tóxico (únicamente no se expresa el gen *Mif*), se observaron algunos cambios que sugieren una adaptación a su condición genética.

En este trabajo se encontró que los cambios en el hígado del grupo mutante (*Mif*^{-/-}), principalmente en los hepatocitos, se pueden evaluar como una hepatitis necrótica moderada multifocal cuya consecuencia es la regeneración hepática (RH).

La regeneración hepática se ha comprendido principalmente con el uso de la hepatectomía parcial (eliminación del 70% de la masa hepática por cirugía). Se ha observado que 1 a 3 días después de practicar la hepatectomía se produce un pico de síntesis de ADN en las células no parenquimales del hígado (en orden de mayor a menor grado de participación: células de Ito, células de Kupffer y células sinusoidales) (Clària y Titos, 2003). En nuestro estudio la regeneración hepática fue evidente en los hepatocitos ya que los hepatocitos hipertróficos (cariomegalia y citomegalia) y los microhepatocitos se consideraron como indicadores de la división celular. Al mismo tiempo, hubo hepatocitos necróticos (picnosis y cariolisis). Aunado a esto, identificamos proliferación de las células Kupffer, proceso biológico que también se ha identificado en la RH.

En nuestro estudio no evaluamos las células de Ito debido a su tamaño y a que son difíciles de identificar con tinción convencional y por microscopía óptica. En cuanto a las células sinusoidales no mostraron cambios.

En este trabajo los cambios que encontramos en las células de Kupffer son compatibles con los que se ha descrito para estas células en la RH. La función de las células de Kupffer en la RH es producir factores de crecimiento tanto estimuladores como inhibidores de la síntesis de ADN y la proliferación de los hepatocitos, algunos de estos factores son: el factor de crecimiento de los hepatocitos (*Hepatocyte growth factor*, siglas en inglés: HGF), el factor de crecimiento de la insulina (*Insuline growth factor*, siglas en inglés: IGF) y el factor de unión de la heparina (*Heparin-binding growth factor*, siglas en inglés: HBGF) (Clària y Titos, 2003). Esto explica que en los ratones *Mif*^{-/-} se observen células de Kupffer de tamaño grande y pequeño. En cuanto a la proliferación de estas células consideramos que podría estar relacionada con la heterogeneidad morfológica y funcional que se ha descrito en la RH en ésta se mencionan dos poblaciones: pequeñas e inmaduras y grandes maduras. Así, los macrófagos de mayor tamaño y de mayor madurez poseen mayor capacidad fagocítica y actividad lisosomal; producen más TNF- α , IL-1 y PGE₂; generan menor cantidad de anión superóxido que las células de la región centrolobulillar (Clària y Titos, 2003); además poseen mayor capacidad proliferativa, y se localizan en la región periportal. Por el contrario, los macrófagos de menor tamaño e inmaduros son más susceptibles a ser activados, liberan mayores cantidades de óxido nítrico y anión superóxido y presentan mayor actividad citotóxica contra células tumorales (Clària y Titos, 2003).

De los abundantes cúmulos de células inflamatorias que se observaron en la región portal de los individuos *Mif*^{-/-}, sugerimos que podrían corresponder a células de Kupffer reactivas, en este sitio podrían estar participando en la RH ya que liberan factores de crecimiento y se ha descrito que la proliferación de los hepatocitos progresa desde las áreas periportales a la áreas pericentrales del lobulillo (Cienfuegos *et al.*, 2014).

La necrosis observada en el grupo mutante es del tipo multifocal, es decir, se encuentra en diferentes regiones del tejido hepático. La necrosis es consecuencia de un daño metabólico que conlleva a la depleción del ATP y a la disminución drástica del contenido energético, que resulta en el hinchamiento y la lisis del hepatocito, lo que conduce a la liberación masiva del contenido intracelular y a una inflamación (Kindt *et al.*, 2007). Por tanto como en otros órganos que tienen necrosis, ésta se asocia con inflamación esto explica la presencia de neutrófilos en algunos individuos.

A final de cuentas el hígado mutante enfrenta dos procesos de pérdida de masa hepática: por necrosis y por apoptosis, por tanto es lógico pensar que se desencadenen procesos de regeneración que presenten una fenomenología morfológica y funcional semejante a la que se han descrito en la RH.

La RH observada en el grupo mutante fue evidente debido a que observamos cariomegalia y citomegalia; hepatocitos binucleados; hepatocitos pequeños y hepatocitos en división.

La cariomegalia y citomegalia se interpretaron como procesos de preparación a la citocinesis. Algunos autores señalan que estos procesos son reflejo de la poliploidía (el aumento del número cromosómico) del hepatocito, y ocurren cuando hay duplicación del material nuclear en ausencia de la citocinesis, es decir, el hepatocito entra en fase S (de síntesis) para duplicarse (mitosis) (Cienfuegos *et al*, 2014); únicamente el grupo mutante presentó este proceso. Consideramos que aquellos hepatocitos de tamaño menor al promedio pueden corresponder a hepatocitos resultantes de citocinesis.

Por otra parte, la esteatosis es la acumulación de lípidos dentro de la célula, este mecanismo es reversible, y generalmente se presenta en pacientes con NALD y obesidad. La acumulación de lípidos en el hígado resulta de una pérdida del balance entre la captación, la síntesis, la salida y la oxidación de los ácidos grasos libres (Wolpert y Kershenobich., en línea). La presencia de esteatosis se presentó en el grupo mutante, lo cual sugiere que hay un desbalance en el procesamiento de lípidos, generando estrés oxidativo.

El infiltrado celular por neutrófilos en zonas portales, cordones hepáticos y venas centrales indican inflamación en el hígado del grupo *Mif*^{-/-}. Los neutrófilos son los primeros leucocitos en llegar al sitio de inflamación, debido a un proceso de quimiotaxis, su función es fagocitar al agente patógeno aunque mueran inmediatamente después de la ingesta; son abundantes y responsables de la mayor parte de una respuesta inmune (Kindt *et al.*, 2007). Lo que seguramente atrae a este tipo celular son los restos celulares de los hepatocitos muertos producto de la necrosis dentro del hígado del grupo *Mif*^{-/-}.

En los hígados de los individuos mutantes en los que hay procesos de muerte e inflamación es muy probable que las mitocondrias estén alteradas (desbalanceadas) por lo que se esperaría que en las mitocondrias de estos individuos el control respiratorio disminuyera.

Control respiratorio de mitocondrias hepáticas

Cada sustrato utilizado para la medición del consumo de oxígeno actúa sobre diferentes enzimas localizadas en la membrana interna como en la matriz mitocondrial para proveer de electrones a la cadena respiratoria y poder generar el gradiente electroquímico de protones para la síntesis de ATP. En el caso del glutamato – malato, su oxidación en α -cetoglutarato y oxalacetato respectivamente, se produce NADH el cual es oxidado a NAD^+ por el CI en el Ciclo de Krebs que ocurre en la matriz mitocondrial. El succinato se transforma a fumarato produciendo FADH_2 que la SDH (CII) oxida a FAD^+ (Nelson y Cox, 2008; Raju y Raju, 2010). De acuerdo a los resultados, el grupo *Mif*^{-/-} presentó mitocondrias con control respiratorio por las dos vías de entrada de electrones, semejante al del grupo *Mif*^{+/+}.

Las diferencias significativas del estado 3 y estado 4 entre los sustratos de cada grupo se deben a la estequiometría de la fosforilación oxidativa. Por cada par de electrones de NADH reducido, se sintetizan 3 equivalentes de ATP ya que los electrones fluyen a través de los CI, CIII y CIV los cuales generan la fuerza motriz. Los electrones donados por succinato fluyen por los CII, CIII y CIV generando 2 moles de ATP por mol de succinato oxidado (Raju y Raju, 2010). Por lo que con succinato, la mitocondria le tomará más tiempo y más oxígeno para convertir el ADP en ATP ya que el CII no bombea protones.

Por otra parte, los valores de CR mitocondrial de *Mif*^{-/-} fueron con G-M de 3.74 ± 0.91 y con S de 3.10 ± 0.47 , valores que indican un buen acoplamiento de la cadena respiratoria. Sin embargo, no hubo diferencia significativa.

Actividad de los complejos enzimáticos mitocondriales en hígado

Se encontró diferencia significativa en la actividad del CII en la mutante. El CII se encuentra asociado al ciclo de Krebs además de la cadena respiratoria. Comparativamente, la actividad del CII fue mayor a la del CI en el grupo *Mif*^{-/-} por lo que

pensamos que la actividad del complejo II se incrementó como una forma de compensación debido a que el complejo CI no incrementó su actividad en el mutante. Otra explicación es que la acumulación de lípidos (esteatosis) presente en los hígados *Mif*^{-/-} este afectando la β -oxidación, es decir, no se produce NADH y por esto mismo la actividad del CI no aumentó; esto se observó también en las velocidades del estado 3 con glutamato-malato respecto a succinato.

La explicación que encontramos entre la estructura y la fisiología del hígado en *Mif*^{-/-} en esta cepa BALB/c adulta es que la interrupción del gen *Mif* deja susceptible al hígado al daño celular y a la inflamación provocando la regeneración hepática. Aunque las evidencias histológicas en el hígado *Mif*^{-/-} mostraron la existencia de muerte celular e inflamación por lo que en un principio se pensó que la mitocondria estaría desbalanceada y que el control respiratorio disminuyera en las mitocondrias aisladas. Sin embargo, este no fue el caso, por lo que pensamos que debido a la RH presente, ésta promovió la proliferación de hepatocitos y de células de Kupffer y las mitocondrias estudiadas mostraron buen CR. Además de la duplicación de la cromatina en la RH, también se duplican los organelos citoplasmáticos- mitocondrias, aparato de Golgi, lisosomas, retículo endoplásmico- necesarios para preservar la función hepática (Cienfuegos *et al*, 2014). Este aumento de organelos pudo ser la manera de compensar el daño producido por la pérdida de *Mif*. La **figura 17** muestra un resumen de lo que pensamos que sucede en el hígado mutante y en las mitocondrias de este hígado.

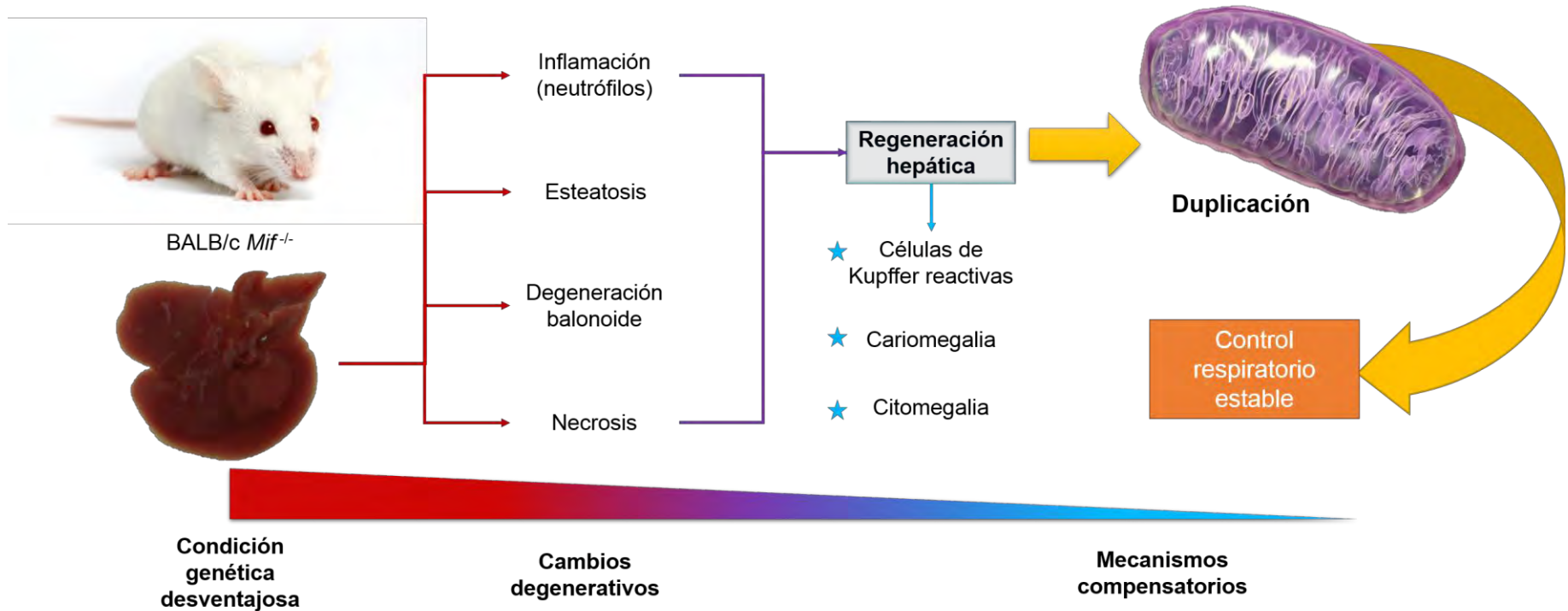


Figura 17. Esquema que resume la relación entre los eventos histológicos y la función mitocondrial en el hígado de los ratones *Mif*^{-/-}.

El presente estudio se realizó para poder tener una comparación de lo que sucede en organismos deficientes en MIF con respecto a los ratones silvestres. Este estudio es parte de un análisis con animales que fueron inducidos para padecer diabetes mellitus tipo 2. En el apéndice que a continuación se presenta, mostramos algunos de los resultados obtenidos al mismo tiempo. Decidimos integrarlo como un apéndice ya que consideramos que era necesario describir con claridad lo que ocurría en el hígado y las mitocondrias de los ratones *Mif*^{-/-}.

CONCLUSIONES

- La ausencia de la expresión de MIF tuvo un efecto negativo a nivel de hígado por el daño tisular presente, principalmente necrosis (picnosis y cariólisis) e inflamación (infiltrado celular por neutrófilos), generando una hepatitis moderada multifocal. Este daño tuvo como consecuencia una regeneración hepática a una edad adulta del ratón.
- Las mitocondrias de los hígados *Mif*^{-/-} presentaron un buen control respiratorio y se observó un aumento significativo en la velocidad de actividad en el complejo II mitocondrial.
- La regeneración hepática ante el daño tisular provoca que la respiración mitocondrial se vea compensada.

Perspectivas

- Cuantificación de los complejos enzimáticos mitocondriales mediante geles nativos.
- Medición de enzimas involucradas en sistema antioxidante como la superóxido dismutasa, la catalasa y la glutatión debido a la presencia de esteatosis.
- Identificación y evaluación de mitocondrias en el tejido hepático del grupo *Mif*^{-/-} por la tinción de Cain o Mitochondria Green.
- Identificación de proteínas clave (en procesos celulares como: fases del ciclo celular, mitosis, necrosis y apoptosis) al igual que células participantes (las células de Kupffer maduras e inmaduras*) en la regeneración hepática mediante “Western blot” e inmunohistoquímica en el grupo *Mif*^{-/-}.
- En la observación del infiltrado celular por neutrófilos y la proliferación de células de Kupffer son evidencia de que parte de la respuesta inmune posiblemente esté alterada por lo que sería importante medir otros parámetros que muestren la condición general/total de la respuesta inmune del hígado del ratón *Mif*^{-/-}.

*Para valorar la presencia y comportamiento de las subpoblaciones de este tipo celular sería preciso realizar un marcaje con la esterasa no específica y ED2, la intensidad de la tinción se muestra heterodénea. La intensidad del marcaje disminuye proporcionalmente al tamaño celular.

REFERENCIAS

- Abbas A.K. Lichtman A. H. y Pober J. S. Inmunología celular y molecular. 5ta ed Sanunders-Elsevier. (2004). ISBN 978-84-817-4710-2
- Akbar, S. M., Abe, M., Murakami, H., *et al.* (2001) Macrophage migration inhibitory factor in hepatocellular carcinoma and liver cirrhosis; relevance to pathogenesis, *Cancer Lett*, **171**, 125-132.
- Akyildiz, M., Gunsar, F., Nart, D., *et al.* (2010) Macrophage migration inhibitory factor expression and MIF gene -173 G/C polymorphism in nonalcoholic fatty liver disease, *Eur J Gastroenterol Hepatol*, **22**, 192-198.
- Alberts, Bruce; Bray, Dennis; Hopkin, Karen; Johnson, Alexander; Lewis, Julian; Raff, Martin; Roberts, Keith; Walter, Peter. *Introducción a la Biología Celular*. 3a ed. México: Editorial Médica Panamericana 2011. ISBN 978-607-7743-18-7.
- Bacher, M., Meinhardt, A., Lan, H. Y., *et al.* (1997) Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia, *Am J Pathol* **150**, 235-246.
- Banasch, M., Ellrichmann, M., Tannapfel, A., *et al.* (2011) The non-invasive 13C-methionine breath test detects hepatic mitochondrial dysfunction as a marker of disease activity in non-alcoholic steatohepatitis, *Eur J of Med Resear*, **16**, 258–264.
- Baugh, J. A., Chitnis, S., Donnelly S. C., *et al.* (2002) A functional promoter polymorphism in the macrophage migration inhibitory factor (MIF) gene associated with disease severity in rheumatoidarthritis. *Genes Immun* **3**(3):170–176.
- Benigni, F., Atsumi, T., Calandra, T., *et al.* The proinflammatory mediator macrophage migration inhibitory factor induces glucose catabolism in muscle. *J Clin Invest*. **106**, 1291–300.
- Bernhagen J, Calandra, T., Mitchell, R. A., *et al.* (1993) MIF is a pituitary-derived cytokine that potentiates lethal endotoxaemia. *Nature* **365**, 756–759.
- Bernhagen, J., Krohn, R., Lue, H., *et al.* (2007) MIF is a noncognate ligand of CXC chemokine receptors in inflammatory and atherogenic cell recruitment, *Nat Med* **13**, 587-596.
- Brand, M.D. y Nicholls, D.G. (2011) Assessing mitochondrial dysfunction in cells. *Biochem J* **435**, 297-312.
- Calandra T, Echtenacher, B., Roy, D.L., *et al.* (2000) Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nat Med* **6**, 164–170.
- Calandra T. y Roger T. (2003) Macrophage migration inhibitory factor: A regulator of innate immunity. *Nat Rev Immunol* **3**,791–800.

- Calandra, T., Bernhagen, J., Mitchell, R. A. y Bucala, R. (1994) The macrophage is an important and previously unrecognized source of macrophage migration inhibitory factor, *J Exp Med* **179**, 1895-1902.
- Chan, D. C. (2006) Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* **125**, 1241–1252.
- Cienfuegos, J. A., Rotellar, F., Baixauli, J., *et al.* (2014) Regeneración hepática; el secreto mejor guardado. Una forma de respuesta al daño tisular. *Rev Esp Enferm Dig* **106**,171-179.
- Clària, J. y Titos, E. (2004) La célula de Kupffer. *Gastroenterol Hepatol* **27**, 264-273.
- de Vrij, W., van den Burg, B., y Konings, W. N. (1987) Spectral and potentiometric analysis of cytochromes from *Bacillus subtilis*. *Eur J Biochem* **166**, 589-95.
- Degli E. M., Tsai, L. A., Palmer, G. y Lenaz, G. (1986) On the oxidation pathways of the mitochondrial bc₁ complex form beef heat effects of various inhibitors. *J Biol Chem* **160**, 547-555.
- Figueira, T. R., Barros M. H., Camargo A. A., *et al.* (2013) Mitochondria as a source of reactive oxygen and nitrogen species: from molecular mechanisms to human health. *Antioxid Redox Signal.* **18**, 2029-74. Review.
- Frezza, C., Cipolat, S. y Scorrano, L. (2007) Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat Protoc* **2**, 287-95.
- Glick B. S. y Pon L. A. (1995) Isolation of highly purified mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Meth Enzymol* **260**, 213-23.
- Gregor M. F. y Hotamisligil G. S. (2011) Inflammatory mechanisms in obesity. *Annu Rev Immunol* **29**, 415-45. Review.
- Hamanaka, R. y Chandel, N. (2010) Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem Sci* **35**, 505-13. Review.
- Heinrichs, D., Knäuel, M., Offermanns, C., *et al.* (2011) Macrophage migration inhibitory factor (MIF) exerts antifibrotic effects in experimental liver fibrosis via CD74. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 7444-9.
- Hernández-Aguilera A., Rull, A., Rodríguez-Gallego, E., *et al.* (2013) Mitochondrial dysfunction: a basic mechanism in inflammation-related non-communicable diseases and therapeutic opportunities. *Mediators Inflamm* **2013**, 1-13.

- Hirokawa, J., Sakaue, S., Tagami, S., *et al.* (1997) Identification of macrophage migration inhibitory factor in adipose tissue and its induction by tumor necrosis factor- α . *Biochem Biophys Res Commun* **235**,94–8.
- Hori, Y., Sato, S., Yamate, J., *et al.* (2003) Immunohistochemical study of macrophage migration inhibitory factor in rat liver fibrosis induced by thioacetamide. *Eur J Histochem* **47**, 317-324.
- Kindt, Thomas J; Goldsby, Richard A; Osborne, Barbara A. *INMUNOLOGÍA de Kuby*. 6ta ed. México: McGraw-Hill Interamericana, 2007 ISBN 13: 978-970-10-64545-2
- Kleemann, R., Kapurniotu, A., Frank, R. W., *et al.* (1998) Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as thiol-protein Oxidoreductase. *J Mol Biol* **280**, 85-102.
- Kumagi, T., Akbar, F., Horiike, N. y Onji, M. (2001) Increased serum levels of macrophage migration inhibitory factor in alcoholic liver diseases and their expression in liver tissues. *Clin Biochem* **34**, 189-193.
- Kuntz, Erwin; Kuntz, Hans-Dieter. *Hepatology Textbook and Atlas*. 3er ed. Alemania: Springer Medizin Verlag. 2008. ISBN 978-540-76838-8
- Kunz, W. S., Kuznetsov, A. V., Schulze, W., *et al.* (1993) Functional characterization of mitochondrial oxidative phosphorylation in saponin-skinned human muscle fibers. *Biochem Biophys Acta* **1144**(1):46-53.
- Lalor, P. F. y Adams, D. H. (2002) The liver, a model of organ-specific lymphocyte recruitment. *Expert Rev Mol Med* **4**, 1-16.
- Liu, A., Fang, H., Dirsch, O., Jin, H., y Dahmen, U. (2012) Early release of macrophage migration inhibitory factor after liver ischemia and reperfusion injury in rats. *Cytokine* **57**, 150-157.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J of Biol Chem* **193**, 265-275.
- Lue, H., Kleemann, R., Calandra, T., Roger, T. y Bernhagen, J. (2002) Macrophage migration inhibitory factor (MIF): mechanisms of action and role in disease. *Microbes Infect* **4**, 449-460.
- Markwell, M. A., Haas, S. M., Bieber, L. L y Tolbert, N. E. (1978) A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* **87**, 206-210.
- Miller, E. J., Li, J., Leng, L., *et al.* (2008) Macrophage migration inhibitory factor stimulates AMP-activated protein kinase in the ischaemic heart. *Nature* **451**, 578–582.

- Morand, E. F., Leech, M. y Bernhagen, J. (2006) MIF: A new cytokine link between rheumatoid arthritis and atherosclerosis. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 399–410.
- Morrison, M.C. y Kleemann, R. (2015) Role of Macrophage Migration Inhibitory Factor in Obesity, Insulin Resistance, Type 2 Diabetes, and Associated Hepatic Co-Morbidities: A Comprehensive Review of Human and Rodent Studies. *Front Immunol* **6**, 308. Review.
- Nakajima, H., Takagi, H., Horiguchi, N., *et al.* (2006) Lack of macrophage migration inhibitory factor protects mice against concanavalin A-induced liver injury. *Liver Int* **26**, 346-351.
- Nanji, A. A., Lau, G. K., Tipoe, G. L., *et al.* (2001) Macrophage migration inhibitory factor expression in male and female ethanol-fed rats. *J Interferon Cytokine Res* **21**, 1055-1062.
- Nelson, David L.; Cox, Michael M.; Lenhinger Principios de bioquímica. 4ta ed. España: OMEGA. 2008. ISBN 978-84-282-1410-0
- Obre, E. y Rossignol, R. (2015) Emerging concepts in bioenergetics and cancer research: metabolic flexibility, coupling, symbiosis, switch, oxidative tumors, metabolic remodeling, signaling and bioenergetic therapy. *Int J Biochem Cell Biol* **59**,167-81. Review.
- Organización Mundial de la Salud [Revisado el 22 de mayo 2015] En línea: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs355/es/>
- Puente-Maestu, L., Lázaro, A. y Humanes, B. (1985). Metabolic derangements in COPD muscle dysfunction. *J Appl Physiol* **114**, 1282-1290. Review.
- Raju, SM; Raju, Bindu. Illustrated Medical Biochemistry. 2da ed. Kundali: Jaypee. 2010. ISBN 978-818448-872-2
- Rosengren, E., Bucala, R., Aman, P., *et al.* (1996) The immunoregulatory mediator macrophage migration inhibitory factor (MIF) catalyzes a tautomerization reaction. *Mol Med* **2**, 143-149.
- Sakaue, S., Nishihira, J., Hirokawa, J., *et al.* (1999) Regulation of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression by glucose and insulin in adipocytes in vitro. *Mol Med* **5**, 361–71.
- Sánchez-Zamora, Y., Terrazas, L.I., Vilches-Flores, A., *et al.* (2010) Macrophage migration inhibitory factor is a therapeutic target in treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *FASEB J* **24**, 2583-90.
- Schober, A., Bernhagen, J. y Weber, C. (2008) Chemokine-like functions of MIF in atherosclerosis. *J Mol Med (Berl)* **86**, 761–770.
- The Jackson Laboratory. MOUSE STRAIN DATASHEET – 003830 C.129S4(B6)-Miftm1Dvd/J [en línea] <https://www.jax.org/strain/003830> [Consulta 25 abril 2016]

- Thoolen, B., Maronpot, R.R., Harada, T., *et al.* (2010) Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse hepatobiliary system. *Toxicol Pathol* **38**(7 Suppl):5S-81S. Review.
- Toso, C., Emamaullee, J.A., Merani, S. y Shapiro, A. M. (2008) The role of macrophage migration inhibitory factor on glucose metabolism and diabetes. *Diabetologia* **51**, 1937-46. Review.
- Verschuren, L., Kooistra, T., Bernhagen, J., *et al.* (2009) MIF deficiency reduces chronic inflammation in white adipose tissue and impairs the development of insulin resistance, glucose intolerance, and associated atherosclerotic disease. *Circ Res* **105**, 99–107.
- Waeber, G., Calandra, T., Roduit, R., *et al.* (1997) Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet beta cell macrophage migration inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 4782–4787.
- Ye, J. y Keller J. N. (2010) Regulation of energy metabolism by inflammation: a feedback response in obesity and calorie restriction. *Aging (Albany NY)* **2**, 361-368. Review.
- Yu, C. A. y King, E. (1972) Preparation and properties of cardiac cytochrome c₁. *J Biol Chem* **247**, 1012-1019.
- Zernecke, A, Bernhagen J. y Weber C. (2008) Macrophage migration inhibitory factor in cardiovascular disease. *Circulation* **117**, 1594–1602.
- Zhang, H. Y., Nanji, A. A., Luk, J. M., *et al.* (2005) Macrophage migration inhibitory factor expression correlates with inflammatory changes in human chronic hepatitis B infection. *Liver Int* **25**, 571-579.
- Zimmermann Grant R. Migration inhibitory factor (MIF) knockout mouse [en línea] <http://otd.harvard.edu/explore-innovation/technologies/migration-inhibitory-factor-mif-knockout-mouse/> [Consulta 25 abril 2016]

APÉNDICE

EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE MIF EN LA FUNCIÓN MITOCONDRIAL HEPÁTICA EN UN MODELO MURINO DE DIABETES MELLITUS.

RESUMEN

El hígado regula la homeostasis de la glucosa mediante la gran cantidad de mitocondrias (500-4000 por hepatocito) que tiene para satisfacer la demanda energética. La diabetes mellitus se caracteriza por la presencia de hiperglicemia, consecuencia de defecto en la secreción y/o en la acción de la insulina. El daño hepático es característico en los pacientes diabéticos. En la diabetes mellitus tipo 2, los pacientes presentan niveles plasmáticos altos del factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) en comparación con pacientes sanos. MIF es una citocina pro-inflamatoria cuya delección reduce la producción significativa de citocinas inflamatorias, como TNF- α , IL-1 β e IL-12 e impacta en una reducción significativa de la patología en la diabetes (Sánchez *et al*, 2010). El objetivo de este trabajo fue evaluar los cambios o alteraciones de la cadena respiratoria del tejido hepático en un modelo murino de diabetes mellitus tipo 2 (DMT2) ante la ausencia de MIF. Se aislaron las mitocondrias de hígado y se obtuvo el control respiratorio y la actividad de los complejos respiratorios por oximetría.

Palabras Clave: Diabetes Mellitus Tipo 2, estreptozotocina, MIF, mitocondrias hepáticas.

METODOLOGÍA

El biomodelo de DMT2 inducido por estreptozotocina (STZ) simula la patología de DMT2 ya que la molécula STZ, análogo a la glucosa, es específica y actúa únicamente en las células beta pancreáticas, se introduce a estas células y comienza a reaccionar en el DNA donde se genera una respuesta tóxica, esto origina muerte celular (Szkudelski, 2012).

En nuestro caso, se utilizaron ratones BALB/c silvestres y deficientes en la expresión de MIF, de 6-7 semanas de edad (previamente genotipificados) de los cuales se seleccionaron grupos control (*Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-}) y tratado con STZ (*Mif*^{+/+} STZ y *Mif*^{-/-} STZ) de cada grupo. Los ratones silvestres como mutantes tratados recibieron una única dosis de 130 mg/Kg de STZ (semana 0). Posterior a la inducción por STZ, se midieron distintos parámetros en los 4 grupos durante 8 semanas (periodo crónico), con el fin de corroborar que el modelo estuviese reproduciendo las características de dicha patología.

Los parámetros fueron: la medición de glucosa plasmática y el peso corporal cada semana por el tiempo mencionado. En la sexta semana se realizó la curva de tolerancia oral a la glucosa, la cual consistió: dejar en ayuno por 6 horas a cada ratón de los 4 grupos, después se disolvió glucosa utilizando agua del bebedero de los ratones. La glucosa se administró (1.5 gr/kg) de forma oral con cánula a cada ratón. Antes del estímulo se obtuvo la glucosa en sangre (tiempo 0). Administrado el estímulo, se fue registrando cada 30 minutos la glucosa en sangre hasta obtener cuatro mediciones más (un total de 120 minutos). En la semana ocho, los ratones de cada grupo fueron colocados en cajas metabólicas por 24 horas, donde se cuantificó el consumo de comida y agua, se colectó la orina, con el fin de verificar los síntomas de un diabético, se evaluó polifagia, polidipsia y poliuria.

De este modelo se realizaron 4 repeticiones, los datos obtenidos fueron agrupados en las siguientes gráficas:

En la **figura 1** se observa el número total de individuos por grupo en la semana 0 (que corresponde al 100% de sobrevivida). Al finalizar las ocho semanas, el censo indicó que por cada grupo control tanto *Mif*^{+/+} como *Mif*^{-/-} hubo una disminución del 10 % (un ratón por grupo) mientras en los grupos tratados hubo una baja del 30%, el grupo diabético (*Mif*^{+/+} STZ) tuvo mayores pérdidas (5 ratones de un total de 17 individuos) ya que fue el grupo más vulnerable por los altos niveles de glicemia que presentaron (**fig. 2A**).

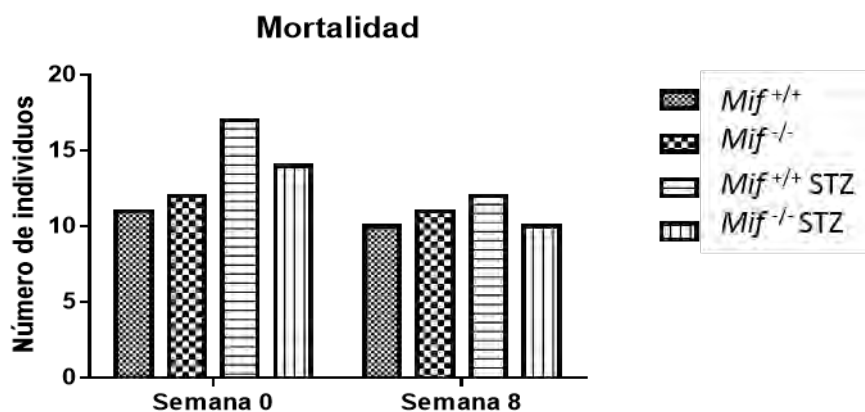


Figura 1. Mortalidad de los cuatro grupos, no tratados control sano, como tratados con STZ; ratones silvestres (*Mif*^{+/+}) como mutantes para MIF (*Mif*^{-/-}).

Los niveles de glicemia en el grupo $Mif^{+/+}$ STZ se mantuvieron por arriba de 300 mg/dL mientras en $Mif^{-/-}$ STZ oscilaron entre 100-200 mg/dL; los grupos control se mantuvieron cerca de 100 mg/dL (**fig. 2A**). El peso corporal de los ratones diabéticos disminuyó mientras en los demás grupos se observó un incremento durante las 8 semanas (**fig. 2B**).

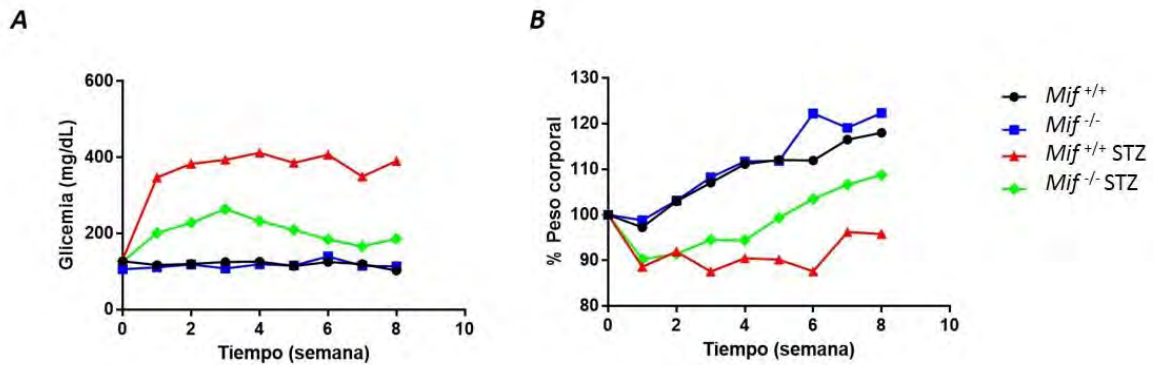


Figura 2. Parámetros físicos: los niveles de glicemia (A) y el peso corporal (B) promedio por grupo posterior a la inducción DMT2 por STZ durante dos meses.

En la semana 6 post- inducción con STZ, se realizó la curva de tolerancia a la glucosa oral en los 4 grupos. En la **figura 3** se observa que a los 30 min todos los grupos tuvieron un pico de glucosa lo cual indicó una mayor cantidad de glucosa en sangre pero fue disminuyendo conforme transcurrió el tiempo ya que los niveles de glucosa en sangre a los 120 min fueron iguales al tiempo 0. Por lo tanto, se observó que los cuatro grupos asimilaron la glucosa administrada aunque los diabéticos sigan presentando un nivel de glicemia más alto al resto de los grupos. El grupo diabético ($Mif^{+/+}$ STZ) presentó altos niveles de glicemia (~ 400 mg/dL) mientras que en los $Mif^{-/-}$ STZ los niveles fueron de 220 mg/dL de forma que este grupo tuvo mayor tolerancia a la de glucosa y, posiblemente, la producción de insulina sea mejor respecto a $Mif^{+/+}$ STZ ya que en DMT2 hay poca producción de insulina por el deterioro de los islotes β -pancreáticos.

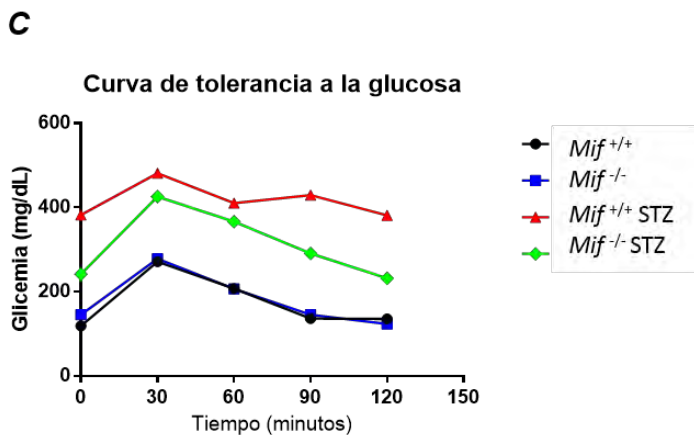


Figura 3. Curva de tolerancia a la glucosa oral (C), promedio por grupo posterior al estímulo de glucosa durante un periodo de 120 minutos. $Mif^{+/+}$ n=11; $Mif^{-/-}$ n=10; $Mif^{+/+}$ STZ n=11; $Mif^{-/-}$ STZ n=10.

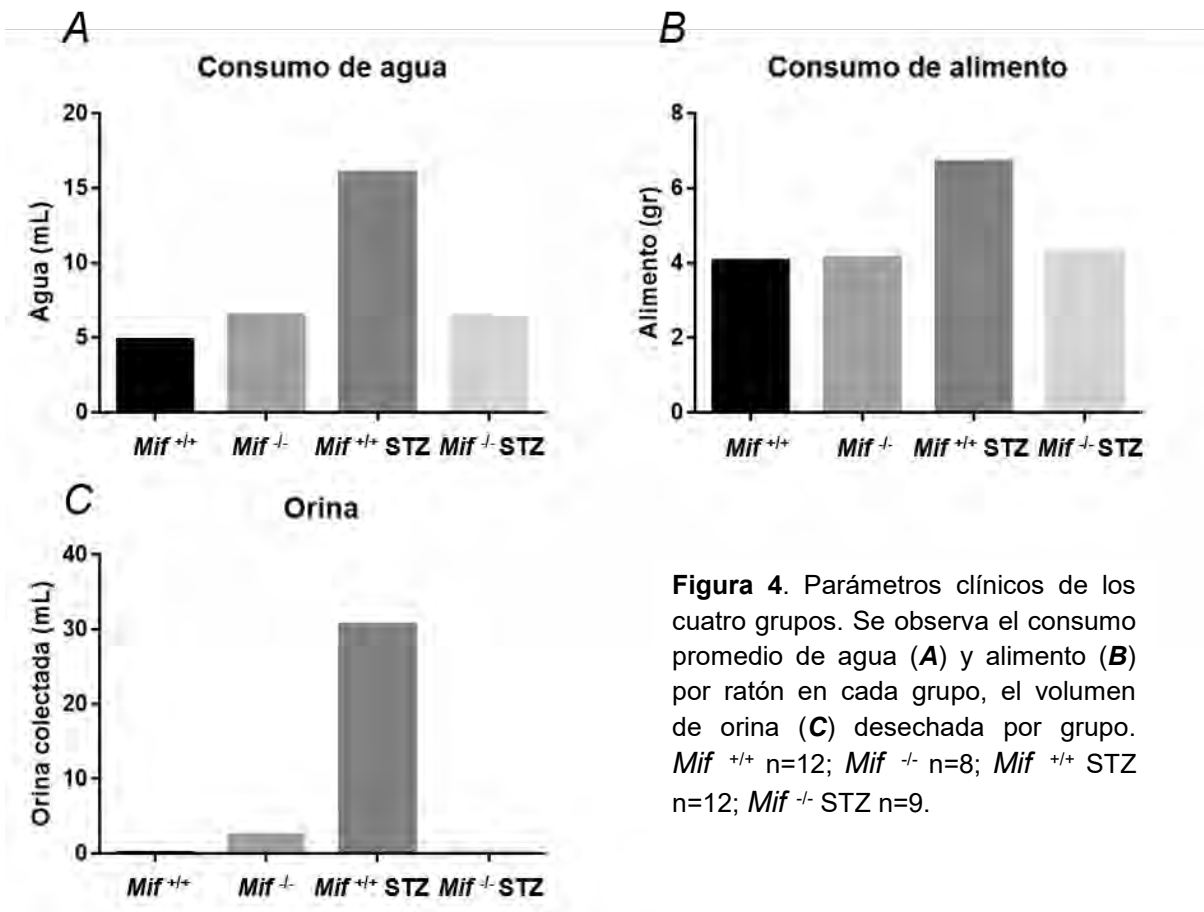


Figura 4. Parámetros clínicos de los cuatro grupos. Se observa el consumo promedio de agua (**A**) y alimento (**B**) por ratón en cada grupo, el volumen de orina (**C**) desechada por grupo. *Mif*^{+/+} n=12; *Mif*^{-/-} n=8; *Mif*^{+/+} STZ n=12; *Mif*^{-/-} STZ n=9.

Durante la octava semana, cada grupo fue colocado en cajas metabólicas por 24 horas para cuantificar el consumo de alimento y agua, también se colectó la orina. El grupo *Mif*^{-/-} STZ presentó un mayor consumo de alimento y agua (~7 gr y ~17 mL por ratón diabético, respectivamente), además de un alto volumen de orina (~ 30 mL), estos parámetros confirmaron la sintomatología de un diabético: polifagia, polidipsia y poliuria (fig. 4).

Evaluación funcional de las mitocondrias hepáticas en los grupos *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-} tratados con STZ.

METODOLOGÍA

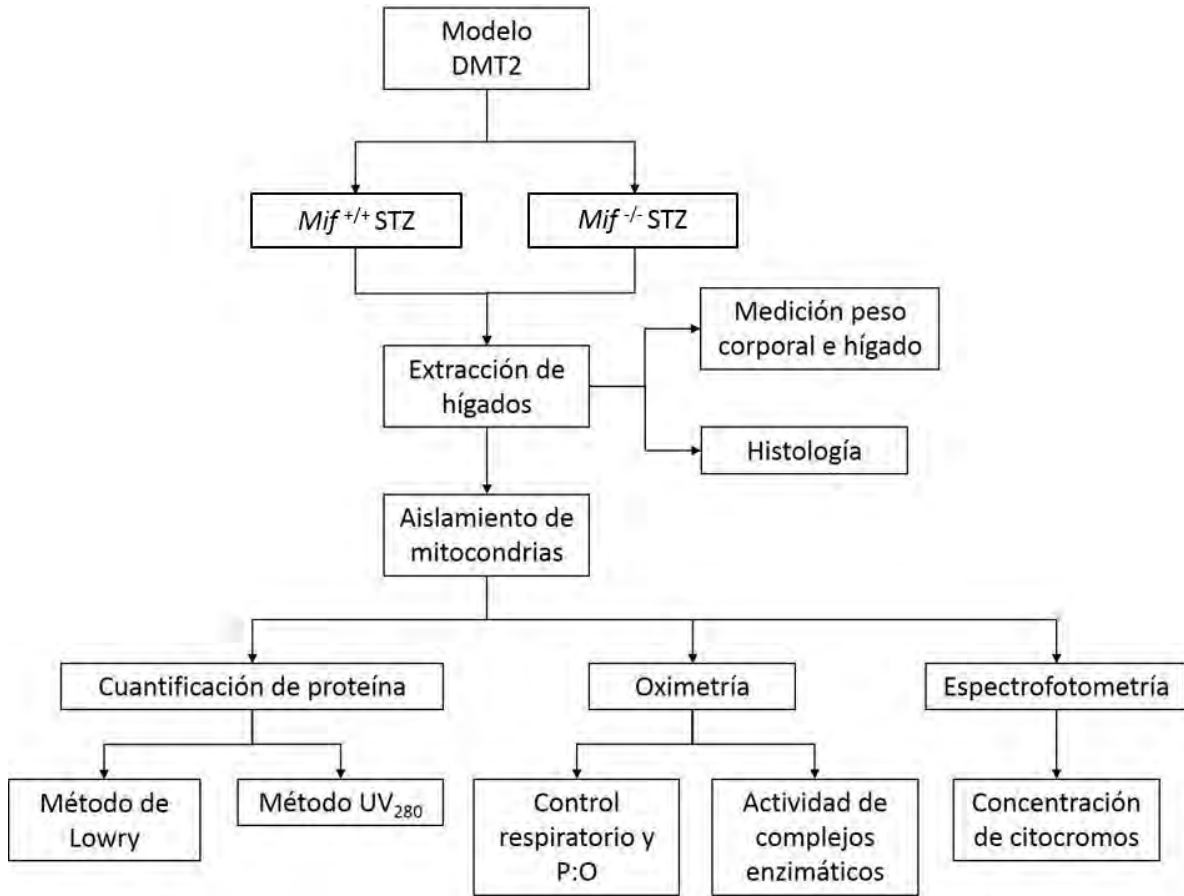


Figura 5. Esquema de la metodología para evaluar las mitocondrias hepáticas en los grupos *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-} tratados con STZ.

RESULTADOS

Obtención de los hígados y parámetros físicos

Se utilizaron 7 ratones machos *Mif*^{+/+} STZ y 8 ratones machos *Mif*^{-/-} STZ de 18-19 semanas de edad. Los parámetros físicos evaluados fueron el peso corporal y el peso total del hígado utilizando una balanza analítica. De acuerdo a la **tabla 1**, el peso corporal final promedio en ambos grupos no tuvo ninguna diferencia significativa, el valor del peso corporal promedio fue de 25.91 ± 0.03 de los dos grupos. La misma tendencia se observó

en el peso total del hígado entre los dos grupos, sin diferencia significativa. La relación PH/PC entre los dos grupos tratados con STZ no mostró diferencia significativa, aunque en el grupo *Mif*^{+/+}STZ aumentó ligeramente.

Tabla 1. Parámetros físicos de los grupos *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-}. tratados con STZ.

GRUPO	EDAD (semanas)	PESO CORPORAL (g)	PESO TOTAL DEL HÍGADO (g)	PH/PC	<i>n</i>
<i>Mif</i> ^{+/+} STZ	18-19	23.88 ± 2.03	1.39 ± 0.28	0.059 ± 0.013	7
<i>Mif</i> ^{-/-} STZ	18-19	21.19 ± 4.69	1.29 ± 0.34	0.061 ± 0.010	8

Mif^{+/+}STZ: silvestre diabético; *Mif*^{-/-}STZ: mutante diabético; gr: gramos; PH/PC: relación Peso del hígado / Peso corporal; g: gramos; *n*: el número de individuos utilizados.

Esta evidencia podría asociarse que en los diabéticos el hígado puede aumentar de tamaño debido al almacenamiento de ácidos grasos, de igual forma el peso corporal ya que el diabético también puede desarrollar obesidad.

Hígado de individuos *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-} tratados con STZ.

Aspecto macroscópico

El hígado del ratón diabético (*Mif*^{+/+} STZ y *Mif*^{-/-} STZ) se observó diferencia en el color a veces más oscuro y en otras más pálido respecto al ratón silvestre; sin embargo, la superficie se mantuvo lisa.

Histología

Se realizó la revisión detallada de la unidad estructural en el hígado de los ratones diabéticos tanto *Mif*^{+/+} STZ como *Mif*^{-/-} STZ comparando con lo observado en el hígado del ratón silvestre. A continuación se describe el aspecto microscópico de ambos grupos diabéticos.

Aspecto microscópico.

Los hígados de los individuos diabéticos (*Mif*^{+/+} STZ y *Mif*^{-/-} STZ) presentaron una población de hepatocitos no homogénea respecto a los silvestres, se observaron cambios en el aspecto y la organización de las células y en las venas portaes.

Los cambios que referimos se encuentran en las siguientes estructuras:

a) Cordones hepáticos y hepatocitos.

Hepatocitos necróticos. Estos hepatocitos se pudieron identificar por la presencia de núcleos picnóticos, cariólisis y cariorrhexis (**fig. 6 -B, -C, -E, -F; 7-C,-E, -F,-G,-H**).

Hepatocitos con esteatosis (microesteatosis) (**fig. 6 -B, -C,-E; 7-F, -G**).

Hepatocitos balonizados (**fig. 6-E; 7-F, -H**).

Pérdida de la organización en cordones (cerca de las triadas portaes) que indican zonas de inflamación (**fig. 6 -B, -C, -F; 7-C, -E, -F, -G, -H**).

Presencia de hemorragia (**fig. 6 -B, -C, -F; 7-C**).

b) Espacio portal

Venas portaes con estasis y pérdida del endotelio (**fig. 6 -B, -C, -E, -F; 7-C**).

Rodeado por hepatocitos picnóticos y con esteatosis (**Fig. 6 -B, -C, -E, -F; 7-F, -G**).

c) Vena central

Infiltrado celular leve (neutrófilos) (**Fig. 7-B**)

d) Células de Kupffer

No se distinguen entre los sinusoides. (**Fig. 6-B, -C, -F; 7-C,-E, -F,-G,-H**)

Las **figuras 6 y 7** corresponden las micrografías de hígado de los grupos *Mif*^{+/+} STZ y *Mif*^{-/-} STZ en comparación con el hígado silvestre.

100X

400X

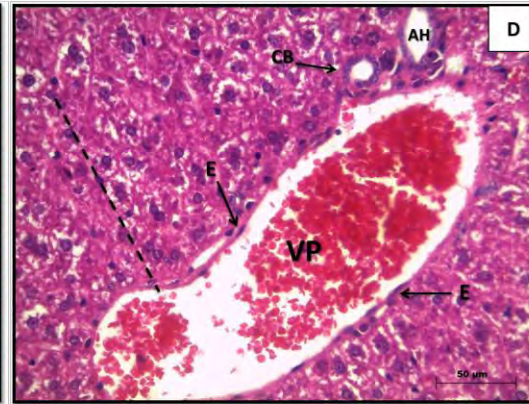
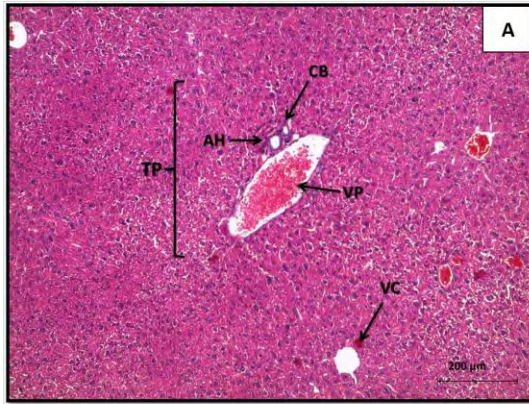
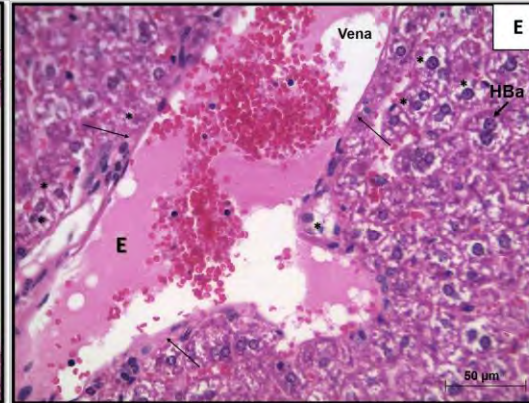
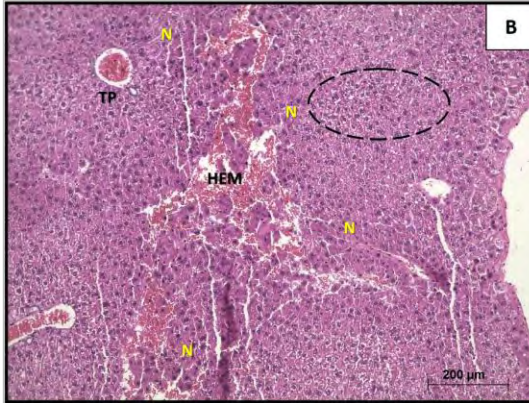
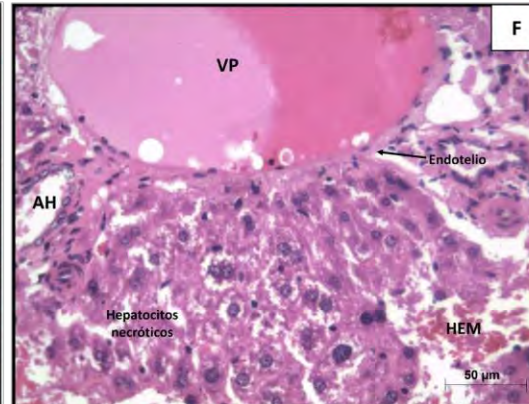
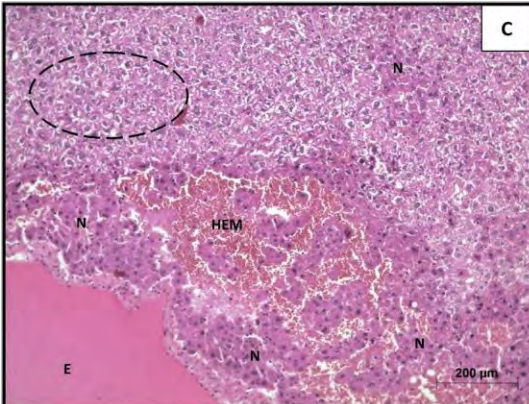
Mif^{+/+}*Mif*^{+/+} STZ*Mif*^{-/-} STZ

Figura 6. Fotomicrografías de secciones histológicas de hígados *Mif*^{+/+}, *Mif*^{+/+} STZ y *Mif*^{-/-} STZ.

A) y D) Se observa una triada portal (TP) compuesta por un conducto biliar (CB), la arteria hepática (AH) y la vena portal (VP) revestida de endotelio (E), además de cordones de hepatocitos (---).

B) Se observa hemorragia (HEM) próxima a una triada portal (TP), además se identifica la pérdida de la organización cordonal de los hepatocitos y necrosis de los mismos (N). Note la presencia de hepatocitos con esteatosis (---) del hígado silvestre diabético (*MIF*^{+/+} STZ).

C) Imagen en la que se observan cambios en el hígado de un individuo mutante diabético. Se puede identificar una gran zona con cambios patológicos: estasis en la vena que se acompaña de pérdida del endotelio, hepatocitos necróticos (N) y con esteatosis . (---), así como hemorragia (HEM).

E) Se observan cambios vasculares como pérdida del endotelio de vena así como estancamiento de la sangre (estasis). Además se identifican hepatocitos balonizados (HBa) y hepatocitos con esteatosis (*).

F) Se observa una triada portal rodeada de hepatocitos necróticos, hay pérdida de los cordones hepáticos y hemorragia (HEM). La vena presenta estasis.

Tinción H-E: A, B, C, 100X y D, E, F, 400X.

400X

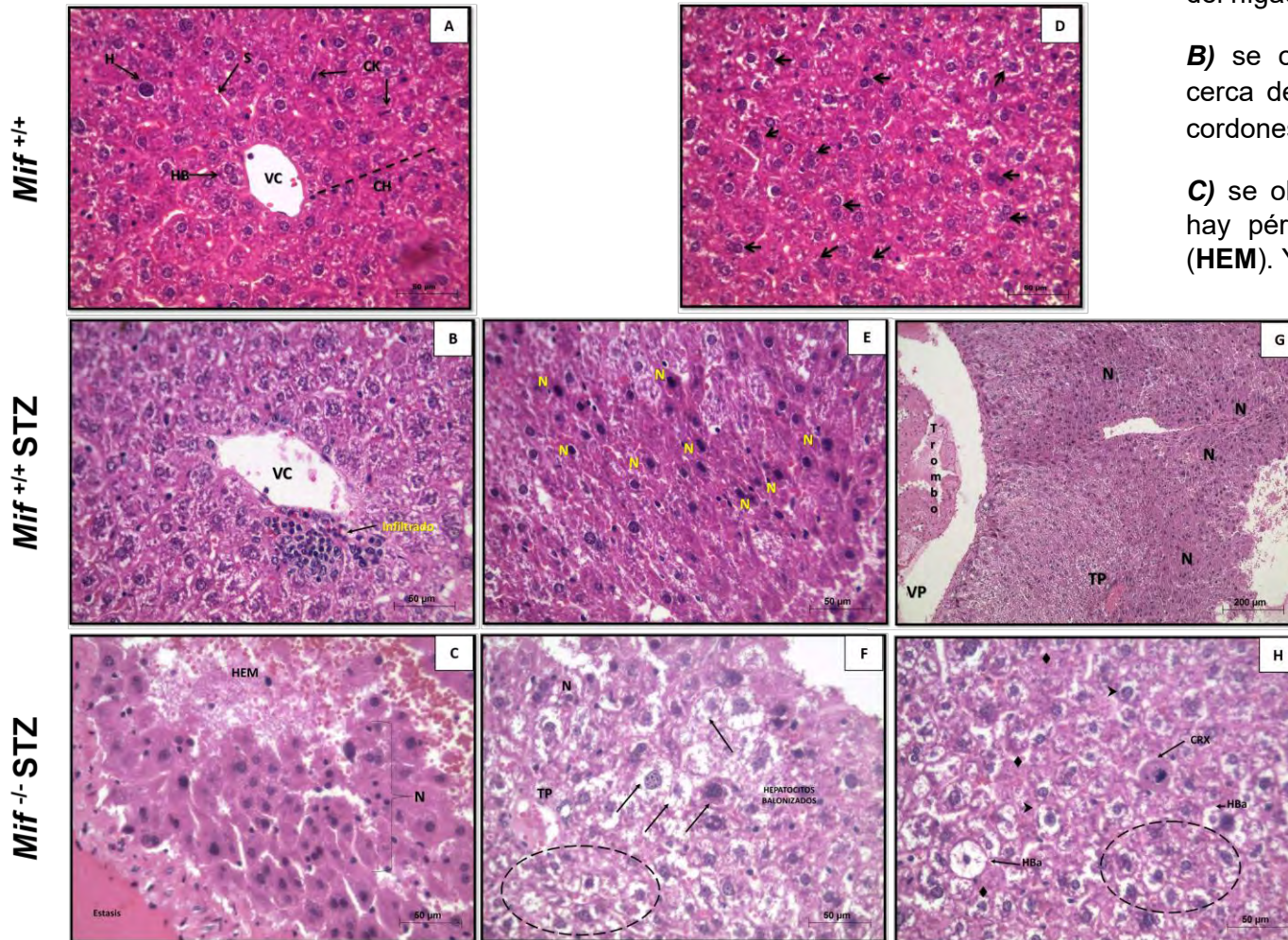


Figura 7. Fotomicrografías de secciones histológicas de hígados *Mif*^{+/+}, *Mif*^{+/+} STZ y *Mif*^{-/-} STZ. A) y D) se observa una VC de la cual irradian cordones hepáticos (CH, ---) entre ellos hay sinusoides (S) donde se alojan células de Kupffer (CK). Hay hepatocitos binucleados (HB, →) y con un núcleo (H) en buen estado del hígado silvestre.

B) se observa un infiltrado inflamatorio de neutrófilos cerca de la vena central (VC). Además hay pérdida de cordones hepáticos.

C) se observa una zona de hepatocitos necróticos (N), hay pérdida de los cordones hepáticos y hemorragia (HEM). Y la vena porta presenta estasis.

E) se observan hepatocitos necróticos y la pérdida de la organización de los cordones.

F) Se observan hepatocitos balonizados (→), necróticos (N) y con esteatosis (---) cerca de una TP.

G) se observan dos triadas portales (TP), en la de la izquierda, la vena porta tiene por estructura un trombo mientras la otra vena porta presenta estasis. Del lado derecho hay hepatocitos necróticos (N).

H) Se observa una zona de hepatocitos con diversos cambios patológicos: hepatocitos balonizados (HBa); hepatocito en cariorexis (CRX); dos hepatocitos con una membrana celular fragmentada (▶, indicador de muerte celular), hepatocitos con esteatosis y hepatocitos con cariólisis (◆).

Tinción H-E: A, B, C, D, E, F, 400X.

Cuantificación de proteína mitocondrial hepática por dos métodos

Como se explicó en el apartado anterior, se emplearon dos métodos de cuantificación de proteína: UV y Lowry, los valores obtenidos fueron promediados y acomodados en la **tabla 2**.

Tabla 2. Concentración de proteína mitocondrial total extraída de hígados tratados con STZ de los grupos *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-}.

Grupo	Concentración (mg/mL)	mg totales de mitocondrias	mg mitocondrias / mg homogenizado	mg mitocondrias / mg hígado	Peso hígado (gr)	n
<i>Mif</i>^{+/+} STZ	38.60 ± 5.41	14.02 ± 3.35	7.65 ± 1.73	1.27 ± 0.33	1.12 ± 0.10	5
<i>Mif</i>^{-/-} STZ	43.13 ± 7.00	11.21 ± 2.30	6.88 ± 2.10	1.19 ± 0.42	0.76 ± 0.32	5

***Mif*^{+/+} STZ:** silvestre diabético; ***Mif*^{-/-} STZ:** mutante diabético; **mg:** miligramos; **g:** gramos; **n:** el número de individuos utilizados.

No se encontraron diferencias significativas en el peso del hígado, en la concentración de proteína ni en los cocientes de cantidad de proteína por mg de homogenizado o por mg de peso del hígado, aunque hubo una ligera disminución en *Mif*^{-/-} STZ respecto a *Mif*^{+/+} STZ.

Identificación de citocromos por espectros de absorción diferenciales

Al igual que las mitocondrias de los grupos control, se realizó a cada muestra de mitocondrias, un espectro de absorción diferencial (espectro reducido con ditionita menos el espectro oxidado) para determinar la concentración de citocromos *c*, *b* y *a* entre los grupos tratados con STZ. La **figura 6** representa un espectro diferencial cuya magnitudes son absorbancia (eje Y) y la longitud de onda (eje X). La posición de las letras *c*, *b* y *a* indican que a esa altura se encuentran los picos de absorbancia de los distintos tipos de citocromos.

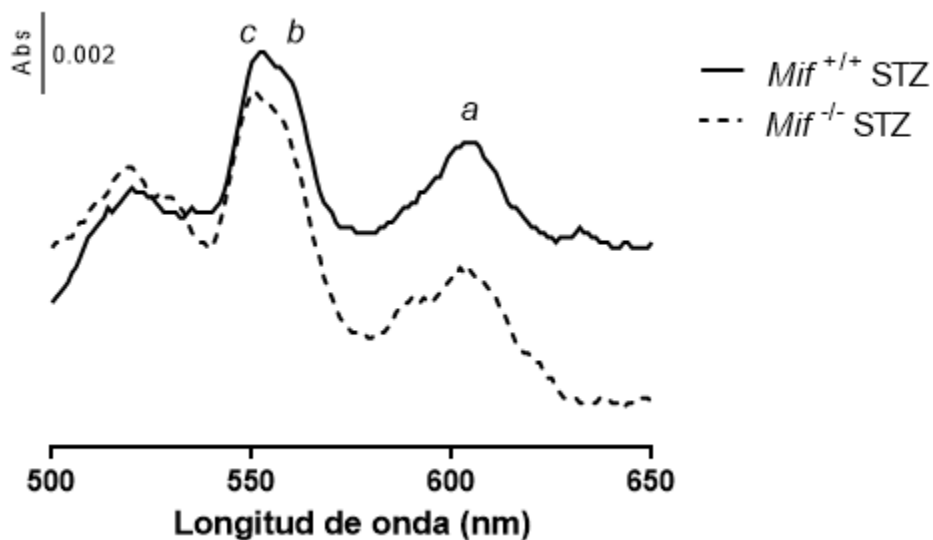


Figura 6. Espectro de absorción diferencial (reducido con ditionita menos oxidado) representativo de las mitocondrias de hígado extraídas de *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-} tratados con STZ. Se observan los picos de los citocromos *a*= 600 nm, *b*= 560 nm y *c*=550 nm en 1mg de mitocondrias hepáticas.

Comparación de la concentración relativa de citocromos de las mitocondrias obtenidas

En las tres gráficas de barras de la **figura 7**, se muestra la concentración relativa de citocromos calculada en nmoles de citocromo / mg de proteína entre *Mif*^{+/+} STZ (barras color gris) y *Mif*^{-/-} STZ (barras color oscuro). De cada grupo fueron 5 determinaciones de 1 mg de proteína mitocondrial. La gráfica correspondiente al citocromo *b* entre ambos grupos obtuvo una diferencia significativa (**p*<0.05) por la prueba *t*-student no pareada. Mientras en los restantes citocromos no hubo. Por otra parte, al igual que los grupos controles, se observa que las concentraciones de los tres tipos de citocromo varían en el orden *c*>*b*>*a*. (siendo mayor la del citocromo *c*, menor que ésta la del citocromo *b* y la más baja la del citocromo *a*).

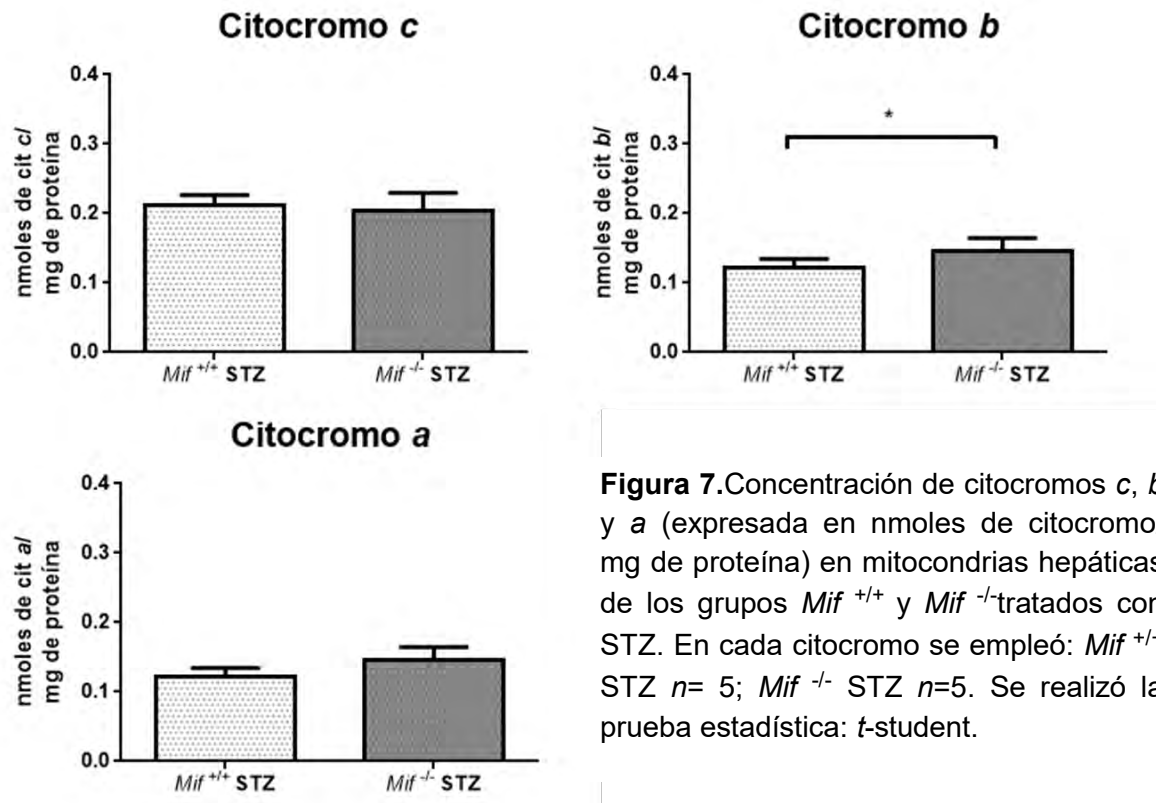


Figura 7. Concentración de citocromos *c*, *b* y *a* (expresada en nmoles de citocromo/mg de proteína) en mitocondrias hepáticas de los grupos *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-} tratados con STZ. En cada citocromo se empleó: *Mif*^{+/+} STZ *n*= 5; *Mif*^{-/-} STZ *n*=5. Se realizó la prueba estadística: *t*-student.

De igual forma, se calcularon los cocientes entre los distintos tipos de citocromos para estos grupos. Entre los grupos tratados con STZ, ningún cociente presentó alguna diferencia significativa; sin embargo, omitiendo las desviaciones estándar; *Mif*^{-/-} STZ presentó mayores valores respecto a *Mif*^{+/+} STZ.

Tabla 3. Cocientes entre los citocromos *c*, *b* y *a* en mitocondrias hepáticas de los grupos *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-} tratados con STZ.

Cociente	<i>Mif</i>^{+/+} STZ	<i>Mif</i>^{-/-} STZ
b:c	0.58 ± 0.06	0.73 ± 0.10
a:c	0.26 ± 0.10	0.30 ± 0.20
b:a	3.12 ± 2.47	4.43 ± 3.44

Entre los 4 grupos, el *b:c* en *Mif*^{+/+} y *Mif*^{+/+} STZ obtuvieron un valor semejante (0.73) mientras en *Mif*^{-/-} y *Mif*^{+/+} STZ fue de 0.58. Mientras en *a:c* todos los grupos presentaron casi el mismo valor de 0.26. y por último, para *b:a* hubo una gran diferencia entre los todos los grupos.

Medición de la respiración mitocondrial hepática por oximetría

Los trazos polarográficos de la **figura 8** se realizaron en 1 mg de mitocondrias de *Mif*^{+/+} STZ (**fig 8. A y C**) y *Mif*^{-/-} STZ (**fig 8. B y D**), se utilizaron los mismos sustratos y concentraciones: 10 mM glutamato - 5 mM de malato y 5 mM succinato.

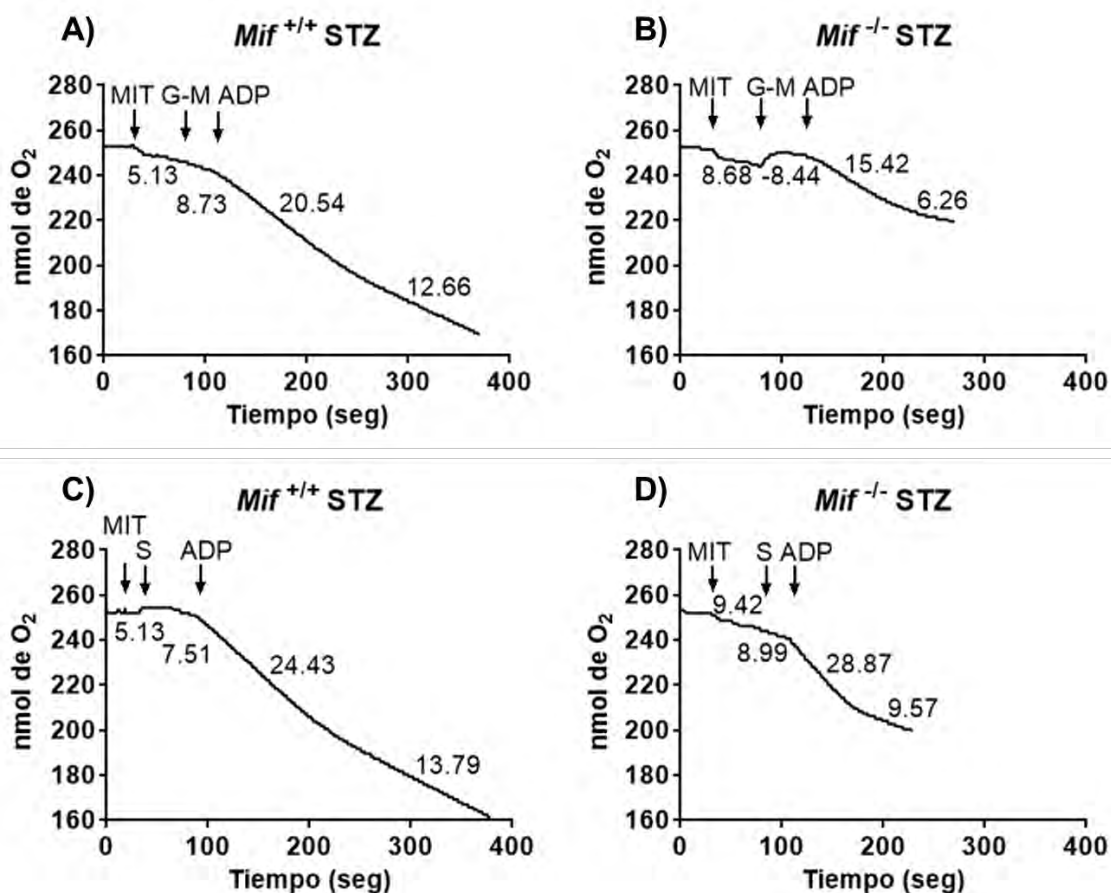


Figura 8. Trazos polarográficos de la respiración de mitocondrias de hígado (1mg) de los grupos *Mif*^{-/-} y *Mif*^{+/+} tratados con STZ en presencia de 10 mM-5 mM glutamato-malato (**A y B**), 5 mM succinato (**C y D**) y 100 μ M ADP. **MIT**: mitocondrias; **G-M**: glutamato-malato; **S**: succinato; **ADP**: adenosín difosfato.

En los trazos polarográficos correspondientes al grupo diabético (*Mif*^{+/+} STZ), **fig. 8 A y C**, se observó que la pendiente del estado 3 tardó en recuperarse ante los dos diferentes sustratos. Mientras en el grupo *Mif*^{-/-} STZ, “no diabético”, asimiló en menor tiempo el ADP añadido (velocidad del estado 3), lo cual indicó un mejor acoplamiento respecto a las mitocondrias en los ratones diabéticos (*Mif*^{-/-} STZ).

El análisis de los datos obtenidos a través de los trazos polarográficos fueron: la velocidad del estado 3 y del estado 4, el control respiratorio y la P:O con diferentes sustratos: glutamato-malato y succinato entre los grupos *Mif*^{+/+} STZ (barras blancas) y *Mif*^{-/-} STZ (barras con líneas verticales) . Respecto a la velocidad del estado 3 y el estado 4 no hubo una diferencia significativa entre los grupos ni los sustratos (**figura 9**).

Por otra parte, tanto el control respiratorio y la P:O no presentaron diferencia significativa entre sustratos ni grupos (**figura 10**). Sin embargo, las mitocondrias *Mif*^{+/+} STZ con ambos sustratos mostraron un buen acoplamiento (en control respiratorio, G-M: 3.63 ± 1.49 ; S: 3.11 ± 0.89 y P:O, G-M: 3.11 ± 1.54 ; S: 2.30 ± 0.95). Las mitocondrias de *Mif*^{-/-} STZ tuvieron un buen acoplamiento (en control respiratorio, G-M: 3.53 ± 0.81 ; S: 2.72 ± 0.70). La P:O fue similar entre ambos sustratos (G-M: 1.76 ± 0.32 ; S: 1.91 ± 0.78) pero menores a la P:O de *Mif*^{+/+} STZ utilizando los dos sustratos.

La velocidad del estado 3 con succinato ($25-58 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) alcanzó una mayor velocidad respecto al sustrato glutamato-malato ($15-29 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). El grupo con las velocidades más bajas independientemente del sustrato fue *Mif*^{+/+} STZ ($15-25 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Para el estado 4, fue el mismo comportamiento, con succinato la velocidad fue mayor ($8.9-18.9 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$) comparada con glutamato-malato ($5.68-8 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). El grupo con las velocidades más bajas fue *Mif*^{+/+} STZ ($5-9 \text{ nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Por lo tanto, entre más baja sea la velocidad del estado 4, mayor será el control respiratorio. Esto se presentó con el sustrato glutamato-malato donde los 4 grupos presentaron CR mayor a 3 mientras con succinato el grupo *Mif*^{-/-} STZ obtuvo un CR debajo de 3 (CR: 2.72 ± 0.70), el resto de los grupos obtuvieron CR igual a 3. Por otra parte, la P:O del grupo *Mif*^{+/+} STZ fue mayor con ambos sustratos respecto a los demás grupos.

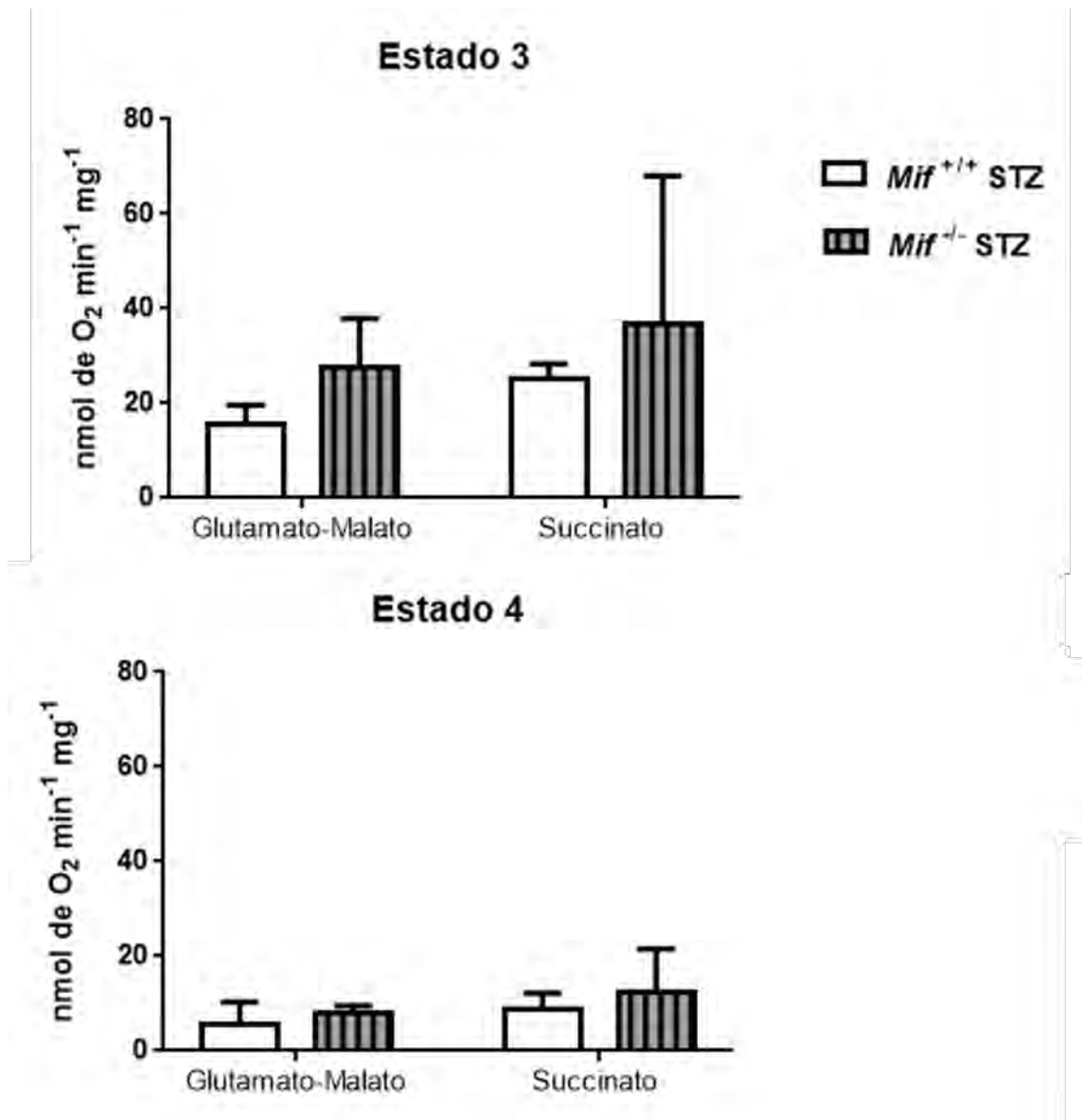


Figura 9. Velocidad de los Estados 3 y 4 de mitocondrias hepáticas de los grupos *Mif*^{-/-} y *Mif*^{+/+} tratados con STZ en presencia de diferentes sustratos utilizados. Para G-M se utilizó: *Mif*^{+/+} STZ n= 4; *Mif*^{-/-} STZ n=4; para S se utilizó: *Mif*^{+/+} STZ n= 4; *Mif*^{-/-} STZ n=3. Se realizó la prueba estadística: ANOVA de dos vías seguido por la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

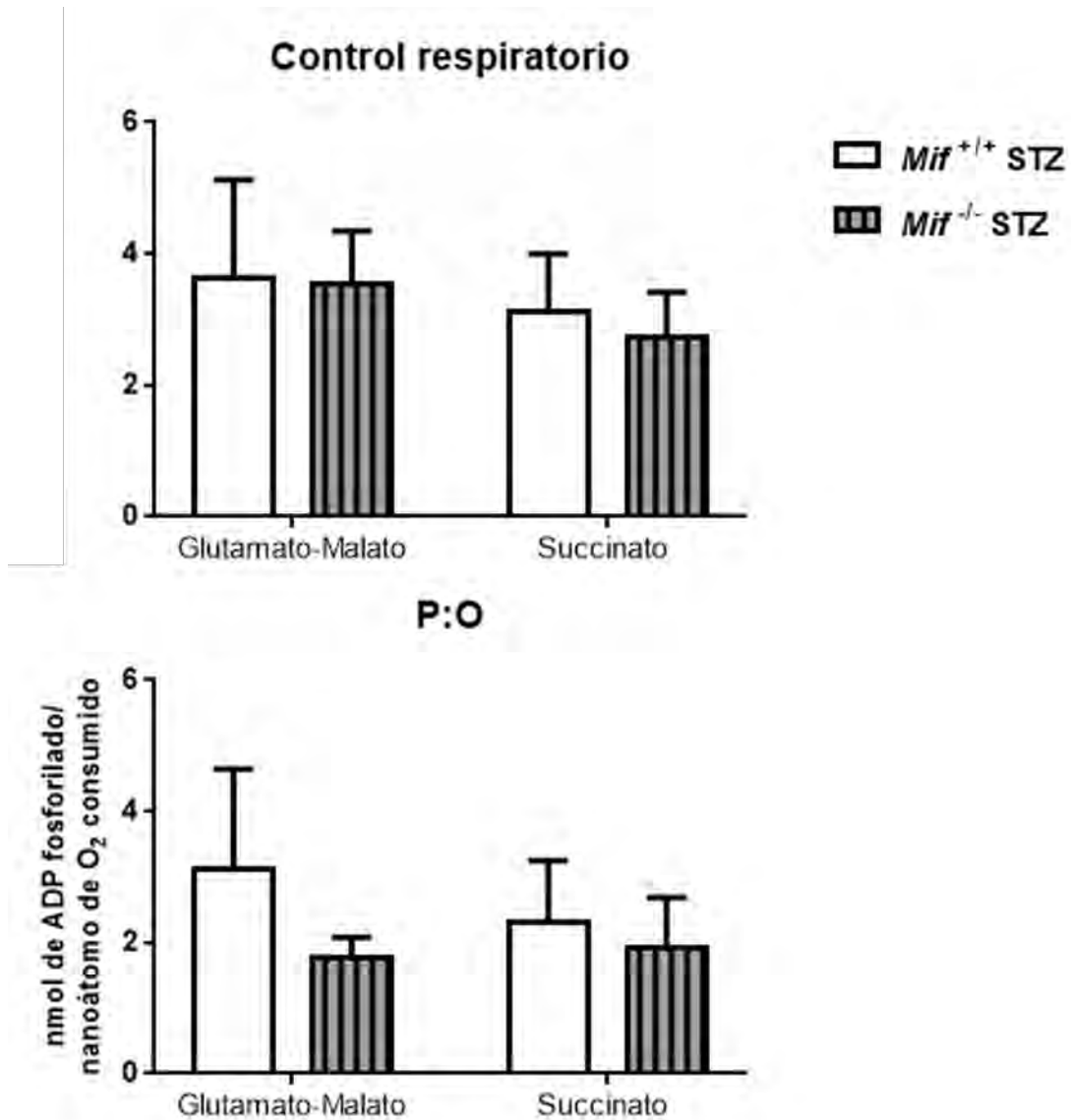
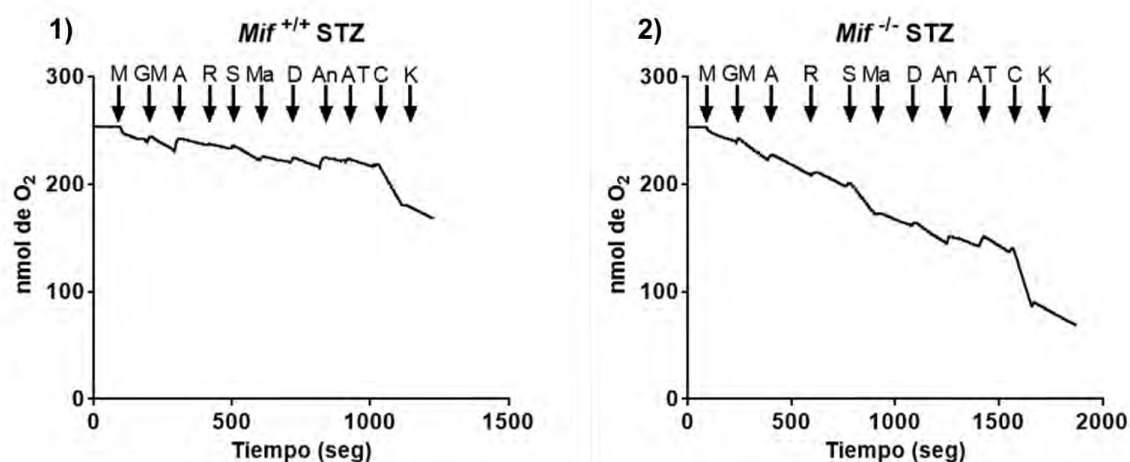


Figura 10. Control respiratorio y P:O en mitocondrias hepáticas de los grupos *Mif*^{-/-} y *Mif*^{+/+} tratados con STZ en presencia de diferentes sustratos. Para G-M se utilizó: *Mif*^{+/+} STZ n= 4; *Mif*^{-/-} STZ n=4; para S se utilizó: *Mif*^{+/+} STZ n= 4; *Mif*^{-/-} STZ n=3. Se realizó la prueba estadística: ANOVA de dos vías seguido por la prueba de Tukey ($\alpha=0.05$).

Medición de la actividad de los complejos respiratorios mitocondriales

En la **figura 11**. se presentan cuatro trazos polarográficos representativos de cada grupo tratado con STZ. Del lado izquierdo, está una tabla que contiene los símbolos y concentraciones de los sustratos e inhibidores específicos de cada complejo, y las actividades de cada complejo expresadas en $\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$.



Símbolo	Sustrato o inhibidor	<i>Mif</i> ^{+/+} STZ	<i>Mif</i> ^{-/-} STZ
		$\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$	$\text{nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$
M	Mitocondrias 1 mg	7.638	5.604
GM	Glu 10 mM- Mal 5 mM	8.814	8.646
A	ADP 5 mM	3.87	6.096
R	Rotenona 20 μM	3.522	5.49
S	Succinato 10 mM	9.006	14.844
Ma	Malonato 20 mM	3.006	4.668
D	DBH 26 μM	5.664	7.968
An	Antimicina 6.5 μM	2.754	3.918
AT	Ascorbato 2 mM -TMPD 5 μM	4.95	7.176
C	Citocromo c oxidado 10 μM	26.814	36.642
K	Cianuro 1 mM	7.71	6.396

Figura 11. Trazos polarográficos representativos de los complejos respiratorios mitocondriales de hígado (1 mg de proteína) del grupo tratado *Mif*^{-/-} (1) y *Mif*^{+/+} (2) con STZ. En cada tabla se muestra los sustratos (M, GM, A, S, D, AT y C) e inhibidores (R, Ma, An y K) con sus respectivas concentraciones y velocidades de consumo de oxígeno ($\text{nmol O}_2 \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$).

La actividad de los complejos mitocondriales de hígado de *Mif*^{+/+} STZ como de *Mif*^{-/-} STZ no presentaron diferencia significativa. En los cuatro complejos se observó una ligera disminución de la velocidad de actividad de los complejos en el grupo *Mif*^{-/-} STZ.

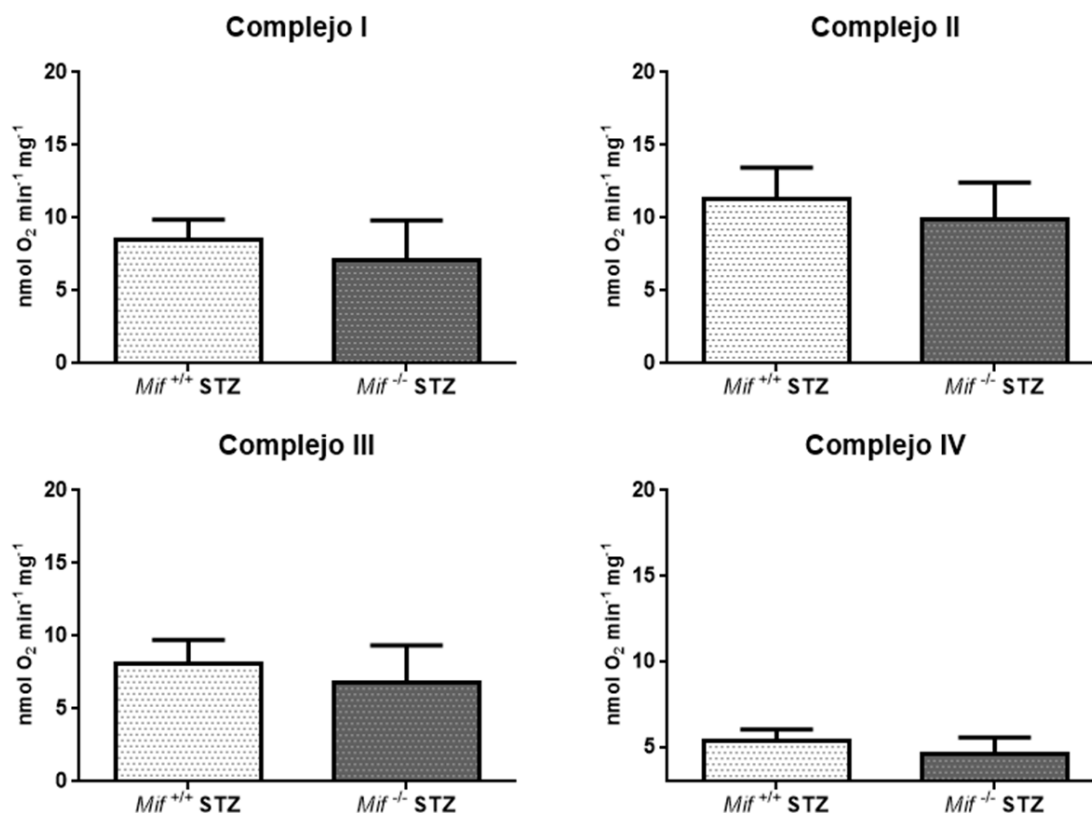


Figura 12. Actividad de los complejos respiratorios mitocondriales de hígado de los grupos *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-} tratados con STZ en presencia de diferentes sustratos. Por cada complejo se utilizó: *Mif*^{+/+} STZ *n*= 5; *Mif*^{-/-} STZ *n*=5. Se realizó la prueba estadística: *t*-student pero no hubo diferencia significativa entre ambos grupos.

La actividad de los complejos se normalizó con la velocidad obtenida para el grupo control silvestre (*Mif*^{+/+}) como el 100% de cada complejo. Para el complejo I, NADH deshidrogenasa, en *Mif*^{-/-} la actividad disminuyó un 20% mientras en *Mif*^{+/+} STZ y *Mif*^{-/-} STZ aumentó un 37% y 14%, respectivamente. En el complejo II, los tres grupos aumentaron respecto a *Mif*^{+/+}; un 40% mientras en *Mif*^{-/-} STZ el aumento fue de un 25%. Para el complejo III, del grupo mutante tanto el control como el diabético presentaron una disminución del 14-17% mientras *Mif*^{+/+} STZ aumentó un 2%. Y para el complejo IV, los *Mif*^{+/+} y *Mif*^{-/-} tratados con STZ aumentaron su actividad un 22% y 2%, respectivamente; *Mif*^{-/-} disminuyó un 16%.

DISCUSIÓN

El hígado es el órgano principal y responsable de la producción de glucosa endógena durante el ayuno y del almacenamiento de la glucosa en glucógeno después de cada ingesta. Sin embargo, durante la insulino resistencia estos procesos pueden verse alterados dependiendo de la severidad de la enfermedad (Szendroedi *et al.*, 2012). Además de un aumento del contenido lipídico hepatocelular, durante la diabetes mellitus el estado del hígado puede progresar a un espectro de diferentes enfermedades, entre ellas hígado graso del tipo no alcohólico (NAFLD), esteatohepatitis del tipo no alcohólica (NASH), cirrosis, carcinoma hepatocelular y falla aguda hepática (Tolman *et al.*, 2007). La evaluación histológica del hígado diabético de animales silvestre y mutante, indicó la presencia de necrosis (principalmente picnosis), esteatosis, hemorragia espontánea y estasis. Estos fenómenos muestran una esteato-necrohepatitis severa acompañada de la reducción del flujo venoso (posible relación con la alteración cardíaca). La única diferencia entre ambos grupos fue la presencia de hepatocitos balonizados e infiltrado celular (inflamación) en el hígado *Mif*^{-/-} STZ lo cual indica que el hígado esté progresando a NASH (Contreras y Hernández, 2015).

Respecto a la regeneración hepática (RH) que presentó el hígado de *Mif*^{-/-}, se esperaba observar en *Mif*^{-/-} STZ dos procesos: RH o el daño hepático fuese menor al del hígado *Mif*^{+/+} STZ; sin embargo, no fue así. Esto se explica por los niveles de glicemia que aunque son menores a los del *Mif*^{+/+} STZ (300 mg/dL), continúan siendo perjudiciales para el hígado del ratón *Mif*^{-/-} STZ.

Por otra parte, la diabetes mellitus tipo 2 se ha asociado con la disfunción mitocondrial dado por la insulino resistencia la cual se origina por la acumulación intracelular de los metabolitos (ácido graso coenzima A, diacilglicerol o ceramidas) provenientes del incremento de la oxidación de los ácidos grasos que tienen efecto en la inhibición de la vía de señalización de la insulina, lo cual estimula el transporte de glucosa al interior de la célula (Lowell y Shulman, 2005). Esta alteración también influye en la disminución tanto de la actividad oxidativa mitocondrial como en la síntesis de ATP mitocondrial (Petersen *et al.*, 2003). A nivel de órganos, el músculo esquelético y el hígado son órganos responsables de mantener la homeostasis de la glucosa; sin embargo, la transición de un

estado normal a un estado de insulino resistencia conlleva a alteraciones metabólicas observadas en pacientes diabéticos (Lowell y Shulman, 2005).

Jorgensen y colaboradores, 2012 utilizaron un modelo de DMT2 en ratas Goto-Kakizaki (GK) cepa que con la edad desarrolla espontáneamente esta patología. Ellos encontraron que en mitocondrias hepáticas de ratas GK jóvenes y adultas (6 y 16 semanas de edad, respectivamente) incubadas con diferentes combinaciones de sustratos (malato-piruvato; malato-palmitoil carnitina; malato- piruvato-palmitoilcarnitina; todas las combinaciones anteriores más succinato), las velocidades tanto del estado 3 y el estado 4, CR y P:O aumentaron drásticamente respecto a la progresión de la diabetes (edad) y el control. Sin embargo, al agregar succinato se observó la disminución del estado 3 únicamente. En nuestro caso, aunque trabajamos con ratones y las combinaciones de sustratos son diferentes, las tendencias de los cuatro parámetros mencionados arriba en el grupo *Mif*^{+/+} STZ (diabético) parecen similares a las GK. Las velocidades del estado 3 y 4, los valores de CR y P:O con G-M aumentaron ligeramente respecto al grupo control. Mientras que con succinato solo disminuyeron alrededor de un 50% las velocidades del estado 3 y estado 4 y no hubo diferencias significativas. En *Mif*^{-/-} STZ, los datos indicaron que con G-M las mitocondrias tienen el mismo comportamiento a las *Mif*^{+/+} pero con succinato hay una leve disminución en las velocidades de estado 3 y 4. Esto muestra que las mitocondrias están acopladas fuertemente y que no les ha afectado el grado de diabetes en que se encuentran.

La actividad de los complejos respiratorios por grupo mostró que en *Mif*^{-/-} una disminución en los complejos I, III y IV (20%, 17% y 16%, respectivamente) aunque para el CII aumentó un 27% con respecto al control. El grupo *Mif*^{+/+} STZ presentó un aumento en la actividad de los cuatro complejos: 37%, 42%, 2% y 22% respecto al control. Y, por último, para el grupo diabético mutante la actividad de CI, CII y CIV aumentó (14%, 25% y 4%) pero en el CIII disminuyó un 14% respecto al control.

CONCLUSIÓN

Los grupos controles tuvieron niveles de glicemia normales durante toda la fase experimental (8 semanas), el peso aumentó progresivamente e histológicamente presentaron un hígado sano, aunque en el hígado del ratón *Mif*^{-/-} por su condición genética presentó características de regeneración hepática. Mientras en los grupos diabéticos los niveles de glicemia están por arriba de 200 mg/dL, el peso del ratón *Mif*^{+/+} STZ disminuyó aunque el grupo *Mif*^{-/-} STZ aumentó, y el hígado en ambos grupos presentó daño (inflamación y muerte celular) y fragilidad capilar (pérdida del endotelio).

Los grupos que histológicamente presentaron inflamación, esteatosis y muerte celular presentaron un aumento en la actividad de varios complejos respiratorios, principalmente el CII (31.33 ± 7.58 %) y el CI (25.5 ± 11.5 %; solo los grupos tratados con STZ). En cuanto al control respiratorio, presentaron valores altos (mayores a 1) lo que nos indicó que las mitocondrias están acopladas. Por lo tanto, las mitocondrias ante el estrés originado por la condición de hiperglicemia (y genética en el caso de *Mif*^{-/-}) tienen la capacidad de ajustar metabólicamente al hepatocito con el fin de aumentar y/o mantener la producción de ATP. También se sugiere que el método utilizado de aislamiento de mitocondrias así como el método utilizado para la medición del consumo de oxígeno en mitocondrias recién aisladas, preservó a las mitocondrias de todos los grupos y por ello se obtuvieron acopladas.

BIBLIOGRAFÍA

- Contreras-Zentella ML, Hernández-Muñoz R. (2016) Is Liver Enzyme Release Really Associated with Cell Necrosis Induced by Oxidant Stress? *Oxid Med Cell Longev.* 3529149. Review
- Jørgensen W, Jelnes P, Rud KA, Hansen LL, Grunnet N, Quistorff B. (2012) Progression of type 2 diabetes in GK rats affects muscle and liver mitochondria differently: pronounced reduction of complex II flux is observed in liver only. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **303**, E515-23.
- Lowell BB, Shulman GI. (2005) Mitochondrial dysfunction and type 2 diabetes. *Science.* **307**, 384-7.
- Martin SD, McGee SL. (2014) The role of mitochondria in the aetiology of insulin resistance and type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta.* **1840**, 1303-12. Review
- Petersen KF, Befroy D, Dufour S, Dziura J, Ariyan C, Rothman DL, DiPietro L, Cline GW, Shulman GI. (2003) Mitochondrial dysfunction in the elderly: possible role in insulin resistance. *Science.* **300**, 1140-2.
- Szendroedi J, Phielix E, Roden M. (2011) The role of mitochondria in insulin resistance and type 2 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* **8**, 92-103.
- Szkudelski T. (2012) Streptozotocin-nicotinamide-induced diabetes in the rat. Characteristics of the experimental model. *Exp Biol Med.* **237**, 481-90.
- Tolman KG, Fonseca V, Dalpiaz A, Tan MH. (2007) Spectrum of liver disease in type 2 diabetes and management of patients with diabetes and liver disease. *Diabetes Care.* **30**, 734-43. Review.