



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR

TÍTULO DEL TRABAJO:

**PAPEL DE MACRÓFAGOS Y CÉLULAS DENDRÍTICAS
DEFICIENTES DE MIF EN LA DIABETES TIPO 1
EXPERIMENTAL**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

PRESENTA:
Biol. Yuriko Itzel Sánchez Zamora

TUTOR PRINCIPAL
Dra. Miriam Rodríguez Sosa
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR
Dra. Miriam Rodríguez Sosa, FES-Iztacala
Dra. Marcia Hiriart Urdanivia, Instituto de Fisiología Celular
Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés, FES- Iztacala

Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Estado de México; abril del 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), número de proyecto 152224 y por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), número de proyecto IN-212215 de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

Agradezco también la beca para de estudios de posgrado otorgada por el CONACyT, número de becario 349680, así como los apoyos para asistencias a congresos nacionales e internacionales otorgados por el PDCB semestre 2012-1, apoyo PAEP semestre 2015-1, y COMECyT noviembre 2014.

ÍNDICE GENERAL

ABSTRACT	1
RESUMEN	4
INTRODUCCIÓN	7
Diabetes Mellitus y su impacto en México.....	7
Clasificación de la Diabetes Mellitus	9
Diabetes mellitus insulino dependiente, diabetes juvenil o diabetes mellitus tipo 1	10
Criterios de diagnóstico de DMT1	13
Insulinitis.....	15
Células presentadoras de antígeno (CPA): Células dendríticas (CDs) y Macrófagos (Mφ)	17
Presentación de antígeno y moléculas co-estimuladoras.....	26
Complejo principal de histocompatibilidad (MHC- SEÑAL 1)	26
Moléculas co-estimuladoras (SEÑAL 2).....	28
Citocinas requeridas para la activación inmunogénica de las células T (señal 3)	31
Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF) (Artículo 1 apéndice I)...	33
MIF y células β pancreáticas.....	35

JUSTIFICACIÓN	37
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	39
HIPÓTESIS.....	40
OBJETIVOS.....	41
Objetivo general.....	41
Objetivos específicos	41
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	42
Para establecer la viabilidad del modelo de diabetes autoinmune experimental...	42
Análisis de la expresión y producción del GLUT-2 por RT- PCR y PCR tiempo real	43
Análisis de la expresión de GLUT-2 en membrana en los islotes pancreáticos en ratones WT y MIF-/- sanos.....	43
Determinación de insulina y marcadores inflamatorios (citocinas en suero).....	44
Elaboración de Ag total de islote pancreático (AgTIP)	44
Determinación de IgG1 e IgG2a en suero.....	45
Análisis histológico de islotes pancreáticos.....	46
Evaluación de activación/ maduración de Mo y CDs deficientes de MIF en el modelo de diabetes autoinmune experimental	46
Análisis in vivo de la capacidad de respuesta de Mφ y CDs de ratones Mif-/-...	47

Análisis de la expresión de células CD4+, CD8+ y CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ Treg por citometría de flujo	47
Restitución de MIF a nivel sistémico	48
Cuantificación de producción de citocinas en esplenocitos de ratones WT y Mif ^{-/-} sanos y a las 8 semanas p.i. con STZ por RT-PCR.	49
Estadística	51
RESULTADOS.....	52
Validación del modelo. La ausencia de MIF no modifica la morfología de los islotes pancreáticos	52
La ausencia de MIF no modifica la transcripción y expresión de GLUT-2	53
La producción de insulina en ratones Mif ^{-/-} sanos es igual que en los ratones WT.....	55
En el modelo de inducción de diabetes autoinmune, MIF influye en el desarrollo de la hiperglucemia.....	56
La ausencia de MIF evita la disminución de insulina en sangre posterior a la inducción con STZ	57
MIF participa en la producción de citocinas inflamatorias sistémicas en el modelo de diabetes autoinmune.....	60
MIF influye en la producción de anticuerpos específicos para Ag total de Islote β pancreático	62
MIF influye en el grado de infiltración de los islotes pancreáticos	64

MIF promueve la expresión de CD80 y CD86 en Mφ y CDs de diferentes tejidos en ratones WT a diferentes tiempos posteriores a la inducción con STZ	68
Páncreas.	68
Bazo.	72
Peritoneo.	76
MIF participa en la expresión de MHC-II en Mφ y CDs de bazo y peritoneo	80
MIF participa en el proceso de expresión de receptores de membrana como TLR-2, TLR-4, CD40 y CCR5 en Mφ y CDs de bazo	81
Las hiperglucemias y los niveles de citocinas pro-inflamatorias en sangre incrementan con la restitución sistémica de MIF en los ratones Mif-/-STZ	85
Caracterización general de las clonas de linfocitos T cuya proliferación se ve alterada por MIF en el modelo de diabetes autoinmune experimental	91
Linfocitos T CD8+	91
La ausencia de MIF favorece la proliferación de linfocitos T reguladores	93
Análisis de Mφ y CDs de islotes pancreáticos de ratones WT y Mif-/- sanos y a las 8 semanas posteriores a la inducción con STZ mediante inmunofluorescencia directa	94
Mφ F4/80+	94
CDs CD11c+	96
CD80	96
CD86	96

Evaluación de presentación de Ag de M ϕ de ratones WT y MIF $^{-/-}$ sanos y con 8 semanas post tratamiento con STZ.	100
Cuantificación citocinas de esplenocitos totales de ratones WT y Mif $^{-/-}$ con 8 semanas p.i. con STZ por el método de RT-PCR	101
ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	103
Resumen de resultados	111
CONCLUSIÓN	112
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113
APÉNDICE 1. Artículo de revisión.....	120
APÉNDICE 2. Artículo de reporte experimental	125
APÉNDICE 3. Soluciones, medios de cultivo y técnicas complementarias.....	147

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Evaluación del grado de infiltrado en los islotes pancreáticos de ambos grupos a las 8 semanas posteriores a la inducción. ND= infiltrado no detectado....66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. México se encuentra dentro de los primeros 10 países con más pacientes diabéticos en el mundo (3).8

Figura 2. Componentes celulares y citocinas involucradas en el proceso de insulinitis en la DMT1.....16

Figura 3. Imagen de células dendríticas publicadas por Ralph M. Steinman en el año 2007.....18

Figura 4. Activación de las células dendríticas.....20

Figura 5. Características distintivas entre M ϕ M1 y M2.24

Figura 6. Microscopía electrónica donde se muestran las características morfológicas de M ϕ25

Figura 7. Moléculas co-estimuladoras y vías de señalización implicadas en la unión de B7s con CD28.....30

Figura 8. Patrón de citocinas necesarias para la activación de las diferentes clonas de linfocitos, así como las citocinas que se producen por los diferentes tipos de linfocitos T.....31

Figura 9. Patrón de expresión de MIF.....33

Figura 10. Estructura tridimensional de MIF.....	34
Figura 11. Concentraciones semanales de MIF en sangre de ratones WTSTZ.	49
Figura 12. Análisis histológico de los islotes pancreáticos de ratones sanos WT y Mif-/- por el método de HE.....	52
Figura 13. Cuantificación cualitativa de la transcripción y expresión de GLUT-2 en los islotes pancreáticos de ratones WT y Mif-/- sanos.....	54
Figura 14. Presencia de insulina en los islotes pancreáticos.	55
Figura 15. Concentración de insulina en sangre en ratones WT y Mif-/- sanos.....	56
Figura 16. Criterio de clasificación de los islotes pancreáticos infiltrados en ratones WT STZ y Mif-/-STZ.....	65
Figura 17. Análisis del infiltrado de los islotes pancreáticos.	67
Figura 18. Cinética de expresión de moléculas CD80 y CD86 en Mφs y CDs en páncreas.	72
Figura 19. Plots representativos de la cinética de expresión de CD80 y CD86.....	76
Figura 20. Cinética de porcentaje de células CD80 ⁺ y CD86 ⁺ en Mφ y CDs en peritoneo.	79
Figura 21. La ausencia de MIF promueve la proliferación de linfocitos T CD8 ⁺ de bazo.....	92
Figura 22. Proporción de linfocitos CD4 ⁺ FOXP3 ⁺ y CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ en sangre..	94
Figura 23. Inmunofluorescencia primaria de F4/80 en islotes pancreáticos.....	95
Figura 24. Inmunofluorescencia primaria de CD11c en islotes pancreáticos	97

Figura 25. Inmunofluorescencia primaria de CD80- FITC en islotes pancreáticos .98	98
Figura 26. Inmunofluorescencia primaria de CD86- FITC en islotes pancreáticos. 99	99
Figura 27. Cuantificación de IL-1 β , IL-10, TGF- β , TNF- α y el regulador de la transcripción FOXP3 en esplenocitos totales.101	101
Figura 28. Estructura química de la estreptozotocina (STZ).105	105
Figura 29. Papel de MIF en el desarrollo de la insulitis.110	110

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. La ausencia de MIF evita que se desarrolle hiperglucemia en un modelo murino de diabetes autoinmune.57	57
Gráfica 2. Concentración de insulina en sangre.58	58
Gráfica 3. Niveles de glucosa en sangre en ratones <i>Mif</i> ^{-/-} retados con 80mg/kg de STZ y sobrevida.59	59
Gráfica 4. Producción de citocinas inflamatorias el desarrollo de la DMT1.61	61
Gráfica 5. Niveles de citocinas anti-inflamatorias en los ratones <i>Mif</i> ^{-/-} STZ y WT STZ durante las 8 semanas posteriores a la inducción.62	62
Gráfica 6. Concentraciones de Ac específicos contra AgTIP en suero de ratones <i>Mif</i> ^{-/-} STZ y WT STZ.63	63
Gráfica 7. Porcentaje de islotes infiltrados en ratones WT STZ y <i>Mif</i> ^{-/-} STZ a las 8 semanas posteriores a la inducción.65	65

Gráfica 8. Cuantificación de Mφ en el páncreas y evaluación de la expresión de moléculas co-estimuladoras en los diferentes grupos experimentales en los diferentes tiempos.....	69
Gráfica 9. Cuantificación de las CD en el páncreas y evaluación de la expresión de moléculas co-estimuladoras en los diferentes grupos experimentales.....	71
Gráfica 10. Cuantificación de Mφ y evaluación de la expresión de moléculas co-estimuladoras en macrófagos positivos para CD80 y CD86 en bazo.	74
Gráfica 11. Cuantificación de CDs y evaluación de la expresión de moléculas co-estimuladoras en los diferentes grupos experimentales en los diferentes tiempos en células de bazo.	75
Gráfica 12. Cuantificación de la expresión de F480, CD80 y CD86 en células de peritoneo en los diferentes tiempos experimentales posteriores a la inducción con STZ.....	77
Gráfica 13. Cuantificación de la expresión de CD11c, CD80 y CD86 en células de peritoneo en los diferentes tiempos experimentales posteriores a la inducción con STZ.....	78
Gráfica 14. Cuantificación de la expresión de MHC-II en células de bazo en los diferentes tiempos experimentales posteriores a la inducción con STZ.....	80
Gráfica15. Cuantificación de la expresión de MHC-II en células de peritoneo en los diferentes tiempos experimentales posteriores a la inducción con STZ.....	81
Gráfica 16. Cuantificación de la expresión de TLR-2 y TLR-4 en Mφ y CDs de bazo en los diferentes tiempos experimentales posteriores a la inducción con STZ.	82

Gráfica 17. Expresión de CD40 y CCR5 en bazo.	83
Gráfica 18. IFM de expresión de las moléculas CD40 y CCR5 en CDs de bazo de ratones WTSTZ y Mif-/-STZ.	84
Gráfica 19. Glucemia en ratones Mif-/- STZ posterior a la restitución de MIF.....	85
Gráfica 20. Niveles de TNF- α posterior a la restitución de MIF en ratones Mif-/- STZ.. ..	86
Gráfica 21. Niveles de IL-12 posterior a la restitución de MIF en ratones Mif-/- STZ.	87
Gráfica 22. Niveles de IL-1 β posterior a la restitución de MIF en ratones Mif-/-STZ.	88
Gráfica 23. Niveles de IL-6 posterior a la restitución de MIF en ratones Mif-/-STZ. . .	89
Gráfica 24. Niveles de IL-10 posterior a la restitución de MIF en ratones Mif-/-STZ.	90
Gráfica 25. La ausencia de MIF promueve la proliferación de linfocitos T CD4+	91
Gráfica 26. La ausencia de MIF promueve la proliferación de linfocitos T CD8+ de bazo.....	92
Gráfica 27. Proliferación de esplenocitos en presencia de macrófagos WT STZ y Mif-/- STZ.....	100

ABREVIATURAS

μL	Microlitro.
a.a.	Aminoácido.
ABTS	<i>2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)</i> .
Ac	Anticuerpo.
ADA	“American diabetes association”
Ag	Antígeno.
AgTIP	Antígeno total de islotes pancreáticos.
APC	Aloficocianina.
BSA	<i>“bovine serum albumin” o albúmina sérica de bovino</i>
CCL20	“Chemokine (C-C motif) ligand 20” (quimiocina con motivo CC ligando 20).
CCL5	“Chemokine (C-C motif) ligand 5” (quimiocina con motivo CC ligando 5).
CD25	“cluster of differentiation” o grupo de diferenciación 25.
CD4	“cluster of differentiation” o grupo de diferenciación 4.
CD40	“cluster of differentiation” o grupo de diferenciación 40.
CD40L	Ligando del grupo de diferenciación 40.
CD8	“cluster of differentiation” o grupo de diferenciación 8.
CD80	“cluster of differentiation” o grupo de diferenciación 80.
CD86	“cluster of differentiation” o grupo de diferenciación 86.

cDNA	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (DNA) COMPLEMENTARIO.
CDs	Células dendríticas.
CONACyT	Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.
CPA	Células presentadoras de antígeno.
CXCL13	DEL INGLÉS “CHEMOKINE (C-X-C MOTIF) LIGAND 13” (QUIMIOCINA CON MOTIVO C-X-C LIGANDO 13).
CXCL8	DEL INGLÉS “CHEMOKINE (C-X-C MOTIF) LIGAND 8” (QUIMIOCINA CON MOTIVO C-X-C LIGANDO 8).
ddH₂O	Agua di-destilada.
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMT2	Diabetes Mellitus tipo 2.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
FACS	<i>Del inglés “Fluorescence-activated cell sorting” (separación de células activada por fluorescencia).</i>
FBS	<i>Del inglés “fetal bovine serum” (suero fetal bovino).</i>
FMD	Federación Mexicana de Diabetes.
FOXP3	Del ingles “forkhead box P3”.
GADA	Ácido glutámico descarboxilasa.

IA-2A	Autoanticuerpos asociados a insulinoma.
IAA	Autoanticuerpos contra insulina.
ICA	Autoanticuerpos de islote celular.
IL-12	Interleucina 12.
IL-1β	Interleucina 1 β .
IL-2	Interleucina 2.
INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
INFγ	Interferón γ .
iNOS	Sintasa de óxido nítrico.
IR	Del inglés “insulin receptor” (receptor de insulina).
LADA	Del inglés “latent autoimmune diabetes in adults” (diabetes autoinmune latente en adultos).
LPS	Lipopolisacáridos.
MHC-II	Complejo mayor de histocompatibilidad II
MIF	Factor Inhibidor de la migración de macrófagos.
mRNA	ÁCIDO RIBONUCLEICO (RNA) MENSAJERO.
Mϕ	Macrófago.
MϕAA	Macrófago alternativamente activado.
MϕCA	Macrófago clásicamente activado.
NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas.
NIDDM	Diabetes mellitus no insulino dependiente.

nm	NANÓMETROS.
OMS	Organización mundial de la salud.
PAPIIT	Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica.
Pb	PARES DE BASES.
PBS	<i>Del inglés “phosphate-buffered saline” (solución salina fosfatada).</i>
PITAg	Del inglés “pancreatic islets total antigen” (antígeno total de islotes pancreáticos).
Polidipsia	Necesidad exagerada y urgente de beber, que suele ser patológica y acompaña a enfermedades como la diabetes.
Polifagia	Necesidad exagerada de consumir alimentos.
Poliuria	Excreción muy abundante de orina.
RT-PCR	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CON TRANSCRIPTASA INVERSA
T1DM	Diabetes mellitus tipo 1.
TLR-2	Receptor tipo Toll 2.
TLR-4	Receptor tipo Toll 4.
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α .
Treg	Linfocitos T reguladores.
ZnT8A	Transportador de Zinc 8A.

GLOSARIO

Cetoacidosis De acuerdo a la asociación americana de Diabetes, la cetoacidosis se produce cuando las células no están recibiendo la glucosa como fuente de energía, comienzan a quemar grasa para tener energía produciendo cetonas. Cuando las cetonas se acumulan en la sangre, ésta se acidifica llevando a la cetoacidosis.

Pinocitosis La **pinocitosis** (del griego: pinein = beber) es un tipo de endocitosis que consiste en la captación de material del espacio extracelular por invaginación de la membrana citoplasmática

Endocitosis La **endocitosis** es un proceso por el cual la célula introduce moléculas grandes o partículas, y lo hace englobándolas en una invaginación de la membrana citoplasmática, formando una vesícula que termina por desprenderse de la membrana para incorporarse al citoplasma

Fagocitosis Proceso por el cual ciertas células y organismos unicelulares capturan y digieren partículas nocivas o alimento, formando vesículas a partir de la membrana celular que dirigen las partículas o alimento hacia el interior de las células.

ABSTRACT

Mexico is within the top 10 countries with the highest incidence of diabetes mellitus (DM) worldwide. T1DM is considered an autoimmune disease characterized by the direct attack to pancreatic β cells; a process called insulinitis. Because of this process, there is an absolute or partial deficiency of insulin leading to prolonged hyperglycemia and ketoacidosis.

The innate and adaptive immune system have an extremely important role in the development of insulinitis. In this process, antigen-presenting cells (APC) as macrophages ($M\phi$) and dendritic cells (DCs), recognize molecules of the pancreatic islet as antigens, generating an autoimmune response that results in the death of pancreatic β cells. Therefore, T lymphocytes (both CD4 and CD8) and pro-inflammatory cytokines (such as TNF- α , INF- γ , IL-12, IL-1 β , IL-2 and MIF) are the major players in the development of autoimmune response in pancreatic islets.

MIF is a pro-inflammatory cytokine that has been recognized as a critical molecule in the innate immune response, especially in the control of certain autoimmune diseases, infections and parasitic diseases. MIF plays an important role in septic shock, colitis, cancer, rheumatoid arthritis, atherosclerosis and obesity. Recently high serum levels have been shown of MIF in both T1DM and T2DM. For these reasons, MIF, has recently been proposed as a diagnostic biomarker for diabetes. However, the fine mechanisms of MIF participation in the development of these diseases, especially in developing T1DM, are unknown.

Given that the insulinitis process is the beginning of T1DM, and MIF could be involved in this process, the purpose of this study was to determine whether there are differences in the expression of costimulatory molecules in mice M ϕ and CD s *Mif*^{-/-} compared with WT M ϕ and CD s that may affect the presentation of self-antigens and therefore the development of the experimental T1DM.

Our results show that the *Mif*^{-/-} mice treated with STZ (*Mif*^{-/-}-STZ) developed less hyperglycemia compared to WTSTZ mice. There moderate hyperglycemia was associated with lower concentrations of pro- and anti-inflammatory cytokines. In addition, *Mif*^{-/-}-STZ mice had lower amount of specific antibodies against pancreatic islets total antigen (PITAg) and fewer cellular infiltrates in the pancreatic islets. M ϕ and CD s in spleen showed reduced expression of costimulatory molecules such as CD80, CD86, CD40 and CD40, and Toll-like receptors TLR-2, TLR-4, MHC-II and CCR5. MIF recombinant administration to *Mif*^{-/-}-STZ mice showed glucose levels similar to WTSTZ mice, and the levels of pro-inflammatory cytokines were restored reaching to WTSTZ concentrations. Additionally, in *Mif*^{-/-}-STZ mice an increased proliferation of CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T cells, TCD4⁺ and TCD8⁺ was found, although the latter were apparently not reactive.

Taken together, the results suggest that MIF is an important molecule in T1DM, encouraging the development of autoimmune inflammatory process in pancreatic islets. This results in high levels of inflammatory cytokines and hyperglycemia. Additionally, we demonstrated that MIF is a molecule that promotes recruitment M ϕ and CD s in the pancreas in T1DM experimental model. MIF influences the

expression of costimulatory molecules CD80 and CD86 in these cells as well as for proper expression of membrane receptors such as MHC-II, TLR-2 and TLR-4 in Mφ and CD4s in a model of experimental DM1. Moreover, MIF is important for control of CD4 and CD8 lymphocyte proliferation, and a limiting factor in the proliferation of regulatory T cells.

Thus, MIF promotes the development of insulinitis, and therefore of T1DM. These results position MIF as a possible target for disease control.

RESUMEN

México se encuentra dentro de los primeros 10 países con mayor incidencia de diabetes mellitus en (DM) en todo el mundo. La DMT1 es considerada una enfermedad autoinmune caracterizada por el ataque directo a las células β pancreáticas; proceso llamado insulinitis. Como resultado de este proceso, hay una deficiencia absoluta o parcial de insulina que lleva a hiperglucemias prolongadas y cetoacidosis.

El sistema inmune innato y adaptativo tienen una participación sumamente importante en el desarrollo de la insulinitis, en éste proceso células presentadoras de antígeno (CPA), como macrófagos ($M\phi$) y células dendríticas (CDs), reconocen moléculas propias de los islotes pancreáticos como antígenos, generando una respuesta autoinmune que resulta en la muerte de las células β pancreáticas. Por tanto, linfocitos T (tanto CD4 como CD8) y citocinas pro-inflamatorias (como TNF- α , INF- γ , IL-12, IL-1 β , IL-2 y MIF) son los actores principales en el desarrollo de la respuesta autoinmune en los islotes pancreáticos.

MIF es una citocina pro-inflamatoria que ha sido reconocida como una molécula crítica en la respuesta inmune innata, sobre todo en el control de ciertas enfermedades autoinmunes, infecciosas y parasitarias. MIF tiene un papel importante en el choque séptico, colitis, cáncer, artritis reumatoide, arterosclerosis, obesidad y diabetes. Por estas razones, recientemente MIF ha sido propuesto como un bio-marcador de diagnóstico para artritis, colitis ulcerativa y diabetes. Sin

embargo, no se conocen los mecanismos finos de la participación de MIF en el desarrollo de estas enfermedades, en especial, en el desarrollo de la DMT1.

Tomando en cuenta que el proceso de insulinitis es el inicio de la DMT1, y que MIF participa en éste proceso, el propósito de este trabajo fue determinar si hay diferencias en la expresión de moléculas co-estimuladoras en M ϕ y CDs de ratones *Mif*^{-/-} que pudieran afectar la presentación de antígenos propios y en consecuencia del desarrollo de la DMT1 experimental.

En este trabajo de tesis demostramos que los ratones *Mif*^{-/-} inducidos con STZ (*Mif*^{-/-}/STZ) desarrollaron hiperglucemias menores comparadas con las desarrolladas por los ratones WTSTZ. Estas disminuciones de hiperglucemias estuvieron asociadas a menores concentraciones de citocinas pro- y anti-inflamatorias; además, se presentaron una menor cantidad de anticuerpos contra antígeno total de islote pancreático (AgTIP), así como una menor cantidad de infiltrado celular en los islotes pancreáticos. En M ϕ y CDs de bazo se encontró una menor expresión de moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 y CD40, de receptores tipo Toll como TLR-2, TLR-4, MHC-II y CCR5. Después de la administración de MIF recombinante (MIFrec) en ratones *Mif*^{-/-}/STZ, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de glucosa en sangre con respecto al grupo WTSTZ y las concentraciones de citocinas pro-inflamatorias incrementaron, alcanzando concentraciones parecidas a las producidas en los ratones WTSTZ. Adicionalmente, se observó en los ratones *Mif*^{-/-}/STZ una mayor proliferación de células CD4⁺, CD25⁺, FOXP3⁺ y CD8⁺, pero al parecer éstas no son completamente reactivas.

En conjunto, los resultados sugieren que MIF es una molécula importante en la DMT1 al favorecer el desarrollo del proceso inflamatorio autoinmune en los islotes pancreáticos, reflejándose en altas concentraciones de citocinas inflamatorias e hiperglucemias. Adicionalmente, aquí demostramos que MIF es una molécula que favorece el reclutamiento de M ϕ y CDs en el páncreas en el modelo de DMT1 experimental. También demostramos que influye en la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 en estas células, así como para la correcta expresión de receptores de membrana como MHC-II, TLR-2, TLR-4 y CCR5 en M ϕ y CDs en el modelo de DMT1 experimental. Por otro lado, MIF es importante para el control de la proliferación de linfocitos T CD4+ y T CD8+, además de ser un factor limitante en la proliferación de linfocitos T reguladores, es decir, MIF favorece al desarrollo de la insulitis, y por lo tanto de la DMT1, poniendo a MIF como un blanco terapéutico a nivel celular eficiente para el control de la enfermedad.

INTRODUCCIÓN

Diabetes Mellitus y su impacto en México

En 1980, la Organización Mundial de la Salud (OMS) definió a la diabetes mellitus como, “un estado de hiperglucemia crónico apoyado por factores genéticos y exógenos que a menudo actúan juntos” (1). Desde entonces se comprendió que la enfermedad no solo aparece a causa de predisposición genética, sino también por la influencia de factores ambientales como el estilo de vida y la alimentación (2).

Whiting *et al.* en 2011 realizó un listado de países con mayor número de personas diabéticas (figura 1) y ubicó a México dentro de los primeros 10 países con mayor incidencia de la enfermedad, además de que se estima que esta tendencia se mantendrá para el año 2030 (Figura 1. México se encuentra dentro de los primeros 10 países con más pacientes diabéticos en el mundo) (3).

De acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), en México la diabetes mellitus representó la segunda causa de defunciones durante el año 2012 (4), lo que coloca a la diabetes mellitus entre las patologías de mayor interés de investigación en nuestro país. Según la Federación Mexicana de Diabetes (FMD), 6.4 millones de personas en nuestro país padecen esta enfermedad, y los estados con mayor número de pacientes diagnosticados como diabéticos son CDMX, Nuevo León, Veracruz, Tamaulipas, Durango y San Luis Potosí. Lo que

representa un gasto de 3,430 millones de dólares al año en su atención y complicaciones (5).

Table 5 - Top 10 countries for numbers of people with diabetes in 2011 and 2030.

2011		2030	
Country	Millions	Country	Millions
China	90.0	China	129.7
India	61.3	India	101.2
United States of America	23.7	United States of America	29.6
Russian Federation	12.6	Brazil	19.6
Brazil	12.4	Bangladesh	16.8
Japan	10.7	Mexico	16.4
Mexico	10.3	Russian Federation	14.1
Bangladesh	8.4	Egypt	12.4
Egypt	7.3	Indonesia	11.8
Indonesia	7.3	Pakistan	11.4

Figura 1. México se encuentra dentro de los primeros 10 países con más pacientes diabéticos en el mundo (3).

Clasificación de la Diabetes Mellitus

La Asociación Americana de Diabetes (ADA) define que: diabetes mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por la presencia de hiperglucemia; que resulta de defectos en la secreción de la insulina, la acción de la insulina o ambas (6,7). También se ve implicado el metabolismo deficiente de lípidos y proteínas (1). Desde la década de los 90's se ha incrementado la incidencia de esta enfermedad alrededor del mundo (8). De manera general, la diabetes ha sido clasificada en dos grandes grupos: Diabetes Mellitus Tipo 1 (DMT1) y Diabetes Mellitus tipo 2 (DMT2) (9).

La DMT2, también llamada Diabetes no Insulinodependiente (NIDDM) comprende del 90 al 95% de los casos totales de diabetes, e incluye a aquellos individuos que presentan resistencia a la insulina y/o deficiencia relativa en la secreción de la insulina. Por definición, la DMT2 es un síndrome heterogéneo, multifactorial y poligénico; que resulta en la disfunción del receptor de insulina (insulin receptor –IR por sus siglas en inglés), seguido del desarrollo consecuente de la resistencia a la insulina (10). La DMT2 está asociada generalmente con otros problemas del llamado síndrome metabólico, como obesidad y sobrepeso (11), presión arterial alta y concentración de triglicéridos altos en sangre (12). El síndrome metabólico comprende al conjunto de alteraciones metabólicas constituido por la obesidad central, disminución de las concentraciones del colesterol unido a las lipoproteínas de alta densidad (cHDL), la elevación de las concentraciones de triglicéridos, el aumento de la presión arterial (PA) y la hiperglucemia (13). Los individuos que presentan DMT2 no necesitan administración de insulina exógena para sobrevivir.

Los niveles de secreción de insulina en pacientes con DMT2 pueden incrementar debido a un mecanismo de compensación que resulta de la resistencia a la insulina. Por tanto, la resistencia a la insulina es una característica distintiva de la DMT2. Los factores de riesgo para desarrollar este tipo de diabetes incrementan con la edad, la obesidad, el sedentarismo y es más frecuente en mujeres (6).

Diabetes mellitus insulino dependiente, diabetes juvenil o diabetes mellitus tipo 1

Por otro lado, la DMT1, también llamada diabetes infantil, juvenil o diabetes insulino dependiente (IDDM), es considerada una enfermedad autoinmune caracterizada por un ataque directo a las células β pancreáticas (6,14). Este tipo de diabetes tiene un origen autoinmune, ya sea por predisposición genética o como resultado del mimetismo molecular (generado principalmente por infecciones virales). La diabetes autoinmune latente en adultos -LADA por sus siglas en inglés- es clasificada como DMT1 (15-19). Se caracteriza por una fase preclínica silenciosa en la cual la destrucción de las células β pancreáticas puede persistir por semanas, meses o incluso años hasta que la producción de insulina se torna insuficiente para mantener el metabolismo normal de la glucosa (7). La deficiencia de insulina resulta en una hiperglicemia prolongada y cetoacidosis, lo cual explica los síntomas típicos de la enfermedad como pérdida de peso, poliuria, polidipsia y polifagia. Además, se pueden presentar síntomas menos específicos como vómito, constipación y dolor de cabeza (20).

Ya que la incidencia de la DMT1 continúa en crecimiento a nivel mundial, con una tasa cercana al 3% por año, es necesario mantener una vigilancia constante para

lograr diagnósticos más tempranos (20,21). La DMT1 comprende del 5 al 10% de los casos totales de diabetes en todo el mundo (14). A pesar de que se ha incrementado el número de casos en personas jóvenes, la DMT1 es la diabetes más común en niños y adolescentes (22). En Europa, el 48 % de los casos de DMT1 se presenta en niños de 10 a 14 años, el 34 % en niños de 5 a 9 años y el 18 % en niños de 0 a 4 años. Además, se sabe que esta enfermedad afecta más al género femenino que al masculino, sugiriendo que existe un factor género-dependiente que regula el proceso autoinmune (23).

A pesar de que la enfermedad está ampliamente distribuida por todo el mundo y los casos de incidencia tienen una tendencia en aumento, se observan diferencias radicales en el número de casos entre países. La incidencia de la DMT1 varía en cuanto a grupos étnicos se refiere; así se ha concluido que la genética, la migración y las infecciones (sobre todo de ciertos virus) determinan la incidencia de la enfermedad, fenómeno que se intenta explicar con la llamada “hipótesis de la higiene”. La hipótesis de la higiene sugiere que una exposición reducida a infecciones resulta en menor protección a agentes infecciosos, y en consecuencia, en el incremento de la incidencia de la DMT1, sobre todo en países más desarrollados (23). Las razones por las que se observan estas variaciones en DMT1 no son claras, pero se cree que también pudiera influir la dieta, el estilo de vida y la carga genética (24-26). La DMT1 es considerada como una de las enfermedades autoinmunes clásicas, en donde el organismo que la padece es susceptible a la enfermedad, primero por su carga genética y segundo por factores ambientales que resultan en la activación de células del sistema inmune “armadas” para destruir

única y específicamente a las células β pancreáticas. Al menos entre el 60% al 90% de los pacientes que mueren 6 meses después de haber sido diagnosticados con DMT1, presentan infiltrado leucocitario en los islotes pancreáticos con la consecuente destrucción de las células β pancreáticas, además de no presentar contenido de insulina en los islotes pancreáticos (27).

La DMT1 es una enfermedad que aparece principalmente por predisposición genética. Sin embargo, más del 85% de los casos aparecen en ausencia de algún antecedente familiar. En humano, los genes involucrados en la predisposición para el desarrollo de la enfermedad son los genes HLA-B, DR, DQB1 y A1 (20). Las predisposiciones genéticas incrementan de manera predominante el riesgo del desarrollo de la enfermedad en personas jóvenes; mientras que la exposición a factores ambientales puede ser más importante en edades más avanzadas (28).

La discordancia en el desarrollo de la enfermedad en gemelos idénticos es una de las mejores observaciones que apoyan la existencia de factores ambientales que llevan al desarrollo de DMT1 (28) entre los que se incluyen: la dieta (leche de vaca, exposición a proteína (albúmina de suero bovino y betalactoglobulina), deficiencia de vitamina D, infecciones virales (virus Coxaquie A o B, ruvivirus, citomegalovirus, enterovirus, virus ECHO, virus Epstein-Barr, paramixovirus, y retrovirus), drogas (tipo Alozan y Estreptozotocina) y estrés. Sin embargo, hasta la fecha no se ha encontrado un factor ambiental claramente definitivo para el desarrollo de la DMT1 (28,29).

Otro factor de riesgo para el desarrollo de la DMT1 es la edad. Este tipo de diabetes se desarrolla predominantemente en niños, con una tasa de más del 85% de todos

los casos de diabetes infantil. Por otro lado, la DMT1 solo corresponde al 20% de personas jóvenes en todo el mundo.

Criterios de diagnóstico de DMT1

Los criterios de diagnóstico de DMT1 incluyen las pruebas generales para la detección de diabetes como: hemoglobina A1c $\geq 6,5\%$ (47.5 mmol/dl), glucosa plasmática en ayuno (fasting plasmic glucose- FPG) $FPG \geq 126\text{mg/dl}$ y glucemia 2 horas postprandial $\geq 200\text{mg/dl}$ durante la prueba de tolerancia a la glucosa. Esta última prueba debe realizarse como lo indica la OMS, con una carga de glucosa que contiene el equivalente de 75 g de glucosa anhidra disuelta en agua. Adicionalmente, es necesaria la detección de anticuerpos específicos de islote pancreático que direcciona el diagnóstico a DMT1 (30,31).

Los auto-anticuerpos específicos relacionados con el desarrollo de la DMT1 pueden aparecer a tiempos tempranos y ser predictivos para un desarrollo posterior de DMT1 (32), aproximadamente del 90 al 95% de los pacientes con diagnóstico reciente son positivos en al menos un auto-anticuerpo (33,34). Es importante resaltar que la producción de anticuerpos contra este tipo de antígenos propios no se encuentra en ninguna otra forma de diabetes y la presencia de múltiples auto-anticuerpos es mucho más predictiva que la presencia de uno solo (35). Los auto-anticuerpos asociados con la DMT1 incluyen a los siguientes:

1. Auto-anticuerpos de islote celular (ICA). Es uno de los anticuerpos más importantes en la predicción y diagnóstico de la enfermedad. Alrededor del 5

al 15% de los pacientes con diagnóstico de DMT2 son ICA positivos (36), los cuales con el tiempo, se convierten en insulinodependientes (DMT1).

2. Auto-anticuerpos contra ácido glutámico descarboxilasa (GADA). En el sistema nervioso, GADA convierte el glutamato en un inhibidor del neurotransmisor gama-amino ácido butírico. En 1990, se mostró que la presencia de auto-anticuerpos contra una proteína de 64 KDa era altamente predictiva de la presencia de DMT1 (GAD65). Al igual que ICA, GAD65 está presente en la mayoría de los nuevos casos de DMT1 (37).
3. Auto-anticuerpos asociados a insulinoma (IA-2A). Se encuentran en menor proporción (aproximadamente 60% menos que ICA y GAD65) en pacientes con diagnóstico reciente de DMT1 (38).
4. Auto-anticuerpos contra insulina (IAA). El único antígeno propio específico de la célula β pancreática es la insulina. Los auto-anticuerpos contra la insulina se encuentran aproximadamente en 40%-50% de niños con diagnóstico reciente. La combinación de la presencia de ICA con IAA es altamente predictiva para el desarrollo eventual de DMT1 (39).
5. Auto-anticuerpos contra el transportador de zinc (ZnT8A). La función de este transportador es concentrar el zinc en los gránulos secretores de insulina y se encuentra presente en un 60-80% de casos de DMT1 (40).
6. Los auto-anticuerpos detectados con mayor frecuencia son: anti GAD65 (~ 80%), seguido por anti IA-2 (~ 60%), anti insulina (~ 55%) y los auto-anticuerpos ZnT8 (~ 50% - (41).

Los auto-anticuerpos islote-específicos tienen un inmenso valor en el diagnóstico de la diabetes autoinmune, más aún en la actualidad, en la cual hay una gran tasa de obesidad infantil y la enfermedad puede ser confundida con DMT2 (21).

En cualquier caso, los auto-anticuerpos son producidos como resultado de una respuesta inflamatoria autoinmune localizada en los islotes pancreáticos, proceso conocido como insulitis.

Insulitis

De manera general, en la insulitis las células del sistema inmune innato y adaptativo infiltran el páncreas hasta llegar a los islotes pancreáticos (figura 2 A y B), ya que estos se reconocen como extraños, generando un proceso inflamatorio aberrante con la consecuente destrucción de las células β pancreáticas, lo cual se ve reflejado en la producción patológica de auto-anticuerpos y células T auto-reactivas así como en la baja producción de insulina (42).

En este proceso participan células presentadoras de antígeno (CPA), linfocitos T auto-reactivos y una gran variedad de citocinas inflamatorias. El infiltrado deforma los islotes pancreáticos y destruye las células β pancreáticas (figura 2), lo que disminuye (incluso en su totalidad) la producción de insulina.

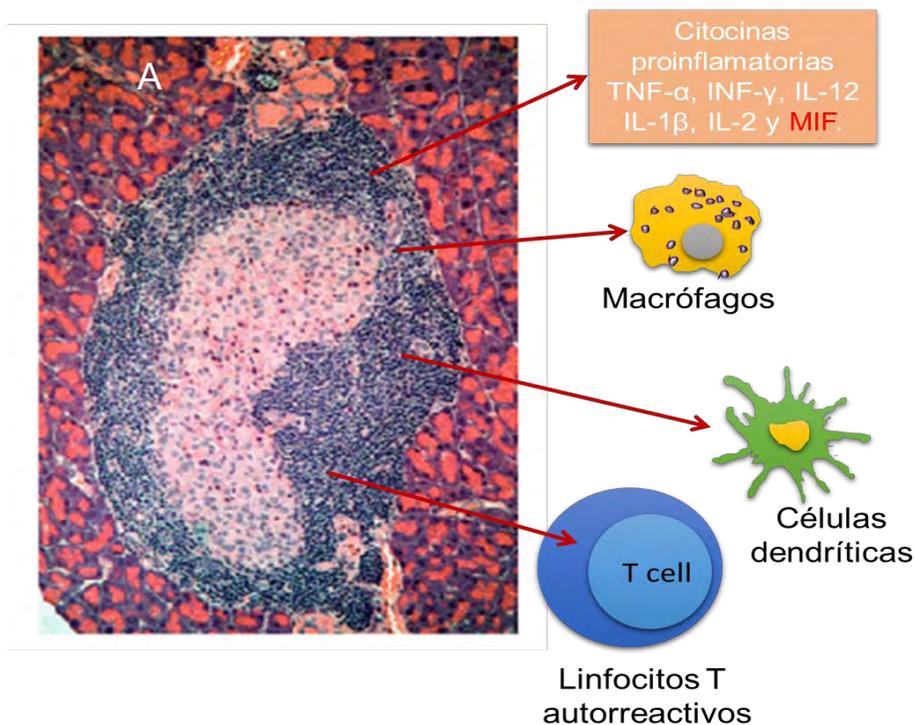


Figura 1. Componentes celulares y citocinas involucradas en el proceso de insulitis en la DMT1. El tipo celular más numeroso en el proceso de insulitis son los linfocitos T autorreactivos, así como CPA, que comprenden M ϕ y CDs. Las citocinas inflamatorias secretadas por estas células (TNF- α , INF- γ , IL-12, IL-1 β y MIF) contribuyen a la expansión y mantenimiento de la respuesta inflamatoria que destruye a las células β de los islotes pancreáticos, dando lugar a la insulitis. La insulitis es fácilmente detectable a nivel tisular debido a la deformación de los islotes β pancreáticos (como se muestra en la figura A) (43).

El proceso de destrucción de las células β pancreáticas inicia cuando las CPA, en especial M ϕ y CDs, presentan antígenos correspondientes a la célula β pancreática (antígenos propios) a los linfocitos TCD4⁺ naïve a través del complejo principal de histocompatibilidad (MHC-II). Posteriormente, el proceso continúa a través de la señalización de una serie de interleucinas que activan a los linfocitos TCD4⁺ y los linfocitos TCD8⁺, los cuales son los causantes directos de la muerte de la célula β pancreática. La muerte de las células β resulta en la liberación de antígenos intracelulares permitiendo que las células presentadoras de antígeno reconozcan, secuestren y procesen los antígenos propios. Por tanto, las células “clave” en el

inicio de la insulinitis son las CPA por el reconocimiento de los antígenos propios y la consecuente activación de linfocitos T, amplificando el inicio de la respuesta autoinmune (27).

Células presentadoras de antígeno (CPA): Células dendríticas (CDs) y Macrófagos (Mφ)

Actualmente no hay duda que las CPA tienen una participación importante en la autoinmunidad pueden presentar auto-antígenos a los linfocitos T naïve provocando una respuesta autorreactiva (44). El sistema inmune es uno de los más complejos en el organismo sus principales funciones consisten en el reconocimiento del amplio repertorio de microorganismos, la detección de regiones neoplásicas procedentes de una amplia gama de tejidos, y durante la ejecución de éstas tareas, el mantenimiento de la tolerancia periférica por la supresión de respuestas perjudiciales contra tejidos propios (respuestas autoinmunes). Las CDs son componentes críticos en la realización de la respuesta inmune para cumplir con estos papeles (45).

Las CDs fueron descubiertas en 1973 por Ralph Steinman y Cohn Zanvil en órganos linfoides secundarios de ratones (45). Son células vigilantes que poseen una morfología “estrellada” (figura 3) muy particular y una habilidad incomparable para estimular las células T naïve (46). La interacción CD- célula T se da inclusive en ausencia de infecciones (47). Los múltiples subtipos de CDs de los órganos linfoides de ratón se definen con base a la expresión de los marcadores de superficie: CD11c, MHC-II, CD11b y CD205 (48).

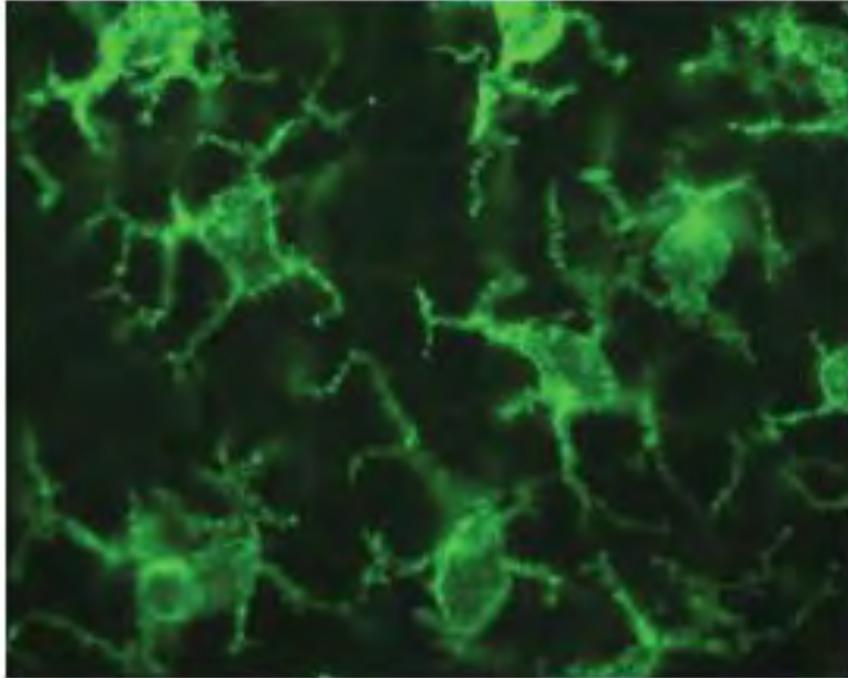


Figura 2. Imagen de células dendríticas publicadas por Ralph M. Steinman en el año 2007. Se observan células dendríticas (CDs) marcadas con Langerina (conocido como CD207) en verde (46).

Las CDs provienen de monocitos de médula ósea que se desarrollan por la acción del factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos o GM-CSF (del inglés Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor). Las CDs salen de la médula ósea y migran a los tejidos periféricos así como órganos linfoides secundarios (49). En los órganos linfoides, las CDs tiene una gran capacidad endocítica y expresan niveles bajos de moléculas del MHC, por medio de la cual se presentan los péptidos antigénicos a los linfocitos T (proceso comúnmente llamado **señal 1**). Estos precursores de CDs también expresan bajos niveles de moléculas co-estimuladoras (por ejemplo: CD40, CD80 y CD86), también llamado **señal 2** requeridas para la activación de las células T (50).

En ausencia de infección, daño de tejido o inflamación, las CDs que se desarrollaron en órganos linfoides secundarios mueren en estado inmaduro con una tasa de vida

media menor a una semana de vida. Las CD_s que se desarrollan en tejidos periféricos migran constitutivamente a los órganos linfoides donde adquieren la maduración fenotípica caracterizada por una alta expresión de MHC y moléculas co-estimuladoras (51). El término estado estacionario (del inglés *steady-state*) en las CD_s es comúnmente utilizado para referirse a las CD_s presentes en la periferia y en órganos linfoides secundarios en ausencia de inflamación o infección. En un estado estacionario las CD_s no secretan citocinas, requeridas para la activación inmunogénica de las células T (**señal 3**). Si las CD_s o M ϕ presentan antígenos a una célula T sin una correcta expresión de moléculas co-estimuladoras, esta muere, pierde su capacidad de ser efectora (célula T inmunogénica) o se convierte en célula T reguladora cuya función es inhibir más que promover una respuesta inmune (52). Por tanto, las CD_s en un estado estacionario son tolerogénicas.

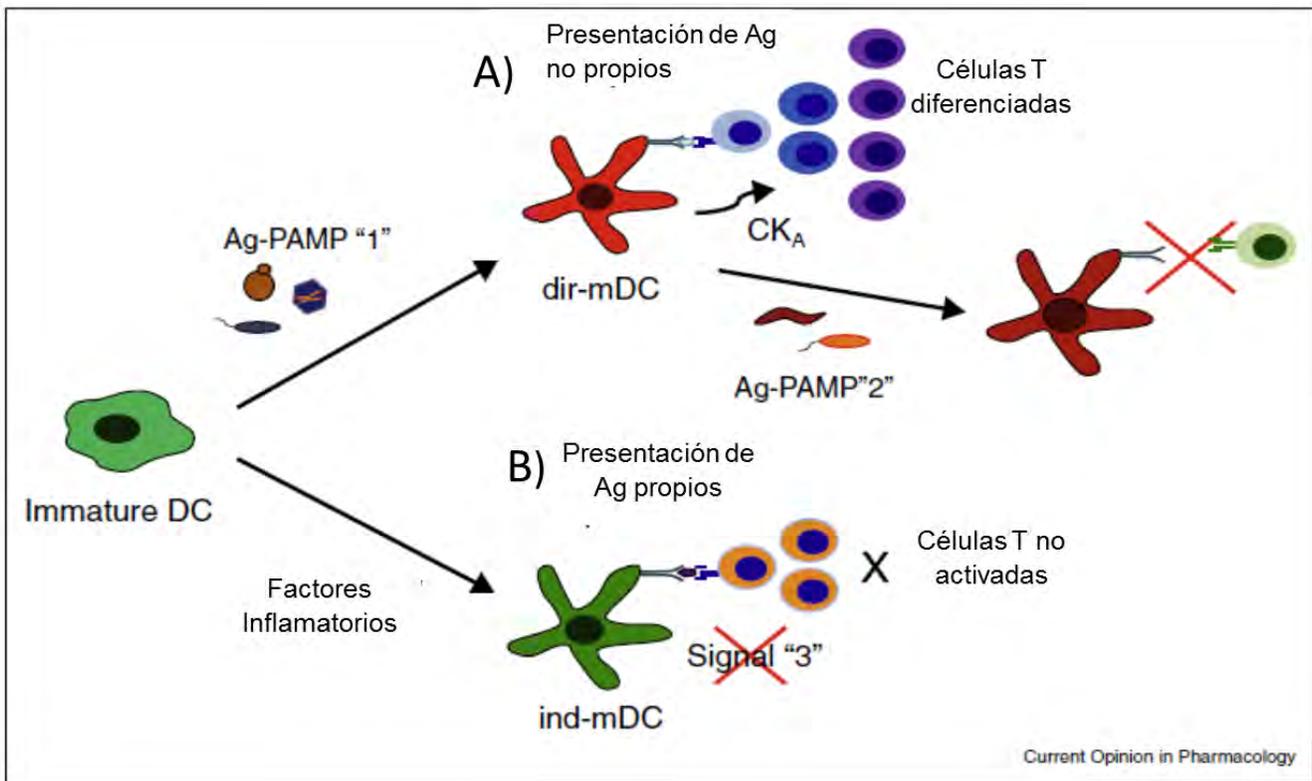


Figura 3. Activación de las células dendríticas. Las células dendríticas pueden ser activadas directamente por medio de los patrones moleculares asociados a patógenos PAMPs o indirectamente por mediadores de inflamación producidos por células hematopoyéticas. A) Células dendríticas activadas y maduras presentan el antígeno directamente (dir-mDC) para activar las células T, además de producir citocinas (señal 3) que inducen la diferenciación de las células T. B) Células dendríticas maduras indirectamente por factores de inflamación. Al no haber antígenos extraños capturados no pueden emitir la señal 3 y por tanto no activan a las células T (55).

Por otro lado, cuando una CD reconoce una molécula asociada a una infección, daño de tejido o inflamación, se induce la diferenciación de la CD a una célula dendrítica inmunogénica y madura. Esta diferenciación se lleva a cabo por el reconocimiento de un antígeno por medio de diferentes receptores que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs)(53,54) y patrones moleculares asociados a peligro (DAMPs) figura 4 (55).

El inicio y propagación de una respuesta inmune es usualmente dependiente de la capacidad de las CDs de capturar antígenos por medio de los PAMPs y DAMPs,

convertir las proteínas en péptidos, unirlos intracelularmente en el MHC-I ó II y expresar el complejo péptido-MHC en la membrana. Las células inmaduras están bien equipadas para capturar antígenos vía pinocitosis, endocitosis y fagocitosis (56).

Una vez que la CD ha capturado un antígeno migra a los órganos linfoides en donde se presentan estos antígenos a los linfocitos T para activarlos. Durante esta migración las CDs cambian su capacidad de respuesta a ciertas citocinas (57), y secretan ciertas quimiocinas que atraen selectivamente a los linfocitos T naïve y maduros (58).

El reconocimiento del complejo péptido-MHC de las CDs por parte del receptor de células T antígeno-específico (TCR) inicia la interacción CD-linfocitoT en donde es de gran importancia la influencia mutua de moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80 y CD86 en las CDs y sus ligandos en los linfocitos T: CD40L, CTLA-4 y CD28, respectivamente (59-61). Las moléculas co-estimuladoras son importantes para sostener y amplificar la activación de los linfocitos T (62). Enfermedades autoinmunes, como DMT1, se caracterizan por la pérdida de la tolerancia contra antígenos propios auto-activando el sistema inmune y provocando inflamación, así como destrucción de tejidos. Por lo tanto, la capacidad inmunosupresora de las CDs inducida por ingeniería genética es un enfoque atractivo para trastornos autoinmunes como DMT1 (63).

Otra CPA importante en el proceso de insulinitis es el Mφ clásicamente activado. Los Mφ son células presentes en prácticamente todos los tejidos y juegan un papel clave en el desarrollo de los mismos (dirigiendo la conformación del tejido), en la respuesta inmune a patógenos (generando una respuesta inflamatoria), vigilando y

siguiendo cambios en el tejido (actuando como centinelas y células efectoras) y especialmente en mantener la homeostasis del tejido (en la limpieza de las células apoptóticas y por la remodelación y reparación de los tejidos) (64). Los M ϕ son derivados de células madre de médula ósea pertenecientes al linaje monocito-granulocítico, el cual es expuesto a citocinas como el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) e IL-3. La diferenciación de células madre está asociada a la expresión de receptores de membrana específicos para citocinas. Los monocitos permanecen en la médula ósea < 24 h y posteriormente pasan al torrente sanguíneo para distribuirse por todo el organismo. Normalmente, en adultos sanos, la vida media estimada de los monocitos circulantes es de 70 horas. Los monocitos constituyen el 1-6% de los leucocitos totales en sangre periférica de individuos sanos. Después de pasar de las paredes capilares hacia el tejido conectivo, los monocitos se convierten en M ϕ . Este proceso de diferenciación incluye muchos cambios celulares como el incremento de tamaño, incremento en número y complejidad de los organelos e incremento en la capacidad fagocítica, entre otras (65). La función de los M ϕ es fagocitar los agentes “extraños” en el cuerpo, esto incluye microbios, partículas e incluso elementos propios del organismo como células apoptóticas y reciclan nutrientes de productos de deshecho de tejidos. Estas células están normalmente en un estado de reposo, pero pueden ser activadas por una variedad de estímulos durante la respuesta inmune (66).

La actividad de los M ϕ se incrementa por la acción de las citocinas secretadas por los linfocitos T como INF- γ . Los M ϕ llevan a cabo la quimiotaxis e inician la respuesta inmune ya que son de las primeras células que reconocen y tienen contacto con el

Ag. Esto es en parte debido a la expresión de receptores tipo Toll y scavenger que reconocen específicamente a lectinas, lipoproteínas, proteínas, oligonucleótidos, polisacáridos y otras moléculas. Además de la expresión del complejo principal de histocompatibilidad (MHC)-II con el cual los M ϕ y las CDs presentan el antígeno a los linfocitos T, al activarse, los linfocitos T secretan citocinas que a su vez activan a los linfocitos B que maduran a células plasmáticas y secretan anticuerpos específicos contra los antígenos presentados por los M ϕ (67). La activación de los M ϕ (figura 5) clásicamente activados (M1) se lleva a cabo en respuesta a INF- γ , lipopolisacáridos y otros ligandos de los receptores tipo Toll (68,69). Los M ϕ M1 orquestan una respuesta inflamatoria temprana inducida normalmente por infecciones y daño en tejido. Los M ϕ M1 activados producen óxido nítrico (NO), TNF- α , IL-1 β , IL-12, IL-18 y quimiocinas como CCL15, CCL20, CXCL8-11 y CXCL13 a través de la vía NF κ B (68-70). Estos M ϕ se caracterizan por la alta expresión de MHC-II y moléculas co-estimuladoras necesarias para la correcta presentación de antígeno como CD80/86 (71-73) e intervienen en la activación de linfocitos Th1 y Th17. Por otro lado, los M ϕ M2 se caracterizan por que se diferencian en presencia de IL-4/IL-13, presentan una mayor expresión del receptor de IL-4 (IL-4R) y receptores de manosa (MR) y producen citocinas involucradas en la proliferación de linfocitos Th2 y Treg (Figura 5) (74).

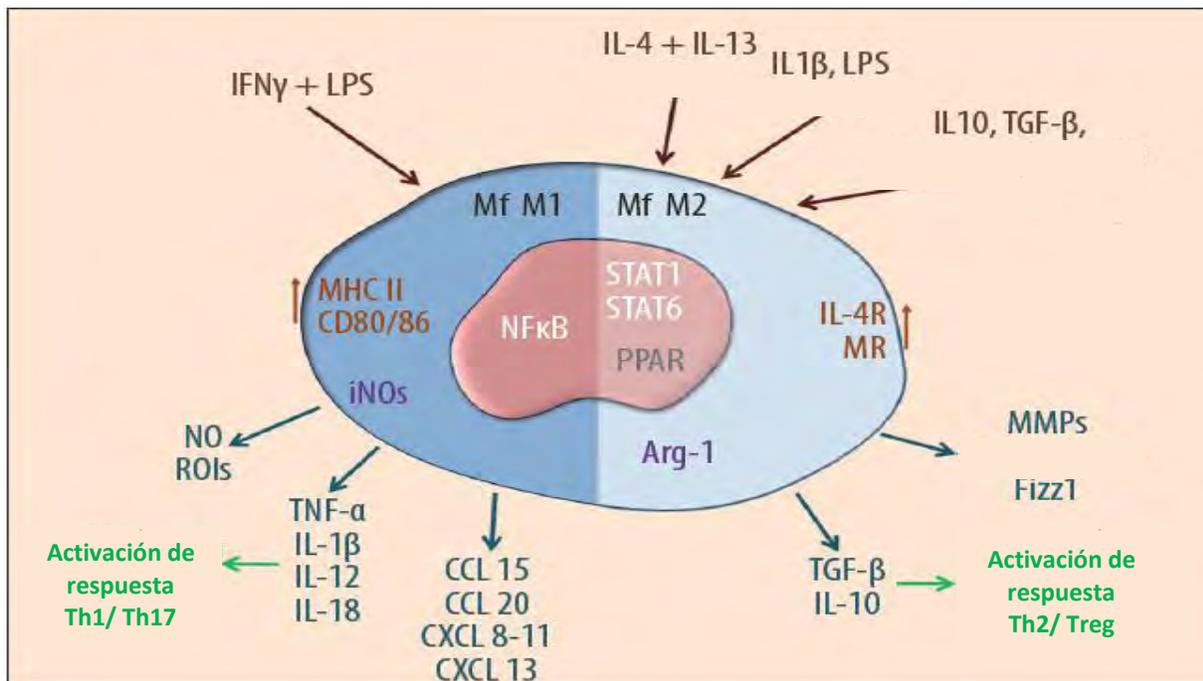


Figura 4. Características distintivas entre M ϕ M1 y M2. Los M ϕ clásicamente activados (M ϕ CA) o M1 expresan MHC-II y CD80/86 y se diferencian en presencia de IFN- γ y LPS. En consecuencia, producen citocinas y quimiocinas inflamatorias, así como especies reactivas de oxígeno por medio de iNOS. Por otro lado, los M ϕ alternativamente activados o M2 (M ϕ AA) que se diferencian en presencia de IL-4/IL-13 presentan una mayor expresión del receptor de IL-4 (IL-4R) y receptores de manosa (MR) y producen citocinas involucradas en la proliferación de linfocitos Th2 y Treg (74).

Los M ϕ residentes de la microglía, piel, hígado, páncreas y bazo se caracterizan por tener una expresión alta del marcador F4/80 (64), molécula que se ha utilizado ampliamente para la identificación de macrófagos de ratón en condiciones normales y patológicas. F4/80 es una glicoproteína con 7 dominios trans-membranales de ~160 kDa (75). Los M ϕ completamente maduros (F480⁺) presentan características que le permiten el fácil reconocimiento de antígenos presentes en el microambiente, como una gran cantidad de proyecciones plasmáticas denominadas filipodos (Figura 6).

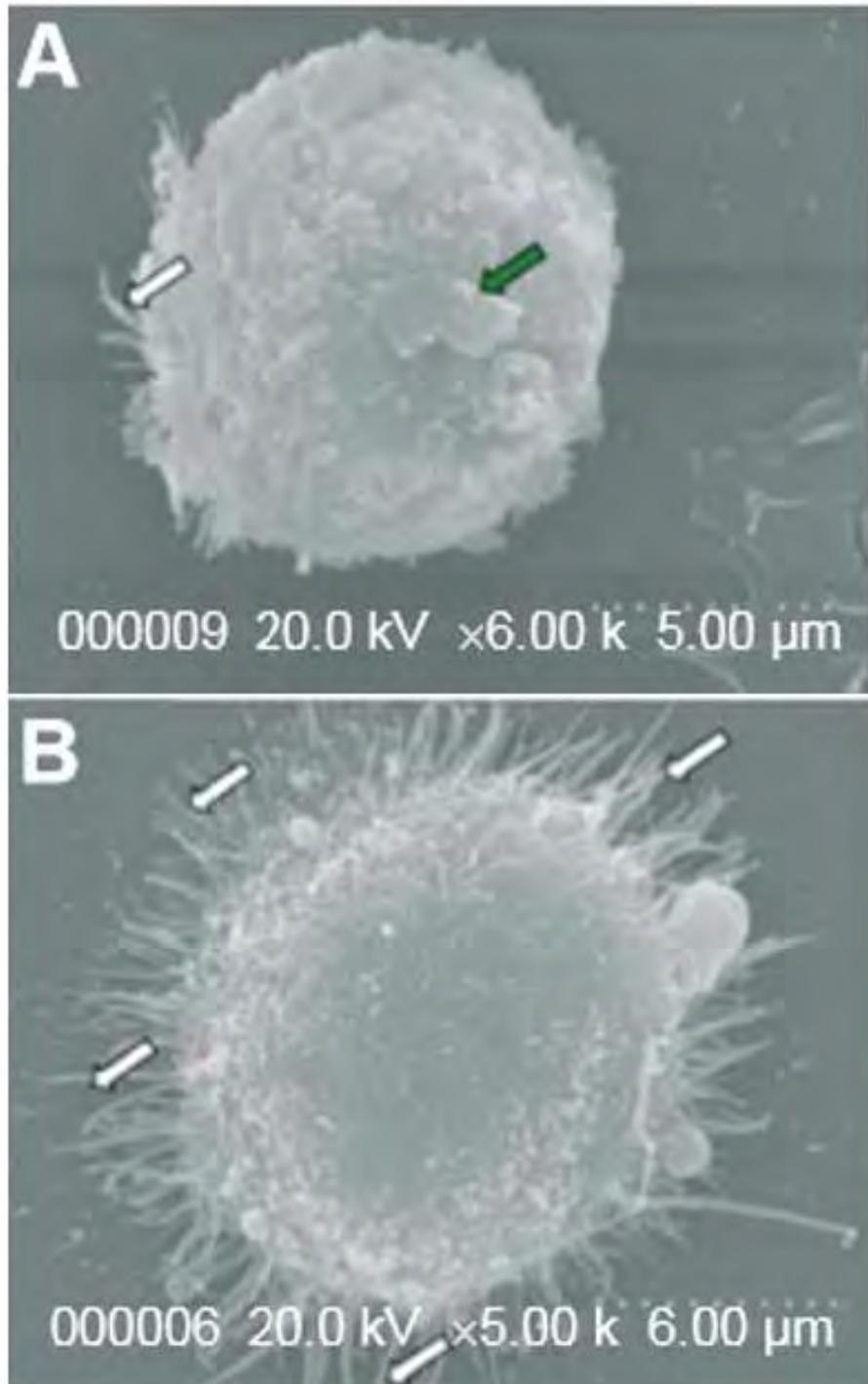


Figura 5. Microscopía electrónica donde se muestran las características morfológicas de Mφ. A) no activado en donde no se aprecian proyecciones plasmáticas o filópodos. B) Mφ activado, donde se observan claramente los filópodos (76).

Presentación de antígeno y moléculas co-estimuladoras

Complejo principal de histocompatibilidad (MHC- SEÑAL 1)

Después de que los Mφ y CDs capturan los antígenos que se han reconocido como extraños, los sustratos proteínicos son procesados por los proteosomas dentro de estas CPA para ser fragmentados en péptidos. Los péptidos entonces son expuestos en la superficie de la célula a través del MHC en ratón o HLA en humano. Hasta ahora se han reconocido dos moléculas de MHC: MHC-I y MHC-II. Las moléculas de MHC-I presentan péptidos de origen intracelular al sistema inmune y están involucradas en la activación de linfocitos TCD8⁺. El tamaño de los péptidos presentados por MHC-I varía entre 7 y 9 aminoácidos (77).

Por otro lado, la molécula de MHC-II guarda una gran similitud comparado con la molécula MHC-I. MHC-II está compuesto de dos cadenas heterodiméricas de superficie unidas a la membrana de las células epiteliales del timo y CPA, las cuales, posterior al reconocimiento de antígeno, se encuentran cargadas con un péptido corto degenerado que proporciona estabilidad y diversidad al complejo. Estos péptidos se derivan de proteínas propias o de proteínas extrañas de los agentes patógenos, la microbiota y otros. Las células TCD4⁺ reconocen estos péptidos cargados en el MHC-II a través de los receptores de la célula T (TCR), este es un punto de control crítico que determina que las células T sean seleccionadas para la activación y movilización de la respuesta inmune adaptativa (78).

La combinación de auto-péptidos y moléculas MHC instruyen a los timocitos a sobrevivir o perecer, dependiendo de la afinidad/avidez con que se une el TCR al MHC. Es decir, a través de la selección positiva o negativa los timocitos que se unen

a MHC cargados con péptidos propios, ya sea con avidez de intensidad intermedia-baja o alta y son instruidos para sobrevivir o perecer, respectivamente (79).

Como resultado, el repertorio de las células T periféricas se compone en gran parte por células T capaces de reconocer únicamente péptidos foráneos, esto forma parte de la auto-discriminación de lo propio en la inmunidad adaptativa minimizando el riesgo de causar autoinmunidad. Sin embargo, la selección negativa del timo no es un proceso “hermético,” y como resultado, algunas ocasiones se evade la selección negativa (80,81), con lo que se puede desarrollar la autoinmunidad así que debe de haber mecanismos reguladores adicionales, como la inducción de anergia o apoptosis inducida por APC tolerogénicas (82).

Como se mencionó, el proceso de presentación de antígeno y activación de las células T, la exposición de los péptidos a través del MHC al TCR constituye la señal 1. La segunda señal la constituyen las moléculas co-estimuladoras, por ejemplo: CD40, CD80 y CD86, requeridas para la activación de las células T (50).

Moléculas co-estimuladoras (SEÑAL 2)

CD40 es una molécula de 48 kDa y es una proteína transmembranal tipo I, formada por una α -hélice transmembrana con un dominio transmembranal de 193 aminoácidos. CD40 fue caracterizado inicialmente en células B, pero también es expresado en CD4, monocitos, plaquetas y M ϕ , así como células no hematopoyéticas como fibroblastos, células epiteliales y endoteliales (83-85). El ligando de CD40 es CD54 (CD40L), el cual se expresa en los linfocitos T. La interacción CD40/CD40L induce profundos cambios en las CD4. Se ha demostrado que la acción de CD40 en la superficie de las CD4 promueve la producción de citocinas, la inducción de moléculas co-estimuladoras en su superficie y facilita la presentación cruzada del antígeno (2). El impacto de la señalización de CD40 permite la maduración de las CD4 al promover que adquieran todas las características necesarias para una activación y diferenciación efectiva de los linfocitos T. Además, CD40 es importante para la supervivencia de muchos tipos celulares como las células B, CD4 y células endoteliales, bajo condiciones normales e inflamatorias (86). Las funciones descritas de CD40 resaltan la importancia de ésta molécula durante el inicio y adquisición de la respuesta inmune (87).

CD80 (B71) y CD86 (B72). A finales de la década de los 80's se mostró que la proliferación de las diferentes clonas de las células T falla en ausencia de señales co-estimuladoras (88). La prueba de que la falla en la proliferación de células T era dependiente de la producción de IL-2, llevó a buscar una molécula co-estimuladora responsable de bloquear la cascada de señalización de la IL-2. Esta búsqueda resultó en la identificación de la vía CD28/B7 como una vía co-estimuladora para

los linfocitos T (89,90). La vía CD28/B7 es una de las vías mejor caracterizadas de co-estimulación. La efectividad de la co-estimulación fue demostrada en los 90's en donde se identificaron los dos ligandos de CD28 expresado en las células T: B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86) que se expresan en la superficie de las CPA, figura 7 (91). De hecho, el uso de antagonistas para CD80, CD86 y CD40 son efectivos en el tratamiento de enfermedades autoinmunes (92,93). En ratones, se ha demostrado que debido al bloqueo con anticuerpos anti-CD86 se desarrolla un estado de inmunosupresión *in vitro* e *in vivo*, mientras que el bloqueo de CD80 produce una inmunosupresión pequeña. Sin embargo, si se bloquean las dos moléculas al mismo tiempo se desarrolla una profunda inmunosupresión, además de que se producen Mφ alternativamente activados (94). El bloqueo de CD86 previene el desarrollo de diabetes en ratones NOD (95).

Estudios *in vitro* han demostrado que la proliferación de células T antígeno-específicas, provenientes de ratones transgénicos para el TCR, son sumamente dependientes de la co-estimulación CD28/B7. La interrupción de esta interacción reduce dramáticamente la proliferación celular y la división de las células previamente activadas (93).

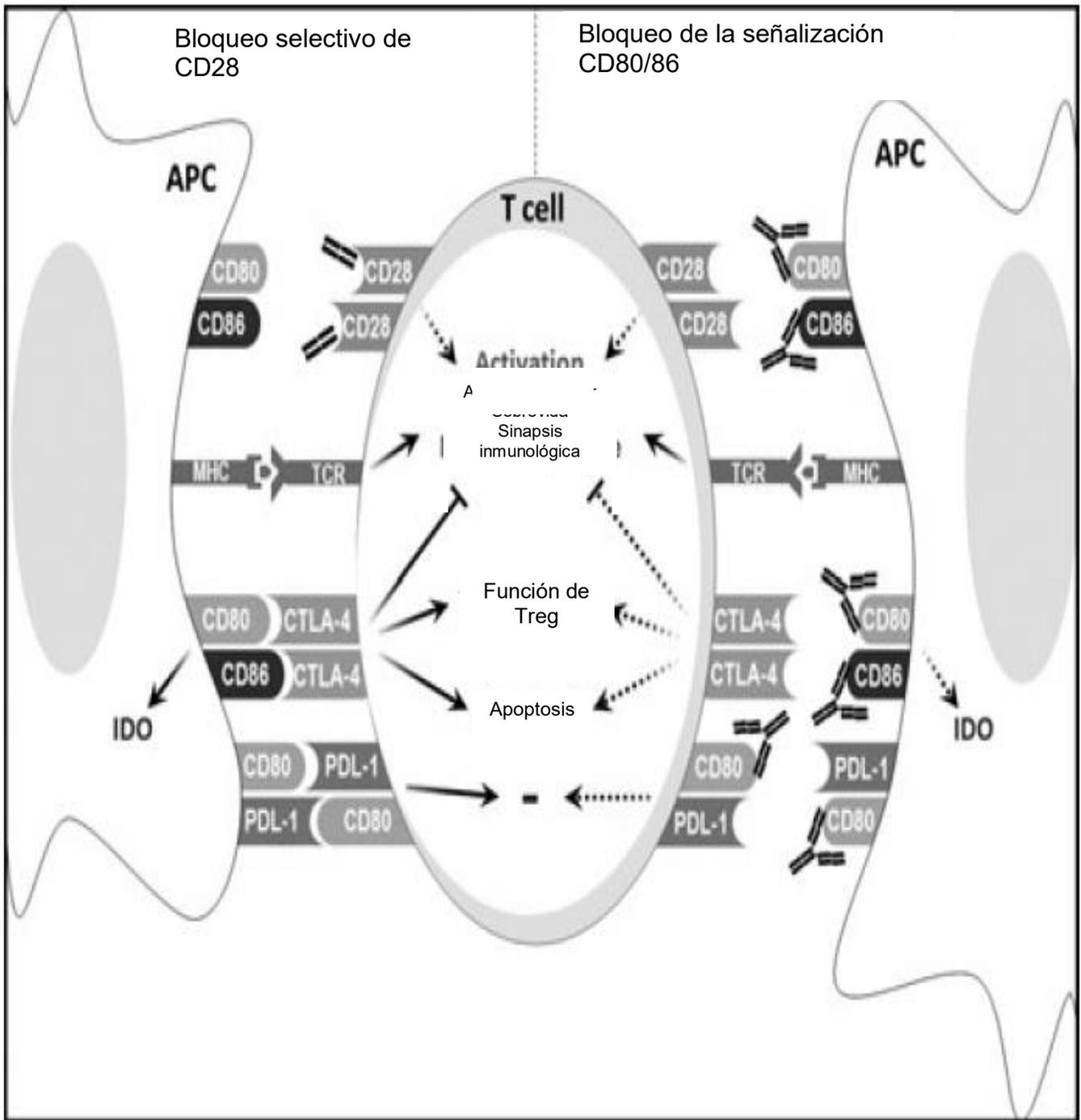


Figura 6. Moléculas co-estimuladoras y vías de señalización implicadas en la unión de B7s con CD28. Las líneas continuas representan vías de señalización activas después de que CD28 o B7 es bloqueado. Las líneas punteadas representan las vías de señalización afectadas de las APC, indoleamine 2,3-dioxygenase (96).

Citocinas requeridas para la activación inmunogénica de las células T (señal 3)

Posterior a la presentación del antígeno por medio de las moléculas MHC y la unión de las moléculas co-estimuladoras presentes en la CPA con los ligandos presentes en las células T, se comienza a amplificar la respuesta por medio de mediadores de inflamación solubles y citocinas. Dependiendo del antígeno y del microambiente en el que se esté llevando a cabo la presentación del antígeno se secretarán diferentes tipos de citocinas que van a mediar específicamente la activación de diferentes clonas de linfocitos T.

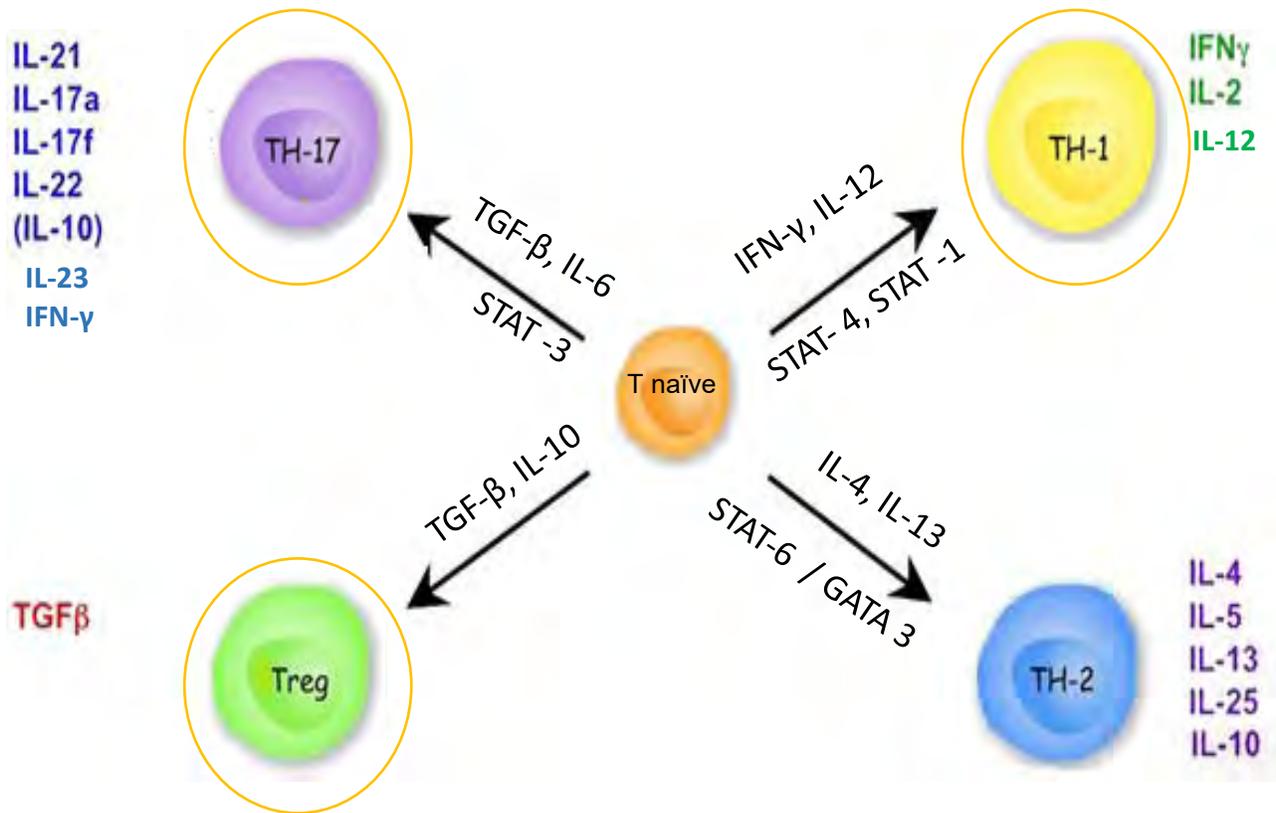


Figura 7. Patrón de citocinas necesarias para la activación de las diferentes clonas de linfocitos, así como las citocinas que se producen por los diferentes tipos de linfocitos T.

Como se muestra en la Figura 8, posterior a la presentación del Ag por parte de las CPA, los linfocitos T vírgenes pueden diferenciarse en diferentes clonas de linfocitos T, dependiendo del microambiente de citocinas presentes. Por ejemplo, los linfocitos Th1 se diferencian en presencia de $\text{INF-}\gamma$ e IL-12. Este tipo de linfocitos promueven una respuesta inflamatoria por medio de la producción de citocinas inflamatorias tipo Th1 como IL-2, $\text{INF-}\gamma$ e IL-12. Los linfocitos Th2 se diferencian en presencia de IL-4 e IL-13 y secretan citocinas anti-inflamatorias como IL-4, IL-5, IL-13, IL-25 e IL-10. Los linfocitos Th1 y Th2 presentan funciones antagónicas (28).

Por otro lado, los linfocitos T reguladores (Treg) se activan en presencia de $\text{TGF-}\beta$ e IL-10 y su función principal es ejercer un auto-control en la respuesta inflamatoria.

Los linfocitos Th17 se activan en presencia de $\text{TGF-}\beta$ e IL-6 y producen citocinas inflamatorias características de este tipo de linfocitos como IL-17 e IL-23, entre otras. Los linfocitos Treg y Th17 presentan de igual manera funciones antagónicas.

Durante la insulinitis se producen altas concentraciones de citocinas inflamatorias como IL-1 β , $\text{TNF}\alpha$, IL-12 e $\text{INF-}\gamma$; las cuales dirigen el proceso de destrucción de las células β pancreáticas (42).

Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF) (Artículo 1 apéndice I)

MIF, originalmente reportado en 1966 por dos diferentes grupos, fue descrito como un producto secretado por la célula T que inhibe la migración azarosa de los M ϕ *in vitro* y promueve la acumulación de M ϕ durante la hipersensibilidad de tipo retardada (97,98).

El gen de MIF en humanos y ratones es 90% homólogo, ya que es una molécula evolutivamente conservada y expresada constitutivamente en muchos tejidos (Figura 9).

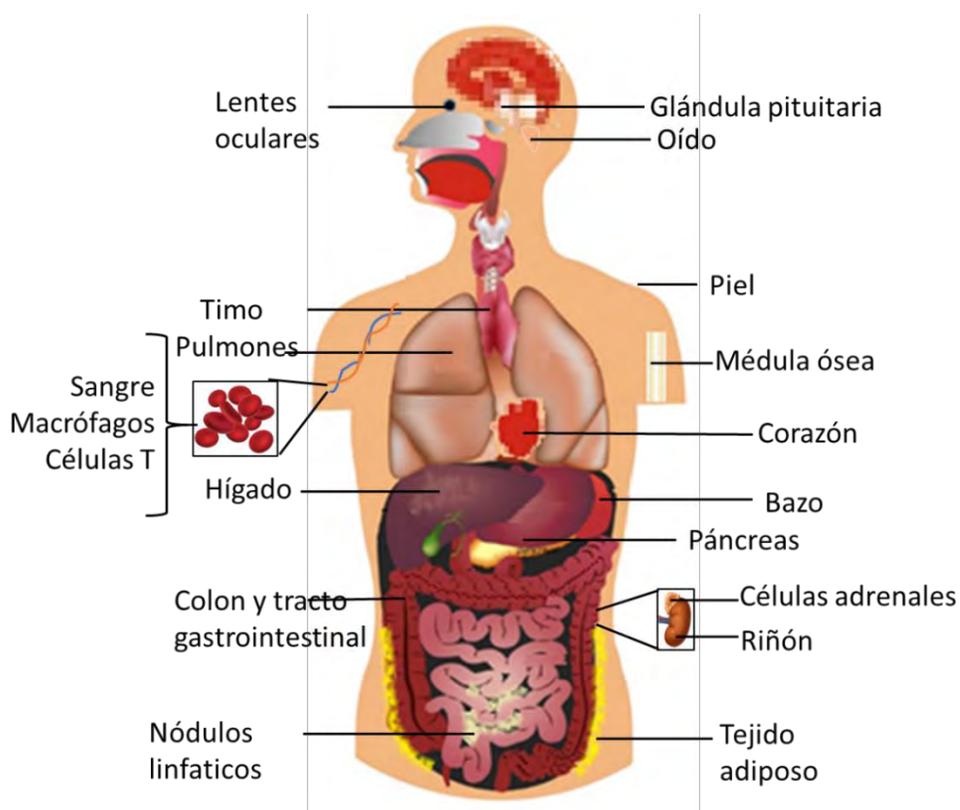


Figura 8. Patrón de expresión de MIF (100).

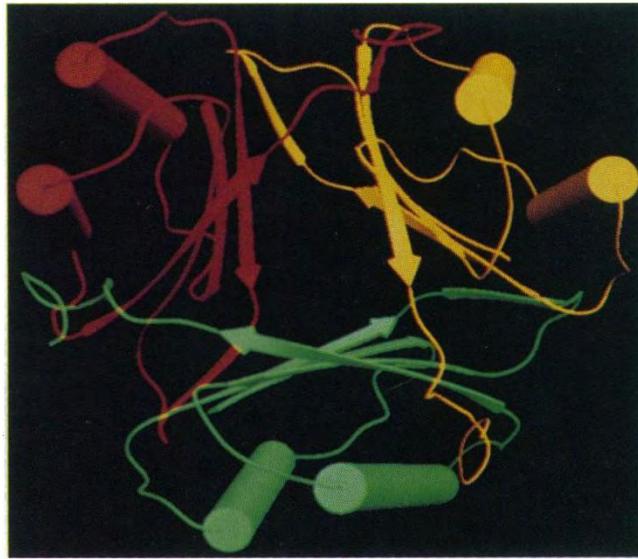


Figura 9. Estructura tridimensional de MIF. MIF está formada por tres estructuras idénticas que configuran un trímero (monómeros). Cada monómero está compuesto por cadenas α (cilindros) y cadenas β (flechas) con seis α -hélices que rodean tres β -hojas que se envuelven completamente para formar un barril con extremos abiertos que forman un canal de disolvente (101,102).

La proteína de MIF (figura 10) tiene un peso molecular de 12.5 kDa (99). MIF se encuentra preformada en vacuolas intracelulares y no requiere de síntesis inmediata antes de su liberación, por lo que se encuentra disponible de manera inmediata. MIF carece de una secuencia líder amino-terminal, lo que indica que es secretada por las células a través de una vía de secreción de proteínas no convencional (99).

Posterior a su descubrimiento, MIF fue analizado en diferentes estudios que lo fueron perfilando a adquirir una importancia en la respuesta inmune (103-105). Fue hasta 1990 cuando MIF fue reconocido como una de las moléculas producidas en el sitio de inflamación y fue descrito como un factor responsable que determina el grado de inflamación (106). Diferentes estrategias experimentales, incluyendo anticuerpos anti-MIF, ratones MIF “knockout” (*Mif*^{-/-}) y ratones transgénicos para

MIF (MIF-Tg) han sido utilizadas para establecer que MIF suprime los efectos inmunosupresivos de los esteroides y para relacionarlo con la producción de citocinas inflamatorias, como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y especies reactivas de oxígeno como el óxido nítrico (107); adicionalmente, se ha visto que MIF actúa como factor de crecimiento (108), regula la expresión de receptores tipo Toll 4 (TLR-4) en células presentadoras de antígeno (109) y sostiene la respuesta inflamatoria ante la inhibición de p53 (110).

Todas las propiedades descritas permiten reconocer a MIF como una molécula crítica en la respuesta inmune innata pro-inflamatoria y en el control de ciertas enfermedades infecciosas y parasitarias (111-113). Por otro lado, se ha demostrado que MIF presenta un papel importante en enfermedades inflamatorias (114,115) así como en choque séptico (116), cáncer (117), enfermedad inflamatoria crónica del intestino (118), artritis reumatoide (119-121), colitis (122) obesidad (123-125) y diabetes (124,126,127). Recientemente, MIF fue propuesto como un bio-marcador de diagnóstico para enfermedades autoinmunes como artritis, colitis ulcerativa y diabetes (122,128,129).

MIF es considerado uno de los factores sobre-expresados en procesos autoinmunes (130).

MIF y células β pancreáticas

Se ha observado que MIF co-localiza en los gránulos secretores de insulina en las células β y que es secretado durante la fase de secreción de la insulina. Lo más

importante en este sentido es que MIF parece poseer actividad autócrina con un efecto de regulación glucosa-dependiente en la secreción de la insulina (43).

A pesar de que MIF está relacionado de forma homeostática con la secreción de la insulina, en un estado de homeostasis alterado (como la presencia de inflamación) MIF podría actuar de manera diferencial y destructiva que puede llevar a la apoptosis de la célula β pancreática (142,143). Aparentemente, MIF no es una molécula extraña en el microambiente de las células β pancreáticas y puede actuar en respuesta a la concentración de glucosa y en presencia de inflamación (100). Con la información antes mencionada se puede concluir que la participación de MIF en la patología de la DMT1 está bien documentada. Sin embargo, es desconocido el punto exacto o los procesos durante el desarrollo de la enfermedad en los que MIF pudiera tener una relevancia decisiva para la aparición de la enfermedad. Tomando en cuenta que no hay cura para esta enfermedad crónico-degenerativa, el entendimiento de los procesos iniciales del desarrollo de la enfermedad nos puede ayudar a establecer la etiología de la enfermedad que pudieran revelar blancos terapéuticos que, combinados con los tratamientos actuales, pudieran ayudar al control y mejor calidad de vida de las personas que presentan esta enfermedad.

JUSTIFICACIÓN

En humanos diagnosticados con DMT1, se ha encontrado que las concentraciones de MIF en sangre son estadísticamente superiores a las encontradas en los individuos sanos (131); las concentraciones normales de MIF en plasma humano oscila entre 2.3 - 8.4ng/ml (132). Es bien sabido que MIF promueve la producción de ciertas citocinas inflamatorias como IL-1 β y TNF- α , las cuales son sobre-producidas en complicaciones propias de estados avanzados de DMT1 como la cetoacidosis (133), lo que hace posible que las concentraciones de MIF se encuentren igualmente elevadas en este punto.

El estudio de MIF se simplificó gracias al desarrollo de los ratones *Mif*^{-/-} (134). Usando estos ratones como una herramienta, se ha observado que MIF es una molécula de gran importancia en el inicio de la función de islotes singénicos transplantados, ya que el bloqueo de MIF resultó en el éxito del trasplante (135). Además, sabemos que MIF participa en la DMT1 controlando las actividades funcionales de los monocitos/ M ϕ y células T modulando sus habilidades de secreción de moléculas pro-inflamatorias (43).

En este contexto, se ha propuesto que MIF puede mediar la expresión de moléculas co-estimuladoras en M ϕ y CDs afectando también la proliferación de los linfocitos T (136,137).

Adicionalmente, se ha reconocido a MIF como una molécula importante en el desarrollo de las complicaciones de la DMT1 como disfunción cardiaca

asociada a la señalización de AMPK (138), pie diabético (139) y se sabe que promueve la apoptosis de islotes pancreáticos inducida por ácido palmítico y citocinas inflamatorias (140). Posterior a la neutralización exitosa de MIF por medio de fármacos, MIF fue propuesto como un blanco terapéutico para el tratamiento de la DMT1 (43,141).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El origen de la DMT1, sin lugar a dudas, radica en la deficiencia en la producción de insulina debida a la destrucción de tipo autoinmune de los islotes β pancreáticos, proceso en el que MIF puede tener una participación clave. El proceso autoinmune destructivo se lleva a cabo por el infiltrado de múltiples tipos celulares, como linfocitos T, B, M ϕ y CPA (insulitis); así como la acción de diversas citocinas inflamatorias como MIF. La comprensión del inicio de la insulitis en la fase de presentación de antígenos propios puede revelar nuevos blancos terapéuticos que, al combinarse con los ya existentes, podrían aumentar la efectividad en el control de la enfermedad, incluso en un diagnóstico temprano podría evitarse la insulitis y tal vez evitar la propagación de la enfermedad.

HIPÓTESIS

Si MIF interviene en la capacidad de expresión de moléculas co-estimuladoras en M ϕ y CDs, determinando su estado de maduración/ diferenciación y, por tanto, su capacidad de presentación de antígenos propios en el islote pancreático, entonces MIF promueve el infiltrado celular en los islotes pancreáticos y la insulitis en la DMT1 experimental.

OBJETIVOS

Objetivo general

Bajo un modelo de DMT1 experimental, determinar la influencia de MIF en la maduración de M ϕ y CD8 y en el desarrollo de la insulinitis.

Objetivos específicos

- 1) Establecer el modelo de inducción de DMT1 con múltiples dosis de estreptozotocina (STZ) en ratones control WT y en ratones *Mif*^{-/-} de fondo genético Balb/c.
- 2) Determinar si hay deficiencias en la expresión de moléculas co-estimuladoras en M ϕ y CD8 de ratones *Mif*^{-/-} en el modelo de DMT1 experimental.
- 3) Determinar si M ϕ y CD8 de ratones *Mif*^{-/-} tienen disminuida la capacidad para iniciar una respuesta inflamatoria eficiente que pueda disminuir la insulinitis en la DMT1 experimental.
- 4) Evaluar el efecto de la restitución de MIF en ratones *Mif*^{-/-} en el modelo de DMT1 experimental.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para establecer la viabilidad del modelo de diabetes autoinmune experimental...

se utilizaron ratones machos de 8 semanas de edad con fondo genético BALB/c silvestres (WT) y genéticamente deficientes de MIF (*Mif*^{-/-}), los cuales fueron inducidos por el método de múltiples dosis de estreptozotocina (STZ) vía intraperitoneal (i.p.) (144), dosis de 40 mg/kg durante 5 días seguidos. Se mantuvieron en condiciones estériles en las instalaciones del BIOTERIO de la FES-Iztacala durante todo el tiempo experimental con libre acceso a comida y agua. Brevemente, los ratones WT y *Mif*^{-/-} se mantuvieron en ayuno durante 8 horas antes de ser inyectados con STZ (40 mg/kg de peso), disuelta en buffer de citratos (citrato de sodio al 0.05M a un pH de 4.5, apéndice 2). Los ratones control negativo de cada grupo fueron inyectados con un volumen equivalente de buffer de citratos.

Después de una semana post-inducción con STZ se midieron los niveles de glucemia y los ratones que presentaron entre 150 y 200 mg/dL de glucosa en sangre fueron incluidos en los grupos experimentales. Los grupos experimentales y controles fueron monitoreados a lo largo de 8 semanas posteriores a la inducción (p.i.). Por otro lado, los ratones *Mif*^{-/-} fueron retados con una dosis mayor de STZ (80mg/kg de peso) para corroborar la efectividad de la STZ en estos animales.

Análisis de la expresión y producción del GLUT-2 por RT-PCR y PCR tiempo real

Se sacrificaron ratones sanos WT y *Mif*^{-/-} sanos a los cuales se les extrajeron los islotes pancreáticos por medio de digestión en colagenasa y gradiente de Ficoll (SIGMA-ALDRICH, México) apéndice 3. Después de aislar los islotes de cada grupo se extrajo el RNA con TRizol (SIGMA-ALDRICH, México); la concentración de RNA fue determinada por absorbancia a 260 nm y la integridad del RNA se determinó por medio de electroforesis en gel de agarosa. El DNA de una cadena (cDNA) se sintetizó con 0.5µg del RNA total por medio de transcripción reversa con 500U de SSRT II (SIGMA, México). La amplificación de GLUT-2 se evaluó utilizando los siguientes primers: GLUT2, 5'-TCACACCAGCATAACAACA-3' y 5'-ACACTTCGTCCAGCAATGA-3', la amplificación fue de 35 ciclos. Las muestras fueron analizadas en geles de agarosa por duplicado (apéndice 3).

Análisis de la expresión de GLUT-2 en membrana en los islotes pancreáticos en ratones WT y MIF^{-/-} sanos

Se determinó la expresión de GLUT-2 en membrana por el método de inmunofluorescencia indirecta (apéndice 3) utilizando el anticuerpo primario α insulina de cobayo (concentración 1:2000) (Santa Cruz Biotechnology) y Ac secundario α anti-GLUT-2 de cobayo conjugado con FITC (concentración 1:100). Las muestras fueron analizadas y fotografiadas en un microscopio de fluorescencia (Zeiss) con cámara digital acoplada.

Determinación de insulina y marcadores inflamatorios (citocinas en suero)

Los niveles de insulina en sangre se determinaron por el método de ELISA-Sándwich (Merckodia, North Carolina USA) utilizando el protocolo establecido por el fabricante. Se midieron los niveles de glucosa en sangre semanalmente y hasta las 8 semanas posteriores a la inducción (glucómetro Accucheck ®, México). Las concentraciones de citocinas pro y anti-inflamatorias de IL-12, IFN- γ , IL-17, MIF, IL-4, IL-13, IL-6 e IL-10 se determinaron según el protocolo establecido por el comerciante (Murine standard ABTS development kit, PeproTech, México DF, México). Brevemente, posterior a la administración de STZ se tomó una muestra semanal de sangre por medio de un corte transversal en la vena caudal. La sangre fue centrifugada a 2500 rpm para extraer el suero. El suero fue almacenado a -20°C hasta su uso. Los niveles se detectaron por el método de ELISA-Sándwich con el kit respectivo a cada citocina (Peprotech).

Elaboración de Ag total de islote pancreático (AgTIP)

Se sacrificaron ratones WT sanos de 8 semanas de edad a los cuales se les extrajeron los islotes pancreáticos por medio de digestión en colagenasa y gradiente de Ficoll (SIGMA-ALDRICH). Brevemente, posterior a su extracción, el páncreas fue cortado en trozos de aproximadamente 2mm con tijeras de disección (Krown or stainless). Se añadió solución de colagenasa IV (Sigma, México), en solución de Hanks (GIBCO ® México) en una concentración de 1mg/ml por cada órgano disectado y se colocó en baño de agitación a 36° durante 10 min hasta disolver el tejido. Inmediatamente después se paró la reacción con solución de Hanks fría y se

centrifugó durante 10 min a 2000 rpm. Se retiró el sobrenadante, se lavó con 20 ml de solución de Hanks y se centrifugó nuevamente a 2000 rpm. Finalmente, se retiró el sobrenadante y la pastilla se disolvió en 5 ml de Ficoll al 27% en un tubo Falcon de 50 ml; posteriormente se agregaron 3 ml de Ficoll al 23% suavemente y por las paredes del tubo para no romper del gradiente, seguido de 3 ml de Ficoll al 21% y 19% vertidos dentro del tubo con el mismo cuidado. Una vez formado el gradiente, se centrifugó por 15 min a 2000 rpm sin aceleración ni freno. Después de centrifugar, se extrajo el tejido ubicado entre el 23 y 21% de Ficoll, en el cual se concentran los islotes pancreáticos. Los islotes se lavaron 2 veces con solución de Hanks para retirar el Ficoll y posteriormente los islotes fueron recopilados manualmente, la membrana celular de los islotes fue desintegrada utilizando un sonicador (Biogen). Una vez homogénea la muestra, se determinó la concentración de proteínas totales por el método de Lowry (apéndice 3).

Determinación de IgG1 e IgG2a en suero

El AgTIP se utilizó para determinar la concentración de anticuerpos IgG1 e IgG2a específicos para AgTIP en sangre por el método de dilución limitante en suero de ratones WT y *Mif*^{-/-} sanos y a diferentes tiempos posteriores a la inducción con STZ. Brevemente, una placa de 96 pozos para ELISA (Costar) se cubrió con 100 μ l por pozo de AgTIP a una concentración de 5 mg/ml en buffer Tris pH 7.8. Las placas se incubaron toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavaron con PBS-Tween-20 0.05%, apéndice 3 (PBS-T; Merck, France) y fueron bloqueadas con PBS suplementado con 1% de suero fetal bobino (PBS-BSA al 1% Sigma Aldrich GE) por una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron con PBS-Tween

20 tres veces. Se colocaron 50µl de muestra la primera columna de la placa y se diluyeron serialmente a la mitad a través de la fila correspondiente y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Después de ser lavadas con PBS-Tween, las placas fueron incubadas por 45 min a temperatura ambiente con anticuerpos acoplados a peroxidasa de cabra anti-ratón anti IgG1 e IgG2a a una concentración de 1:1000 respectivamente (Zymed, San Francisco, CA, USA). Las placas fueron lavadas y reveladas con una solución ABTS (Zymed), la absorbancia fue medida a 405nm en un lector de ELISAS (Epoch, Mexico City, Mexico).

Análisis histológico de islotes pancreáticos

Se hizo un análisis histológico de los islotes pancreáticos, los cuales fueron fijados, cortados y teñidos por hematoxilina-eosina (HE- apéndice 3) para evaluar el infiltrado celular en ratones WT y *Mif*^{-/-} sanos y a las 8 semanas posteriores a la inducción con STZ. Además, se hizo una clasificación del grado de infiltrado celular (pérdida de morfología circular de los islotes pancreáticos), se evaluaron 30 islotes pancreáticos (30 islotes = 100%) de cada grupo experimental.

Evaluación de activación/ maduración de Mφ y CDs deficientes de MIF en el modelo de diabetes autoinmune experimental

Para evaluar la expresión de moléculas co-estimuladoras en Mφ y CDs de ratones WT y *Mif*^{-/-} se extrajeron las células totales de órganos linfoides cercanos al páncreas como bazo y ganglio mesentérico, además de células de la cavidad peritoneal por perfusión. Las células aisladas de cada órgano se trataron con anticuerpos específicos para CD80, CD86, CD40, TLR-2, TLR-4 y MHC-II (BD

Biosciences, EUA). Brevemente, se colocaron 1×10^6 células en tubos eppendorf de 1.5 ml, las cuales se tiñeron con 2 $\mu\text{g/ml}$ del Ac respectivo en 100 μl de buffer para FAC's (apéndice 3) durante 40 min a 4°C en oscuridad. Pasado el tiempo, las células fueron lavadas 2 veces con buffer de FAC's para retirar el Ac no acoplado. Las muestras se analizaron por citometría de flujo FACS CALIBUR (BD Calibur, USA).

Análisis in vivo de la capacidad de respuesta de M ϕ y CDs de ratones Mif $^{-/-}$

Para analizar la capacidad de iniciar una respuesta inflamatoria eficiente se hicieron co-cultivos de M ϕ de ratones WT y Mif $^{-/-}$ tratados con STZ con linfocitos naïve sanos de ratones transgénicos para ovoalbúmina (Tg OVA) en presencia de antígeno OVA (10 $\mu\text{g/ml}$) y concanavalina A (ConA 2 $\mu\text{g/ml}$) como control positivo; se evaluó la capacidad de proliferación celular por el método de incorporación de timidina tritiada ([^3H]-TdR), 0.5 μCi por pozo (18 hrs antes del tiempo de cosecha del cultivo). Cumplido el tiempo, los cultivos fueron cosechados y analizados en un contador de centelleo.

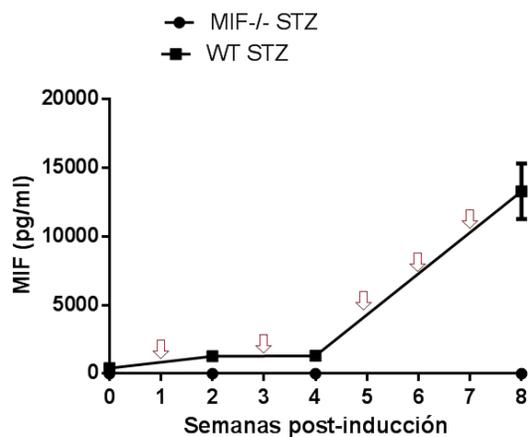
Análisis de la expresión de células CD4 $^{+}$, CD8 $^{+}$ y CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ FOXP3 $^{+}$ Treg por citometría de flujo

Brevemente, se extrajo una muestra de sangre de ratones de los grupos WT y Mif $^{-/-}$ sanos y con 8 semanas post- inducción con STZ a los cuales se les extrajo 500 μl de sangre periférica de la vena caudal y fue depositada en tubos BD Vacutainer® (BD México) los cuales contienen EDTAK $_2$ como anticoagulante. Los eritrocitos fueron descartados por medio de choque osmótico con solución

hemolizante (apéndice 3) y posteriormente fueron incubados con los respectivos Ac para moléculas de membrana (CD4-PE y CD25-APC) y se incubaron por 20 min, posteriormente las células fueron permeabilizadas e incubadas con el Ac anti FOXP3 (Alexa Flour®) durante 40 min (Mouse Treg Flow™ Kit FOXP3 Alexa Fluor® 488/CD4 APC/CD25 PE BioLegend). Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo FAX CALIBUR (BD Calibur, USA).

Restitución de MIF a nivel sistémico

Tomando como base los niveles observados en sangre de MIF en los ratones WT sanos y durante las 8 semanas posteriores a la inducción con STZ, nos dimos a la tarea de extrapolar las concentraciones de MIF en suero de ratones WT con STZ a las 3, 4, 6 y 8 semana posteriores a la inducción (figura 11). Posterior a la restitución de MIF en ratones *Mif*^{-/-}-STZ, se les extrajo sangre semanalmente para medir glucosa en sangre y concentración de citocinas y se analizó la expresión de moléculas en células de bazo como ya se explicó anteriormente.



Semana post-inducción con STZ	Concentración pg/ml
0	400
1	850
2	1280
3	1292
4	1305
5	4300
6	7300
7	10200
8	13274

Figura 11. Concentraciones semanales de MIF en sangre de ratones WTSTZ utilizadas para sustituir la concentración sistémica de MIF en ratones MIF -/- STZ. Las flechas rojas en la gráfica indican los puntos de las concentraciones de MIF que se tomaron en cuenta para la restitución.

Cuantificación de producción de citocinas en esplenocitos de ratones WT y Mif-/- sanos y a las 8 semanas p.i. con STZ por RT-PCR.

Para la extracción de mRNA se utilizaron ratones WT y *Mif*^{-/-} sanos y con 8 semanas p.i. con STZ a los cuales se les diseccionó el bazo. Los esplenocitos totales fueron obtenidos en esterilidad por perfusión con solución salina (10 ml por órgano), posteriormente fueron centrifugados a 2000 rpm por 10 min a 4°C. Se retiró el sobrenadante y la pastilla de células obtenida fue resuspendida en 10 ml de solución hemolizante (apéndice 3) por 10 min a 4 °C. Pasado el tiempo, se paró la reacción con 10 ml de medio D-MEM complementado al 10% (apéndice 3). Las muestras fueron centrifugadas a 2000 rpm por 10 min a 4°C. La pastilla fue lavada dos veces con 10 ml de medio D-MEM para retirar por completo la solución hemolizante. A las pastillas obtenidas se le agregaron 500 µL de Trizol® (SIGMA-ALDRICH) y fueron

congeladas a -70°C para la posterior extracción de mRNA. Para la extracción de mRNA, brevemente, a cada muestra se le agregó 200 μL de cloroformo por cada ml de Trizol agregado, fueron incubados durante 10 min a temperatura ambiente y centrifugados a 14000 rpm durante 15min a 4°C . Se tomó el sobrenadante (fase transparente) y se agregaron 500 μL de isopropanol frío por ml de trizol utilizado. Se incubó 10 min y las muestras fueron centrifugadas a 14000 rpm por 15 min a 4°C . La pastilla obtenida fue lavada con 500 μl de etanol al 70%. Se secó el botón a temperatura ambiente y fue resuspendido en 20 μL de agua mQ con inhibidores de RNAsas.

Para la síntesis del cDNA, se utilizaron 1000ng de mRNA por muestra, se le agregó 1 μL de OLIGO-DT y se incubó a 70°C por 15 min en el termociclador. Posteriormente a cada muestra se le añadió 1 μL de buffer 5X (Tris-KCL), 2 μL de DTT, 1 μL de DNTPs y 1 μL de transcriptasa reversa y se incubaron a 37°C durante 1 h y 70°C por 25 min. Se agregaron inhibidores de RNAsas (10 u/ μl) y se almacenaron las muestras a -70°C hasta su uso. Se cuantificaron las muestras por longitud de onda (280/260 nm) en un espectrofotómetro (EPOCH, Biotek).

Para la cuantificación de citocinas por el método de RT-PCR se utilizaron 1000 ng de cDNA y la enzima Hot Start Taq DNA Polymerase (FERMENTAS) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las secuencias utilizadas fueron las siguientes:

GAPDH (201pb) F-CTC ATG ACC ACA GTC CAT GC, R-CAC ATT GGG GGT AGG AAC AC; T° de alineación 54°C (145). **IL-1 β** (502pb) F-CCC ATACTT TAG GAAGACACGGATT, R- TCATGGGATGATGATGATAACCTGCT; T° de alineación 59°C (146). **IL-10** (237pb) F-ACC TGG TAG AAG TGA TGC CCC AGG CA, R-CTA

TGC AGT TGA TGA AGA TGT CAA A; T° de alineación 56°C (147). **TGF-β** (195pb) F-GCC CTT CCT GCT CCT CAT, R-TTG GCA TGG TAG CCC TTG; T° de alineación 52°C (148). **TNF-α** (307pb) F-GGC AGG TCT ACT TTG GAG TCA TTG C, R-ACA TTC GAG GCT CCA GTG AAT TCG; T° de alineación 59°C (146). **Foxp3** (112pb) F-GGC CCT TCT CCA GGA CAG A, R-GCT GAT CAT GGC TGG GTT GT; T° de alineación 56°C (149). Las condiciones de amplificación fueron: 95°C por 5', 94°C por 40", 52°C-59°C (dependiendo del primer utilizado) por 40", 72°C por 30", 72°C por 4" y 4°C por 10 min; de 35 a 40 ciclos dependiendo del primer utilizado. Los productos obtenidos por RT-PCR se pasaron por un gel de agarosa al 0.5% (apéndice 3) por electroforesis para su posterior análisis. Las imágenes de electroforesis obtenidas (Fotodocumentador BioRad GEL DOC™ EZ System, México) fueron analizadas con el programa Photoshop para obtener los pixeles correspondientes a cada banda. Con los valores obtenidos se hizo una normalización a partir de los valores de GAPDH.

Estadística

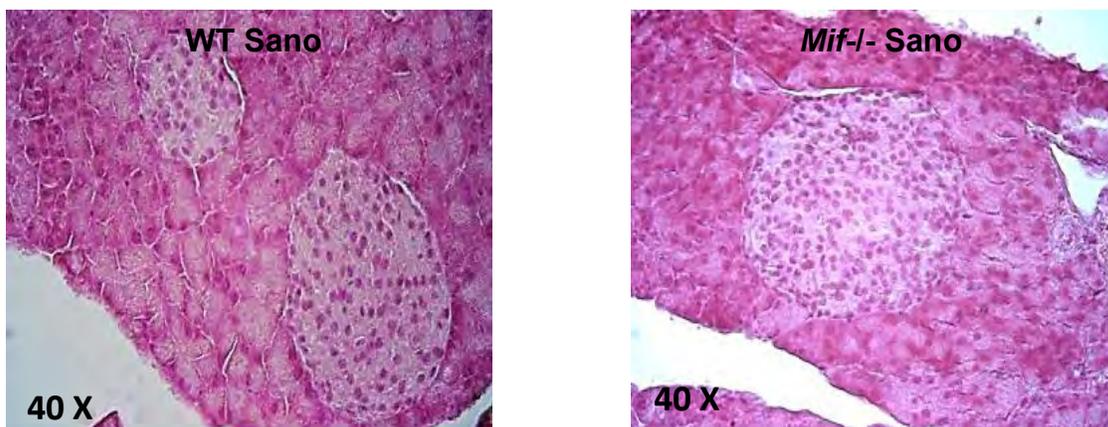
Los resultados fueron analizados en GraphPad Prism 6 usando las pruebas estadísticas "t" de Student, una * p<0.05 fue considerada estadísticamente significativa. Para el análisis de anticuerpos se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney.

RESULTADOS

El uso de ratones genéticamente modificados para MIF (*Mif*^{-/-}) ha causado controversia, debido a que cabe la posibilidad de que, al ser modificado un gen, no solo se vea afectada la transcripción de éste, sino que además se vean afectadas otras proteínas que pudiesen enmascarar el efecto real de la proteína blanco. Es por ello que el primer objetivo en este trabajo fue evaluar el mecanismo de acción de la STZ en los ratones WT y *Mif*^{-/-}, para verificar que el efecto de la STZ sea comparable en los dos grupos experimentales.

Validación del modelo. La ausencia de MIF no modifica la morfología de los islotes pancreáticos

Se evaluó la morfología de los islotes pancreáticos, en los ratones sanos WT y *Mif*^{-/-}. Como se observa en la figura 12, los islotes sanos de ambos grupos experimentales presentaron una estructura bien definida; tienen una morfología circular, y es posible distinguirlos entre el tejido arcinar.



*Figura 10. Análisis histológico de los islotes pancreáticos de ratones sanos WT y *Mif*^{-/-} por el método de HE. Los islotes de ambos grupos no presentan alteraciones morfológicas aparentes.*

La ausencia de MIF no modifica la transcripción y expresión de GLUT-2

Los islotes pancreáticos de ratón están conformados por un 75% de células β , 19% de células α y un 6% de células δ (150). Las células β actúan como sensores sistémicos que detectan la presencia de glucosa en sangre a través del transportador de glucosa 2, GLUT-2 por sus siglas en inglés (151).

La STZ, fármaco que se utilizó en este trabajo para la inducción de diabetes autoinmune, es internalizada a la célula β pancreática a través del GLUT-2 ya que su estructura química es muy semejante a la estructura de la glucosa (152).

De acuerdo con lo anterior nos dimos a la tarea de determinar la expresión del GLUT-2 en la membrana de los islotes pancreáticos de ratones WT y *Mif*^{-/-} sanos, para lo cual realizamos una inmunofluorescencia para la expresión de GLUT-2 en membrana (figura 13 a).

Como se observa en la figura 13 A los islotes de ambos grupos presentan una fluorescencia similar de manera no cuantitativa. Esto fue corroborado determinando la expresión del transcrito del gen que codifica para GLUT-2 por RT-PCR y PCR tiempo real (Figura 13 B y C) obtuvimos que tanto los ratones *Mif*^{-/-} como los WT sanos no presentaron diferencia en la transcripción del GLUT-2 y esta tendencia se mantuvo inclusive después de la inducción con la STZ.

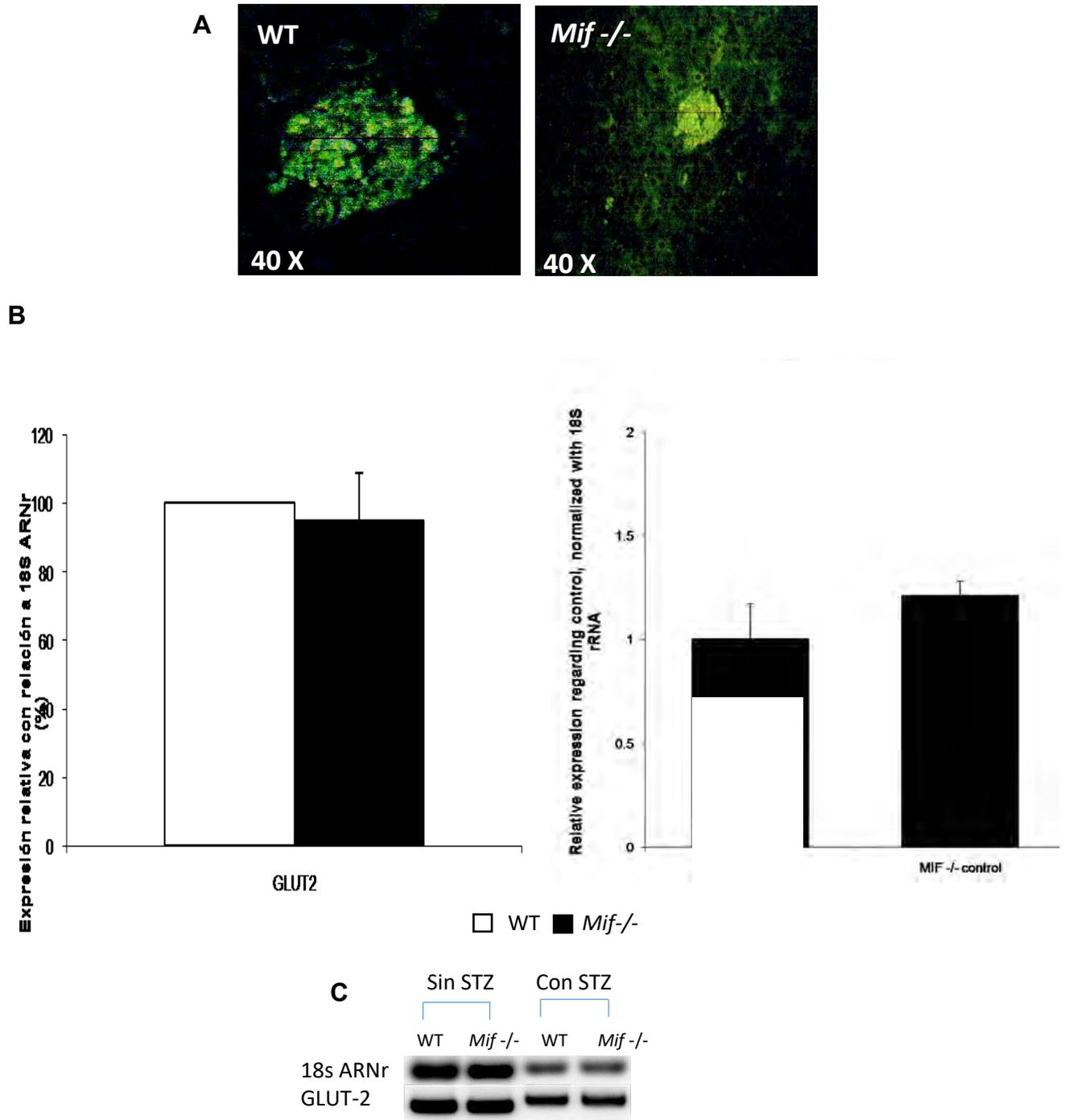
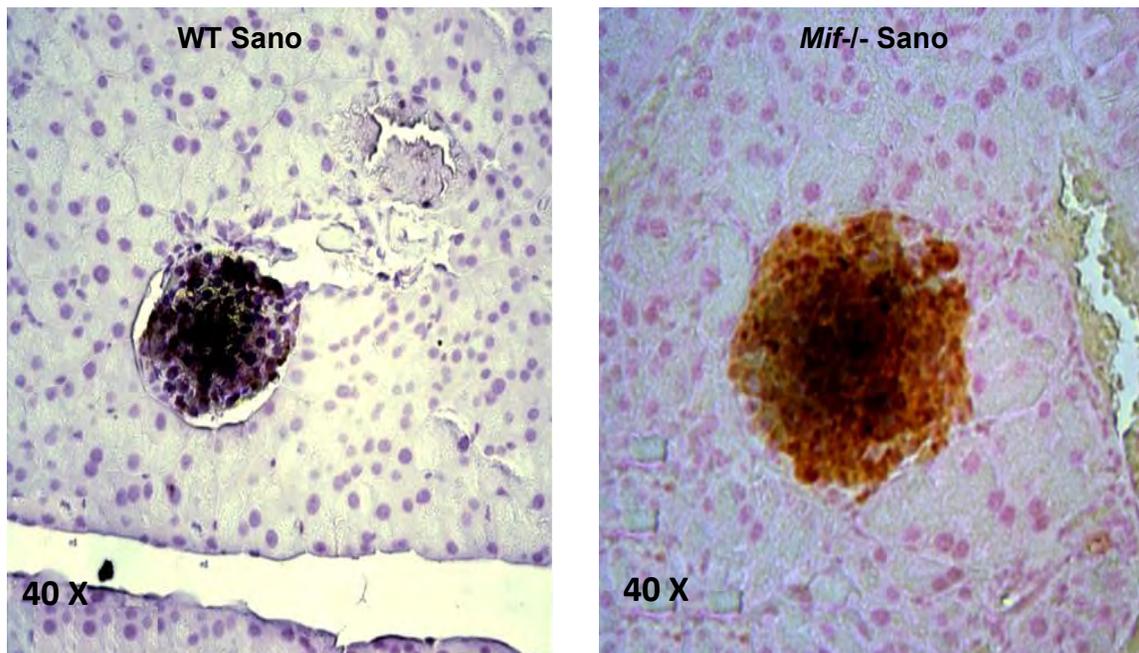


Figura 13. Cuantificación cualitativa de la transcripción y expresión de GLUT-2 en los islotes pancreáticos de ratones WT y *Mif*^{-/-} sanos. A) análisis por inmunofluorescencia de la expresión de GLUT-2 en membrana de las células β de los islotes pancreáticos. B) Cuantificación del transcripto de GLUT-2 tanto por RT-PCR como por PCR tiempo real. C) Cuantificación del transcripto para GLUT-2 antes y después de la inducción con STZ en ambos grupos.

La producción de insulina en ratones *Mif*^{-/-} sanos es igual que en los ratones WT

Por otro lado, examinamos la producción de insulina de islotes de ratones *Mif*^{-/-} y ratones WT sanos a las 8 semanas de edad por medio de la técnica de inmunohistoquímica. Observamos que la insulina se concentró en el centro del islote pancreático en ambos grupos (figura 14).



*Figura 11. Presencia de insulina en los islotes pancreáticos de ratones WT y *Mif*^{-/-} sanos, por medio de inmunohistoquímica.*

Además, se determinó la producción de insulina mediante la cuantificación de insulina en sangre en ratones sanos WT y *Mif*^{-/-} por el método de ELISA. Como se puede observar en la figura 15, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos.

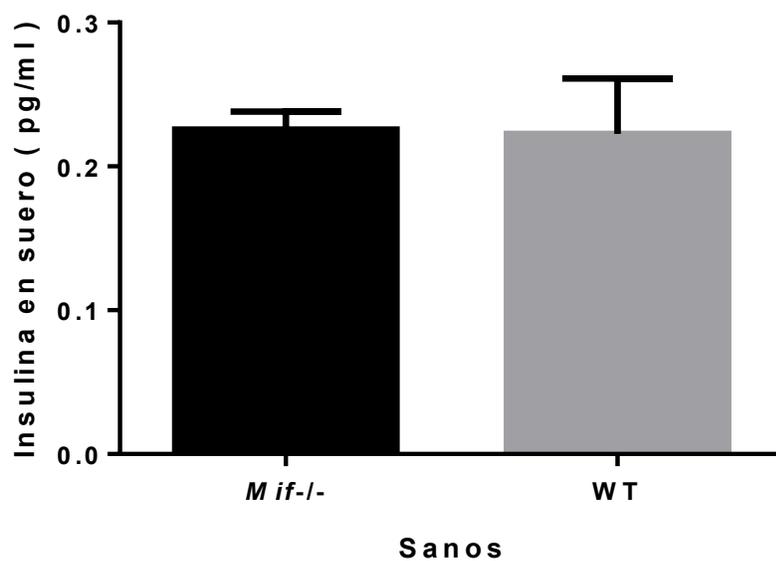


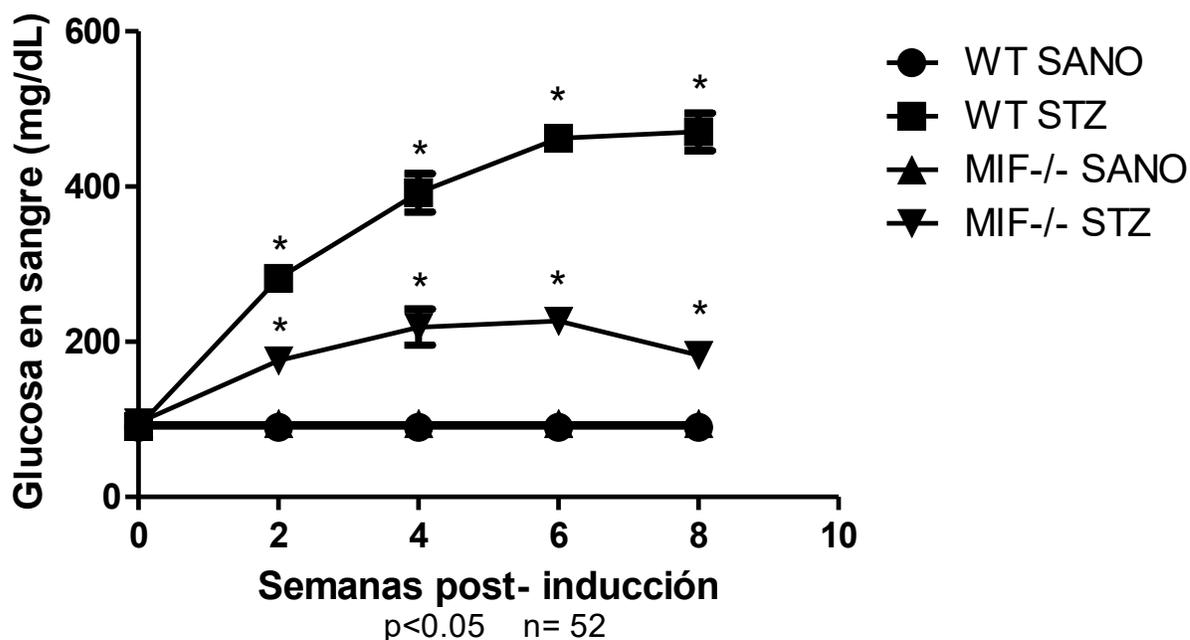
Figura 12. Concentración de insulina en sangre en ratones WT y *Mif*^{-/-} sanos. Como se su puede observar, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos. $n=25$, “t” de Student $p>0.05$, GraphPad Prism.

CONCLUSIÓN 1. Con base a los resultados anteriores, se puede concluir que no hubo evidencia de que hubiera alguna predisposición inherente a las características genéticas de los ratones *Mif*^{-/-} comparado con los WT que sesgara los resultados entre los ratones WT y *Mif*^{-/-} en cuanto al efecto de la STZ se refiere.

En el modelo de inducción de diabetes autoinmune, MIF influye en el desarrollo de la hiperglucemia

Una vez que corroboramos que tanto los ratones *Mif*^{-/-} y WT sanos presentan las mismas condiciones en el islote pancreático, tratamos ratones de ambos grupos con STZ y los monitoreamos por 8 semanas. Como se observa en la gráfica 1, los ratones WT alcanzaron niveles superiores a los 200 mg/dL de glucosa en sangre a partir de la segunda semana p.i., y este efecto se mantuvo hasta la 8° semana p.i.

Contrariamente, los ratones deficientes de MIF apenas lograron superar los 200 mg/dL de glucosa en sangre durante la cuarta y sexta semana p.i., sin embargo para la 8° semana p.i. las concentraciones de glucosa en sangre se encontraron por debajo del parámetro que los califica como diabéticos (gráfica 1 triangulo invertido negro).

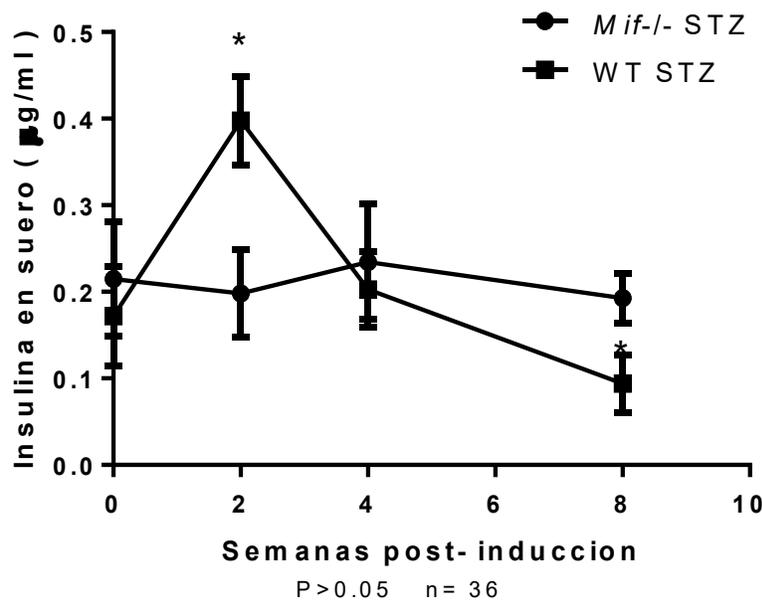


Gráfica 1. La ausencia de MIF evita que se desarrolle hiperglucemia en un modelo murino de diabetes autoinmune. A partir de la segunda semana y hasta las 8 semanas del experimento los ratones WT presentaron concentraciones de glucosa en sangre por arriba de 200 mg/dL, mientras que los ratones *Mif*^{-/-} STZ no presentan tales incrementos de glucosa en sangre. El punto 0 representa los niveles basales en ambos grupos. “*” de Student $p < 0.05$.

La ausencia de MIF evita la disminución de insulina en sangre posterior a la inducción con STZ

Considerando que la diabetes tipo uno es insulino dependiente es de gran importancia la disminución de la insulina en la enfermedad, por lo que medimos los niveles de insulina en sangre de ratones *Mif*^{-/-} y WT sanos e inducidos con STZ.

Observamos que no hubo diferencias estadísticamente significativas en la producción basal (sanos) en ambos grupos (gráfica 2, semana 0 p.i.). Lo anterior correlaciona con la detección de insulina por medio de inmunohistoquímica en islotes pancreáticos en donde no se observaron diferencias entre los 2 grupos (figura 14).

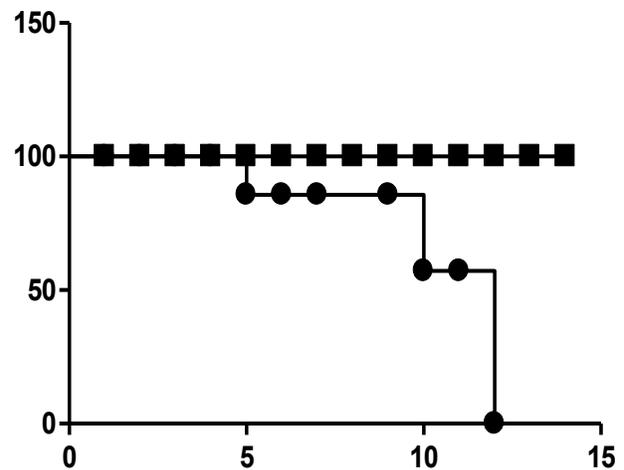


Gráfica 2. Concentración de insulina en sangre. Las producciones basales de insulina de ambos grupos no presentan diferencias estadísticas. Posterior a la inducción con STZ la concentración de insulina en ratones WT revelan un proceso compensatorio durante la semana 2 y decaen por debajo de los basales a la semana 8, mientras que los ratones deficientes en MIF no sufrieron cambios. El punto 0 representa los niveles basales en ambos grupos. n=25, “t” de Student *p<0.05 GraphPad Prism 6.

Sin embargo, después de la inducción con STZ, los ratones WT STZ presentaron un incremento en la concentración de insulina (gráfica 2, semana 2 p.i.). Durante la cuarta semana no se observaron diferencias significativas entre los grupos, pero en la semana 8 posterior a la inducción los niveles de insulina en sangre de los ratones

WT STZ disminuyeron aproximadamente la mitad comparado con las concentraciones iniciales en el mismo grupo.

Por otro lado, es importante resaltar que durante las 8 semanas experimentales los niveles de insulina en sangre de los ratones *Mif*^{-/-} STZ no sufrieron cambios. Para corroborar que la STZ estaba actuando en los ratones *Mif*^{-/-} STZ, retamos a los ratones de este grupo al doble de la dosis de STZ (80mg/kg de peso) y se observó que los ratones *Mif*^{-/-} desarrollan hiperglucemias mayores a los 400 mg/dL de glucosa en sangre y el 100% de los animales perecen a los 13 días post-inducción (gráfica 3). De esta manera se corroboró que la STZ si tiene efecto en los ratones *Mif*^{-/-} únicamente a dosis altas.



Gráfica 3. Niveles de glucosa en sangre en ratones *Mif*^{-/-} retados con 80mg/kg de STZ y sobreviva. *n*=10, "t" de Student *p*<0.05, GraphPad Prism 6.

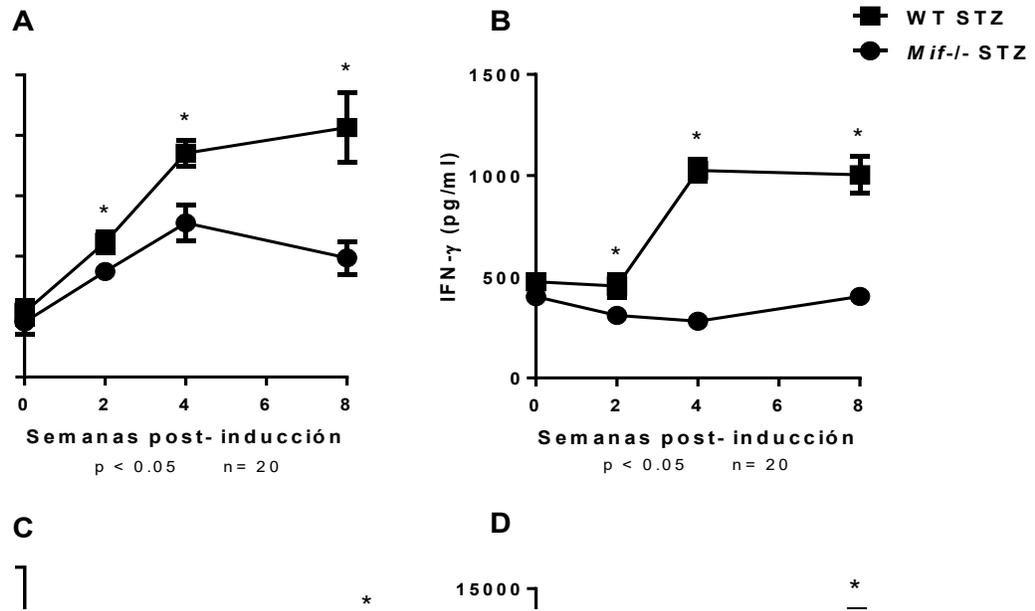
MIF participa en la producción de citocinas inflamatorias sistémicas en el modelo de diabetes autoinmune

Otro de los criterios de diagnóstico para la diabetes autoinmune, además de la hiperglucemia y la presencia de insulina en sangre, son las altas concentraciones de marcadores inflamatorios, por lo cual medimos en sangre los niveles de citocinas inflamatorias más representativas.

Las citocinas comúnmente relacionadas con la diabetes tipo 1 son; IL-12, INF- γ , IL-17 y MIF, entre otras. Nosotros observamos que en los ratones *Mif*^{-/-} STZ, la IL-12 tuvo un ligero incremento que alcanzó su máximo pico en la semana 4, sin embargo, este incremento fue significativamente menor que el incremento observado en los ratones WT STZ (Gráfica 4 A). Por otro lado, los niveles de INF- γ en los ratones *Mif*^{-/-} STZ no presentaron ningún incremento, mientras que en los ratones WT STZ si se observó un incremento significativo en los ratones WT STZ desde la segunda semana post-tratamiento (gráfica 4B).

En el caso de la interleucina 17 (IL-17) vinculada con la respuesta inflamatoria Th17 (153), no se observaron diferencias entre los grupos durante las primeras seis semanas posteriores a la inducción, fue hasta la semana 8 p.i. cuando se presentaron diferencias estadísticamente significativas, ya que los ratones WT STZ produjeron cinco veces más IL-17 (gráfica 4, C).

Por otra parte, la producción de MIF se encontró elevada en los ratones WT, mientras que en los ratones deficientes de MIF no hubo producción del mismo, como era de esperarse (gráfica 4, D).



Gráfica 4. Producción de citocinas inflamatorias el desarrollo de la DMT1. Los ratones WT presentan mayor producción de citocinas inflamatorias mientras que los ratones deficientes de MIF producen niveles menores. Los ratones *Mif*^{-/-} no son capaces de establecer un proceso inflamatorio. El punto 0 representa los niveles basales en ambos grupos. “t” de Student p<0.05, GraphPad Prism 6.

También medimos citocinas anti-inflamatorias como IL-4 e IL-13. De acuerdo con la gráfica 5 A, los ratones *Mif*^{-/-} STZ produjeron mayor cantidad de IL-4 sólo durante la semana 8, mientras que las concentraciones de IL-13 fueron significativamente mayores durante la semana 2 y 4 en el mismo grupo (gráfica 5 B). Lo que sugiere que los ratones *Mif*^{-/-} STZ desarrollaron principalmente una respuesta anti-inflamatoria.

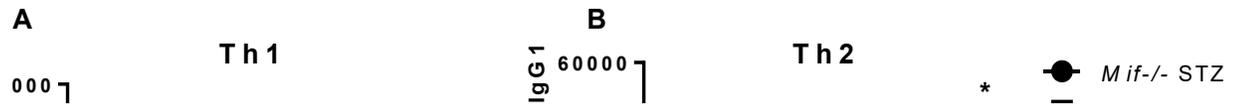


Gráfica 5. Niveles de citocinas anti-inflamatorias en los ratones *Mif*^{-/-} STZ y WT STZ durante las 8 semanas posteriores a la inducción. El punto 0 representa los niveles basales, antes del tratamiento con STZ, en ambos grupos. "t" de Student p<0.05, GraphPad Prism 6.

MIF influye en la producción de anticuerpos específicos para Ag total de Islote β pancreático

La insulinitis es el establecimiento de una respuesta inflamatoria autoinmune dirigida específicamente contra las células β pancreáticas. En este proceso se generan auto-anticuerpos contra diferentes antígenos propios como GAD65, insulina, ZnT8A (41). En este trabajo se midieron dos anticuerpos específicos contra antígeno total de islote pancreático, IgG1 característico de respuestas tipo Th2 anti-inflamatoria e IgG2a característico de una respuesta inflamatoria Th1. Como se observa en la gráfica 6B, los ratones *Mif*^{-/-} STZ produjeron concentraciones más elevadas de IgG1 (Th2). Por el contrario, los ratones WT STZ produjeron mayor cantidad de IgG2a (Th1) a partir de la segunda semana p.i. con STZ (gráfica 6 A). Este resultado concuerda con la producción de citocinas observadas, donde los ratones WT STZ

produjeron mayores concentraciones de citocinas Th1; mientras que los ratones *Mif*^{-/-} STZ produjeron mayores concentraciones de citocinas tipo Th2.

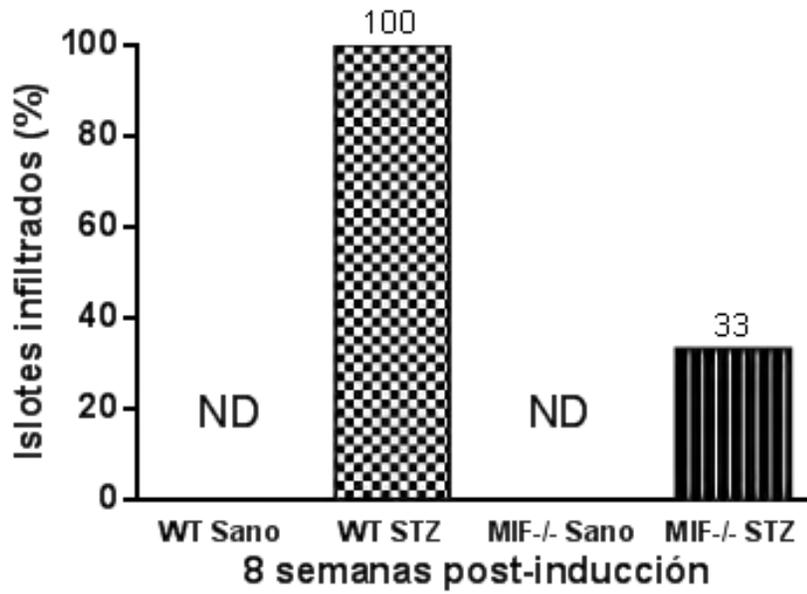


Gráfica 6. Concentraciones de Ac específicos contra AgTIP en suero de ratones *Mif*^{-/-} STZ y WT STZ. El punto 0 representa los niveles basales (antes del tratamiento con STZ) en ambos grupos. “t” de Student $p < 0.05$ GraphPad Prism 6.

CONCLUSIÓN 2. Tomando en cuenta los resultados anteriores podemos concluir que los ratones WT desarrollan un grado de inflamación mayor (determinado por los niveles de citocinas pro-inflamatorias y presencia de IgG2a en sangre). En los ratones *Mif*^{-/-}STZ no se desarrolló una respuesta autoinmune inflamatoria, a pesar del reconocimiento de antígenos propios.

MIF influye en el grado de infiltración de los islotes pancreáticos

Considerando que, ante la ausencia de MIF, no se está desarrollando una respuesta inflamatoria del mismo grado que en los ratones WT en el modelo de diabetes autoinmune a nivel sistémico, buscamos determinar la respuesta *in situ* en éste modelo. De manera que se hizo un análisis histológico de los islotes pancreáticos de ratones *Mif*^{-/-} y WT a las 8 semanas p.i. Observamos que en los ratones *Mif*^{-/-}, solo el 33% de los islotes se encontraron levemente infiltrados, por otro lado, en los ratones WT STZ el 100% de los islotes estaban infiltrados (Gráfica 7) y el infiltrado que presentaron fue mayor comparado con el que presentaron los islotes provenientes de los ratones *Mif*^{-/-}-STZ (Tabla 1). La mayoría de los islotes infiltrados en los ratones WT STZ perdieron por completo la morfología circular, mientras que ninguno de los islotes infiltrados en los ratones *Mif*^{-/-}-STZ perdieron su forma circular (Figura 16), Lo cual correlaciona con la baja producción de insulina en los ratones WT STZ en la semana 8 (Gráfica 2).



Gráfica 7. Porcentaje de islotes infiltrados en ratones WT STZ y *Mif*^{-/-} STZ a las 8 semanas posteriores a la inducción. En los ratones sanos de ambos grupos no se detectaron islotes infiltrados (ND). *t de Student $p < 0.05$, GraphPad Prism 6.

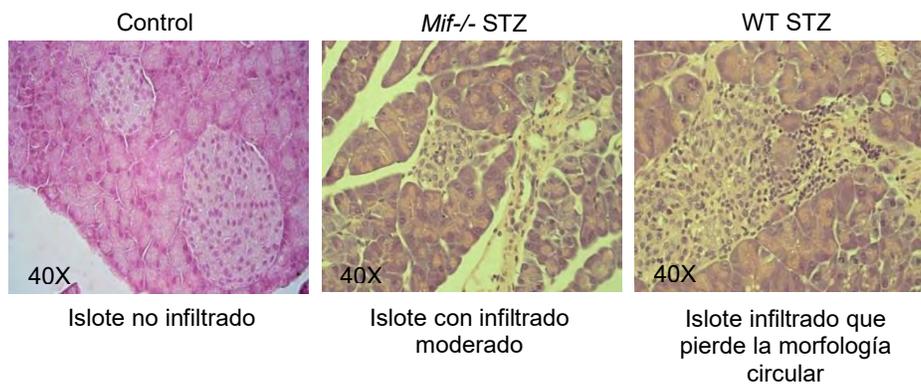


Figura 13. Criterio de clasificación de los islotes pancreáticos infiltrados en ratones WT STZ y *Mif*^{-/-} STZ a las 8 semanas posteriores a la inducción.

Tabla 1. Grado de infiltración en islotes pancreáticos.

	N° de islotes contados.	N° de islotes infiltrados.	N° de islotes no infiltrados.	N° de islotes infiltrados, morfología circular.	N° de islotes infiltrados, pérdida morfología circular.
WT Sano	100	ND	ND	ND	ND
WT STZ	100	100	ND	35	65
<i>Mif</i> ^{-/-} Sano	100	ND	ND	ND	ND
<i>Mif</i> ^{-/-} -STZ	100	33	67	33	ND

ND= infiltrado no detectado

Como se mencionó anteriormente en los ratones WT STZ se perdió la morfología circular del islote pancreático (Figura 17 A y B), se observó claramente una gran cantidad de células infiltrando el islote (flechas negras), incluso se pudo apreciar la entrada de las células que están infiltrando el tejido desde los capilares (flechas rojas). Todo lo anterior no se observó en el grupo de los ratones deficientes de MIF (*Mif*^{-/-} STZ), en los cuales el infiltrado fue mínimo a las 8 semanas p.i. y la morfología de los islotes se mantuvo (Figura 17 C y D).

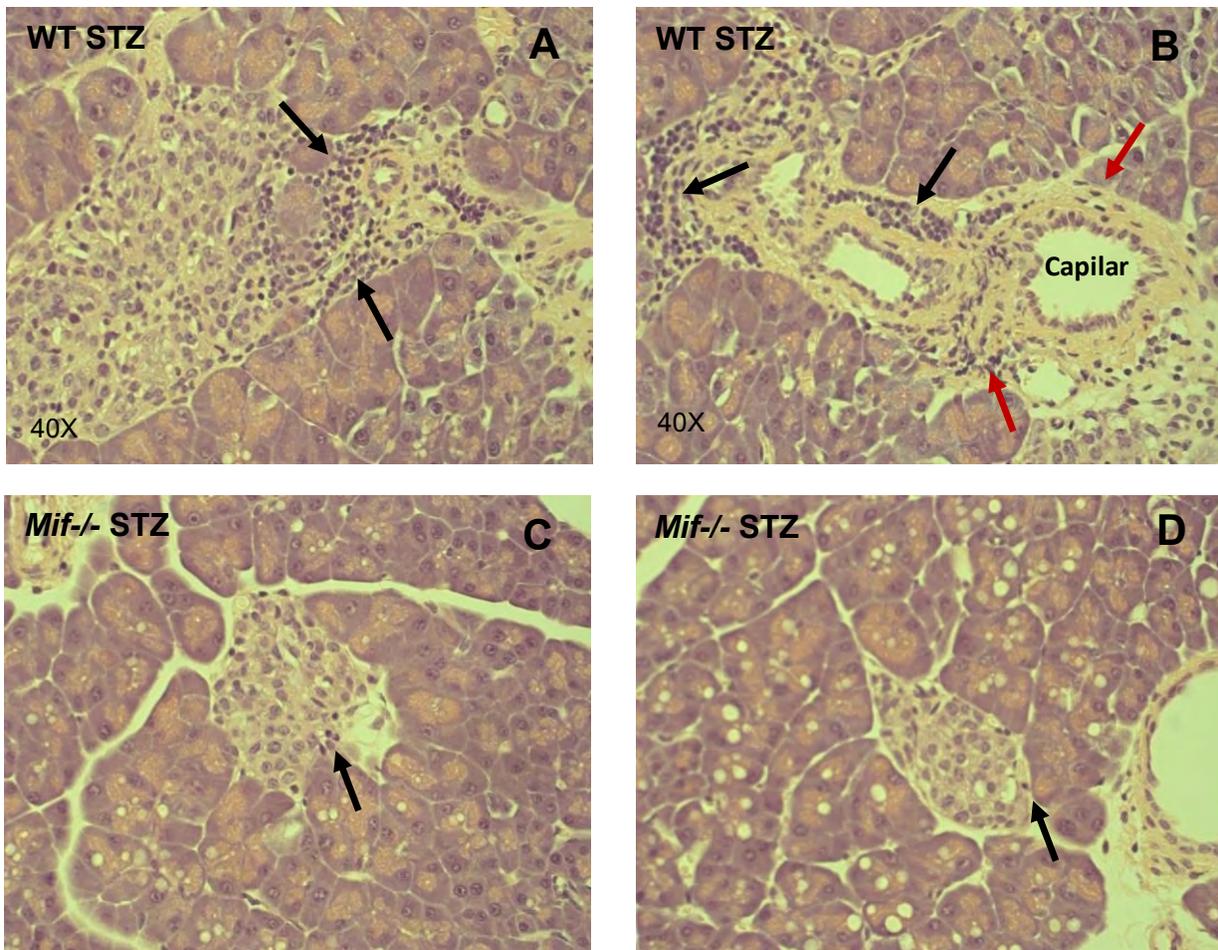


Figura 14. Análisis del infiltrado de los islotes pancreáticos a la semana 8 posterior a la inducción en los ratones WT STZ y *Mif*^{-/-}STZ.

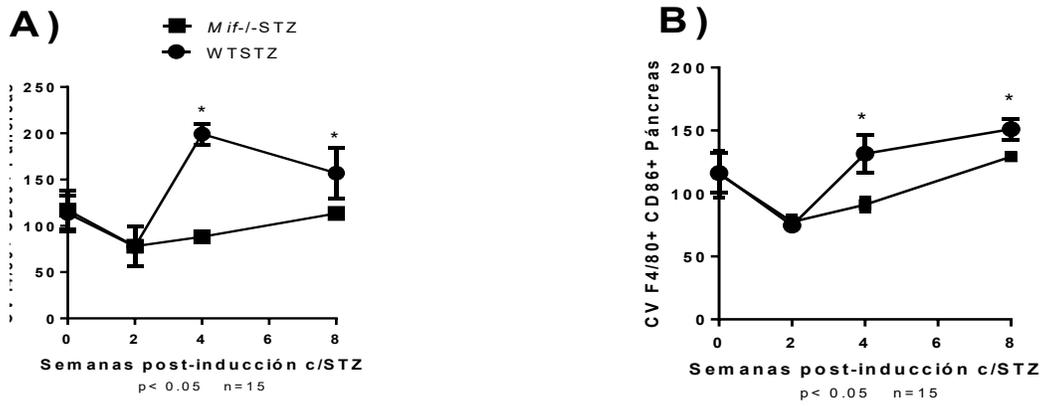
CONCLUSIÓN 3. Los islotes pancreáticos de los ratones WT STZ presentaron mayor infiltrado celular a las 8 semanas p.i. comparado con los ratones *Mif*^{-/-} STZ.

MIF promueve la expresión de CD80 y CD86 en Mφ y CDs de diferentes tejidos en ratones WT a diferentes tiempos posteriores a la inducción con STZ

De acuerdo con la literatura las principales células que se encuentran en el infiltrado en los islotes pancreáticos son Mφ, CDs, linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ (154,155), las cuales que orquestan el proceso de insulinitis.

En este trabajo nos enfocamos en las CPA, concretamente los Mφ y CDs, ya que son las primeras en reconocer los antígenos propios, activan a los linfocitos y expanden la respuesta autoinmune. Evaluamos la activación y maduración de los Mφ y CDs por medio de la expresión de moléculas co-estimuladoras indispensables para la presentación del antígeno en diferentes tejidos.

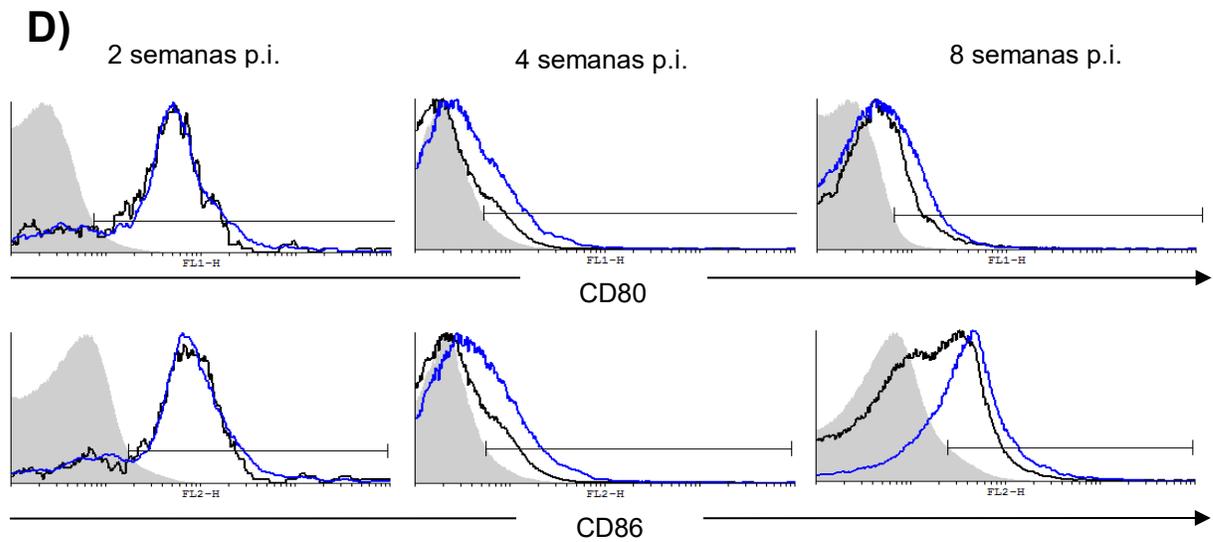
Páncreas. El análisis de los Mφ y CDs en páncreas mostró que durante la semana 2, 4 y 8 posterior al tratamiento con STZ, los ratones WT presentaron una elevada presencia de Mφ F4/80⁺ (gráfica 8 A); estos Mφ presentaron una mayor expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80 (gráfica 8 B) y CD86 (gráfica 8 C) durante la semana 4 y 8 post tratamiento con STZ, comparado con los ratones *Mif*^{-/-}-STZ en los mismos tiempos.



C)

200

— Isotipo
— *Mif*^{-/-} STZ
— WT STZ

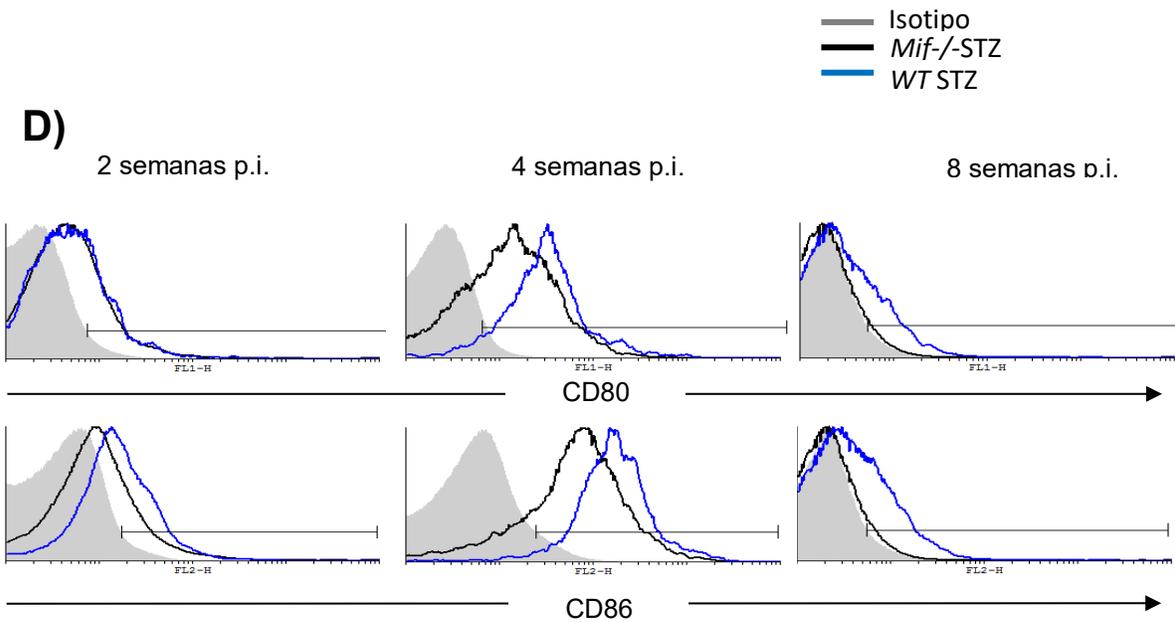
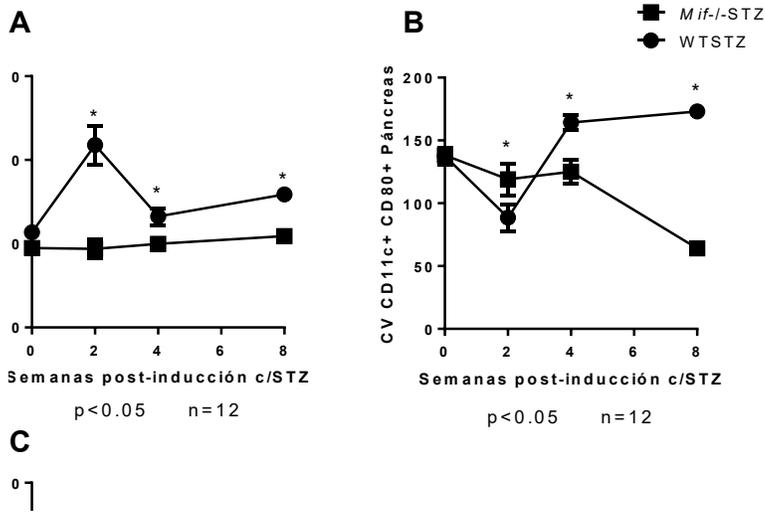


Gráfica 8. Cuantificación de M ϕ en el páncreas y evaluación de la expresión de moléculas coestimuladoras en los diferentes grupos experimentales en los diferentes tiempos. A) Promedio del coeficiente de variación (CV) de M ϕ F480+ CD80+. B) Promedio del CV de M ϕ F480+ CD86+. C) Promedio del CV de análisis de M ϕ F480+ en páncreas. D) Histogramas del IFM de M ϕ F480+ CD80+ y CD86+. “t” de Student $p < 0.05$, GraphPad Prism 6.

Por otro lado, las células dendríticas de páncreas en ratones WT tratados con STZ presentaron una mayor expresión de CD80 a partir de la semana 4 posterior a la inducción con STZ comparado con los ratones *Mif*^{-/-}-STZ (gráfica 9 B). Sin embargo, en la expresión de la molécula CD86 no se observaron diferencias significativas entre los grupos durante los diferentes tiempos experimentales (gráfica 9 C).

Las diferencias que se observaron en índice de fluorescencia media y coeficiente de variación (CV) de expresión de las moléculas CD80 y CD86, también se reflejaron en cuanto al porcentaje de células positivas para la molécula (Figura 9 A).

CONCLUSIÓN 4. Estos resultados demuestran que MIF influye en el reclutamiento de M ϕ y CDs en el páncreas en el modelo de DMT1 experimental. Además, se demuestra que MIF influye en la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 en estas células.



Gráfica 9. Cuantificación de las CD en el páncreas y evaluación de la expresión de moléculas co-estimuladoras en los diferentes grupos experimentales. A) Promedio del coeficiente de variación (CV) de CDs CD11c+. B) Promedio del CV de CDs CD11c+ CD80+. C) Promedio del CV de CDs CD11c+ CD86+ en páncreas. D) Histogramas del IFM de CDs CD11c+ CD80+ y CD86+. “t” de Student $p < 0.05$, GraphPad Prism 6.

Las diferencias que se observaron en índice de fluorescencia media y coeficiente de variación (CV) de expresión de las moléculas CD80 y CD86 en Mφ y CDs de páncreas, también se reflejaron en cuanto al porcentaje de células positivas para la molécula (Figura 18).

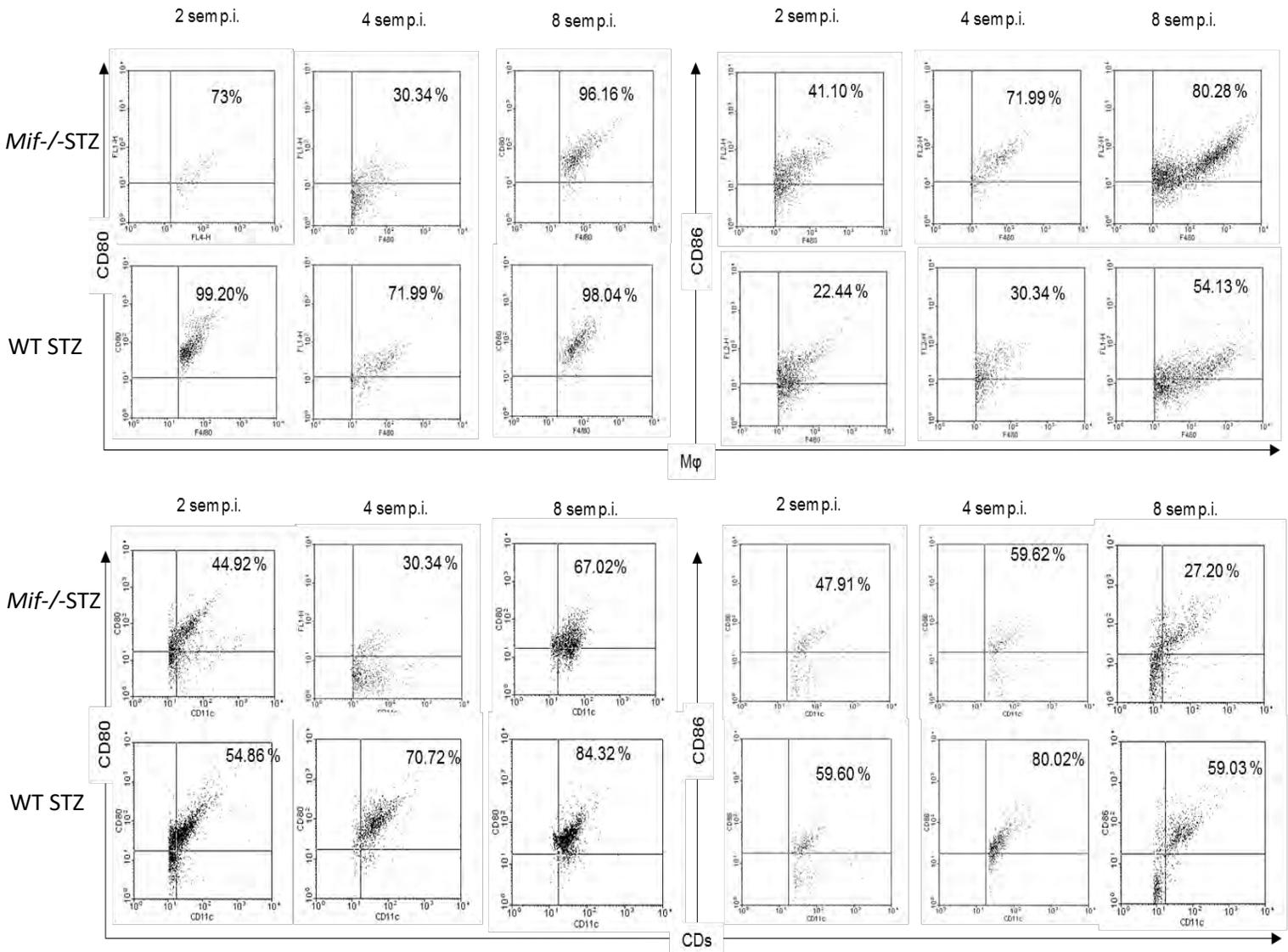
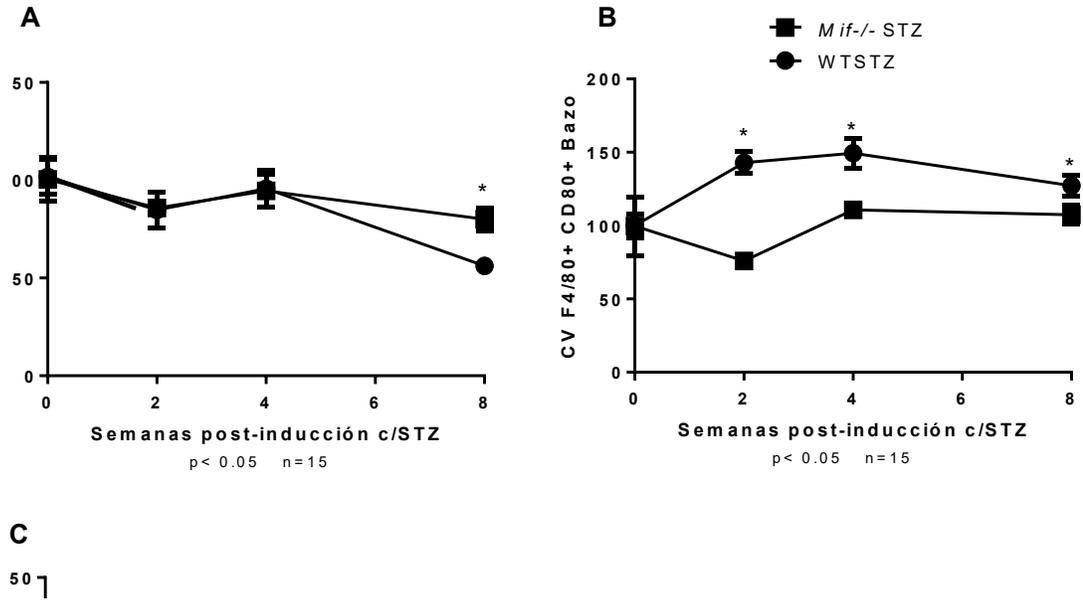


Figura 18. Cinética de expresión de moléculas CD80 y CD86 en Mφs y CDs en páncreas de ratones WT STZ y Mif-/-STZ.

Bazo. El bazo es un órgano linfóide muy cercano al páncreas, por lo cual consideramos que era muy probable que tuviese una participación importante como

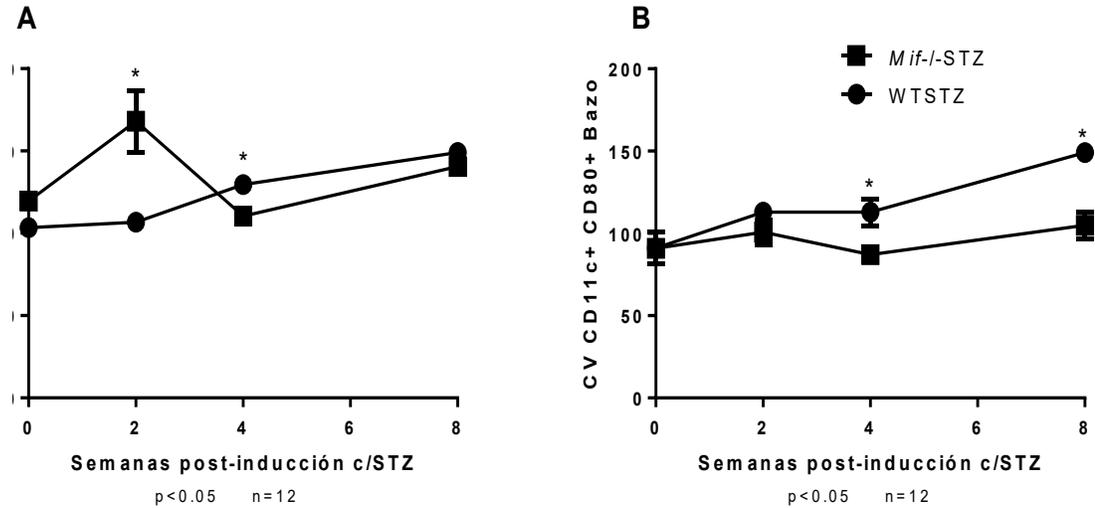
lugar de activación de linfocitos hacía un perfil autoinmune. Es por ello que evaluamos el reclutamiento de M ϕ y CDs en este órgano. Encontramos que durante las primeras semanas post tratamiento con STZ no hubo diferencias en el número de M ϕ en el bazo de ratones WT y *Mif*^{-/-} (semanas 2 y 4). Sin embargo, observamos que durante la semana 8 el número de M ϕ se incrementó de manera significativa en los ratones *Mif*^{-/-}-STZ (gráfica 10 A). Como ya se mencionó previamente, en las semanas 2 y 4 no encontramos diferencias en el número de M ϕ entre los grupos WT STZ y *Mif*^{-/-}-STZ, pero si se observaron diferencias en la expresión de moléculas co-estimuladoras; de manera que los ratones WT STZ presentaron niveles mayores de expresión de las moléculas CD80 comparados con los registrados en las células de ratones *Mif*^{-/-}-STZ. Además, observamos que durante la semana 8 en la cual incrementó el número de M ϕ en los ratones *Mif*^{-/-}-STZ, los niveles de expresión de CD80 se mantuvieron por debajo de los ratones WT STZ (Gráfica 10 B). En el caso de la expresión de la molécula CD86, ésta tuvo baja expresión desde la semana 2 hasta la semana 8 p.i. en los ratones *Mif*^{-/-}-STZ comparado con la expresión observada en los ratones WT STZ (Gráfica 10 C).



Gráfica 10. Cuantificación de $M\phi$ y evaluación de la expresión de moléculas co-estimuladoras en macrófagos positivos para CD80 y CD86 en bazo. Células de bazo de ratones WT (●), *Mif*^{-/-} (■). A) número de células F4/80+ de bazo. B) número de células F4/80+ ($M\phi$) positivas para CD80. C) número de células F4/80+ ($M\phi$) positivas para CD86. La determinación se hizo a los 2, 4, 6 y 8 días post-inducción. “t” de Student * $p < 0.05$, GraphPad Prism 6.

En los ratones *Mif*^{-/-}-STZ también presentó un incremento en el número de CDs (CD11c+) en bazo, pero en éste caso fue durante la segunda semana post tratamiento con STZ (Gráfica 11 A). Sin embargo, durante esa semana no se presentaron diferencias en la expresión de la molécula CD80 con respecto a los ratones WT STZ (Gráfica 11 B). Durante la semana 4 y 8 hubo una menor expresión de CD80 en las CD de ratones *Mif*^{-/-}-STZ comparados con los WT STZ. La molécula

CD86 se expresó menos en CDs de ratones *Mif*^{-/-}-STZ a partir de la segunda semana y hasta las 8 semanas posteriores a la inducción con STZ (Gráfica 11 C).



C

17

Gráfica 91. Cuantificación de CDs y evaluación de la expresión de moléculas co-estimuladoras en los diferentes grupos experimentales en los diferentes tiempos en células de bazo. Ratones WT (●) y *Mif*^{-/-} (■). La determinación de la expresión de las moléculas se hizo a las semanas 2, 4, 6 y 8 post tratamiento con STZ. A) número de células de bazo CD11c+. B) número de células CD11c+ (CDs) positivas para CD80. C) número de células CD11c+ (CDs) positivas para CD86. “t” de Student $p<0.05$, GraphPad Prism 6.

Las diferencias que se observaron en índice de fluorescencia media y coeficiente de variación (CV) de expresión de las moléculas CD80 y CD86 en Mφ y CDs de

bazo, también se reflejaron en cuanto al porcentaje de células positivas para la molécula (Figura 19).

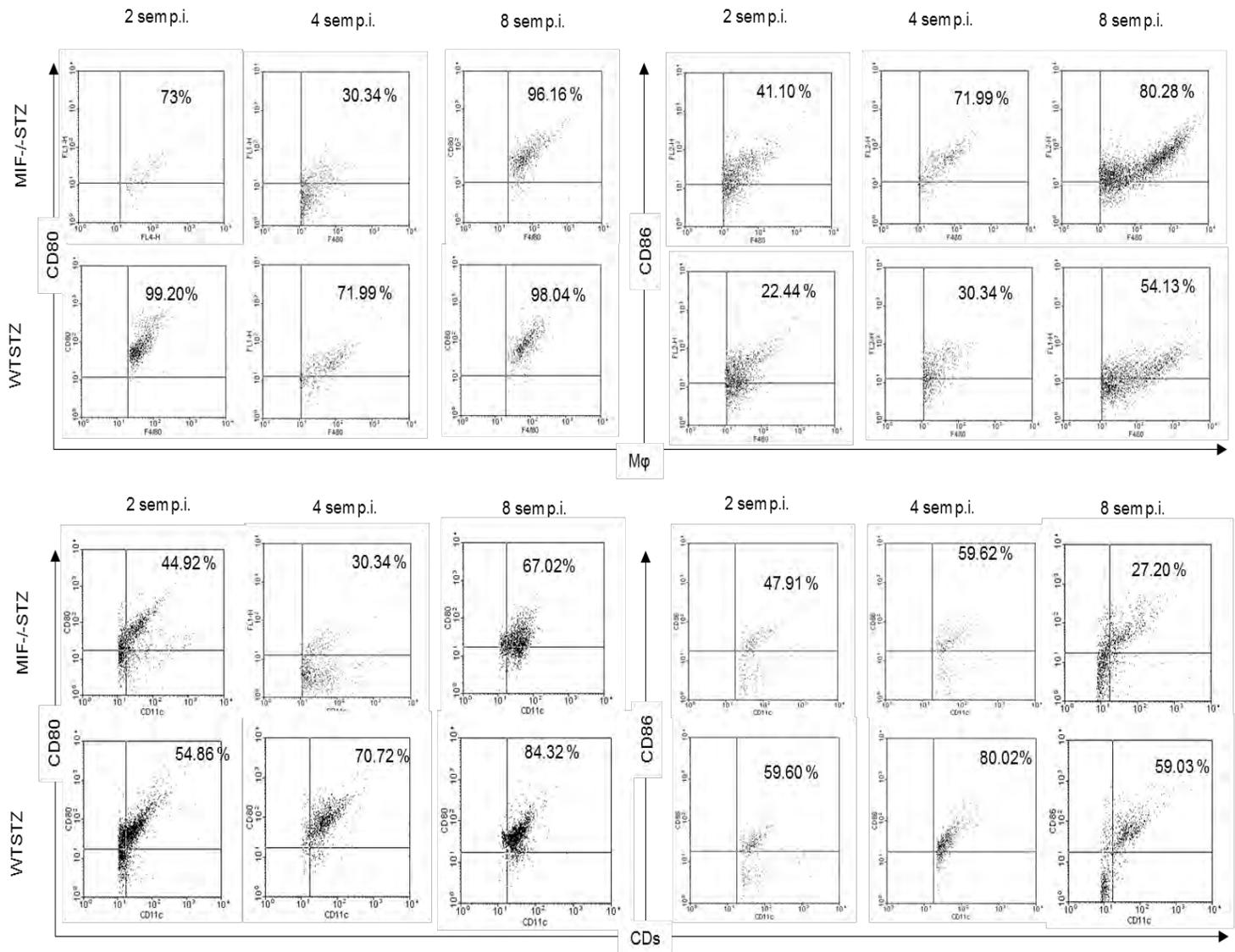
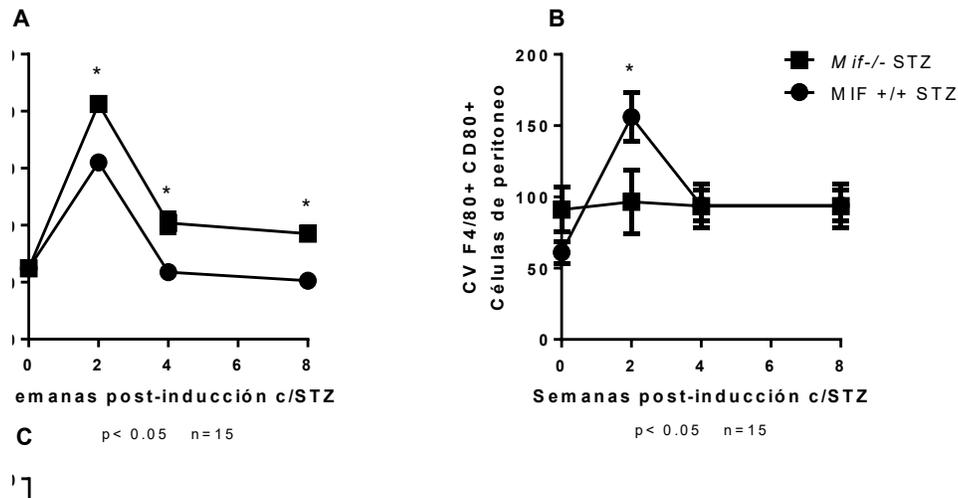


Figura 19. Plots representativos de la cinética de expresión de CD80 y CD86. Análisis por el programa Cylgic.

Peritoneo. Finalmente, analizamos el patrón de expresión de las moléculas CD80 y CD86 en la cavidad peritoneal; en este caso los ratones *Mif*^{-/-}STZ presentaron

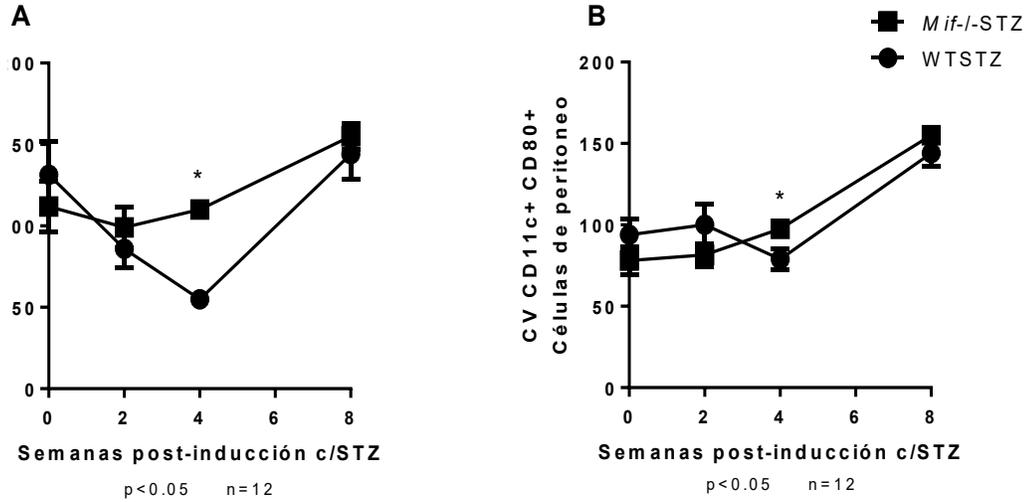
mayor expresión del marcador de Mφ clásicamente activados F4/80 (gráfica 12 A). Sin embargo, estas células no presentaron cambios en cuanto a la expresión de CD80 y CD86 a lo largo del experimento (gráfica 12 B y C). Contrariamente, los ratones WT STZ presentaron un pico de expresión de las moléculas CD80 y CD86 durante la segunda semana posterior a la inducción (gráfica 12 B y C).



Gráfica 12. Cuantificación de la expresión de F480, CD80 y CD86 en células de peritoneo en los diferentes tiempos experimentales posteriores a la inducción con STZ. A) Promedio del coeficiente de variación (CV) de Mφ F480+. B) Promedio del CV de Mφ F480+ CD80+. C) Promedio del CV de análisis de Mφ F480+ CD86+ en páncreas. “t” de Student p<0.05, GraphPad Prism 6.

En cuanto a las CDs, los ratones *Mif*^{-/-}STZ presentaron una mayor expresión de CD11c durante la semana 4 (gráfica 13, A y B). Por otro lado, los ratones *Mif*^{-/-}STZ

mantuvieron una baja expresión de células CD11c⁺ CD86⁺ durante todos los tiempos experimentales (gráfica 13 C).



Gráfica 13. Cuantificación de la expresión de CD11c, CD80 y CD86 en células de peritoneo en los diferentes tiempos experimentales posteriores a la inducción con STZ. A) Promedio del coeficiente de variación (CV) de CDs CD11c+. B) Promedio del CV de CDs CD11c+ CD80+. C) Promedio del CV de CDs CD11c+ CD86+ en páncreas. “t” de Student p < 0.05, GraphPad Prism 6.

Las diferencias que se observaron en índice de fluorescencia media y CV de expresión de las moléculas CD80 y CD86 en Mφ y CDs de peritoneo, también se reflejaron en cuanto al porcentaje de células positivas para la molécula (Figura 20).

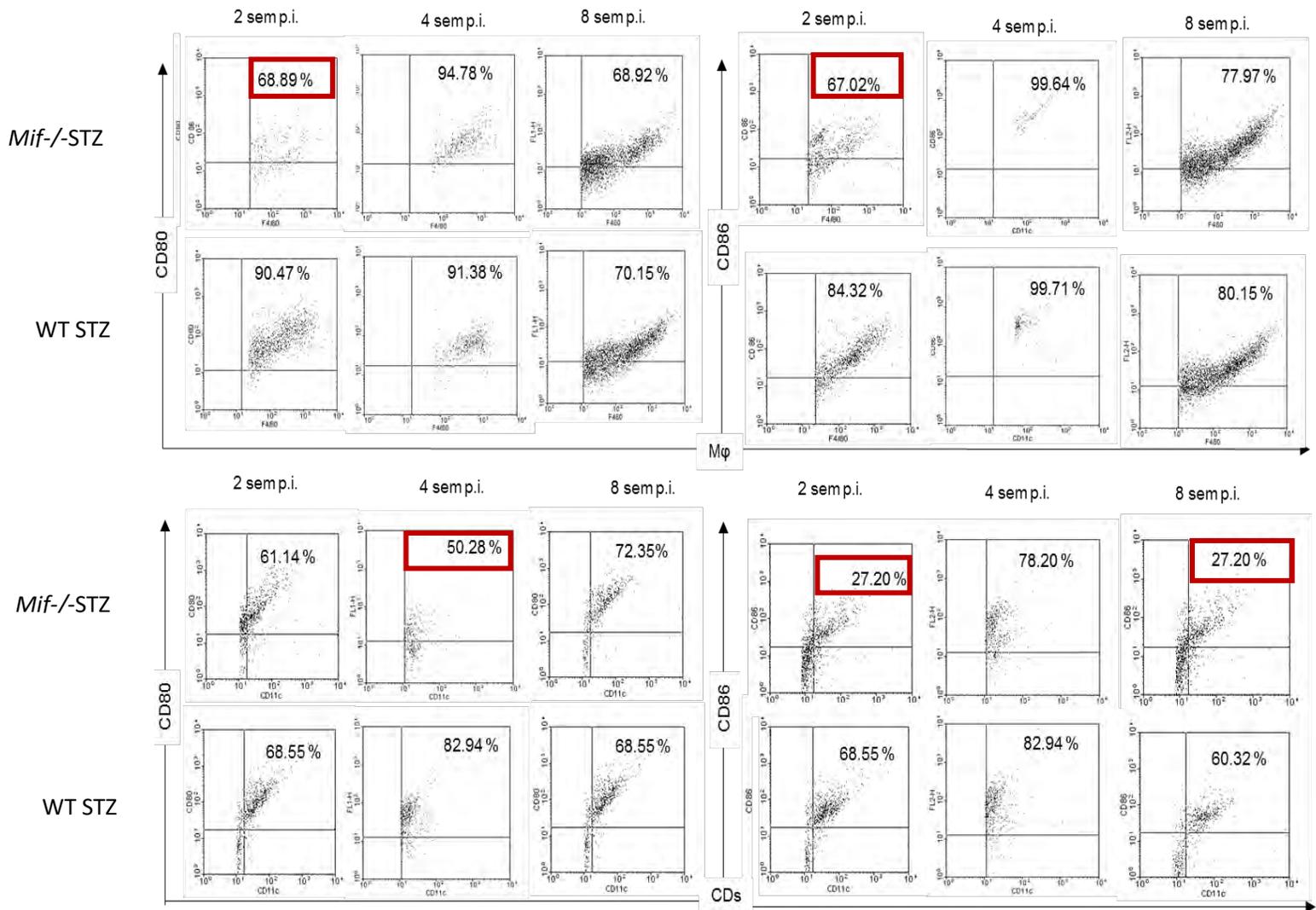


Figura 20. Cinética de porcentaje de células CD80⁺ y CD86⁺ en Mφ y CDs en peritoneo de ratones WTSTZ y Mif-/-STZ. Cyfloglic.

MIF participa en la expresión de MHC-II en Mφ y CDs de bazo y peritoneo

Evaluamos la expresión de MHC-II en Mφ y CDs de bazo y células de peritoneo. Se encontró que los Mφ y CDs de bazo de ratones *Mif*^{-/-}-STZ expresaron niveles significativamente menores de MHC-II a partir de la semana cuatro y hasta la 8^a semana posterior a la inducción comparados con los Mφ y CDs de ratones WT STZ (Gráfica 14 A y B).



Gráfica 14. Cuantificación de la expresión de MHC-II en células de bazo en los diferentes tiempos experimentales posteriores a la inducción con STZ. A) Promedio del porcentaje de Mφ F480+ MHC-II+. B) Promedio del porcentaje de CDs CD11c+ MHC-II+. "t" de Student p<0.05, GraphPad Prism 6.

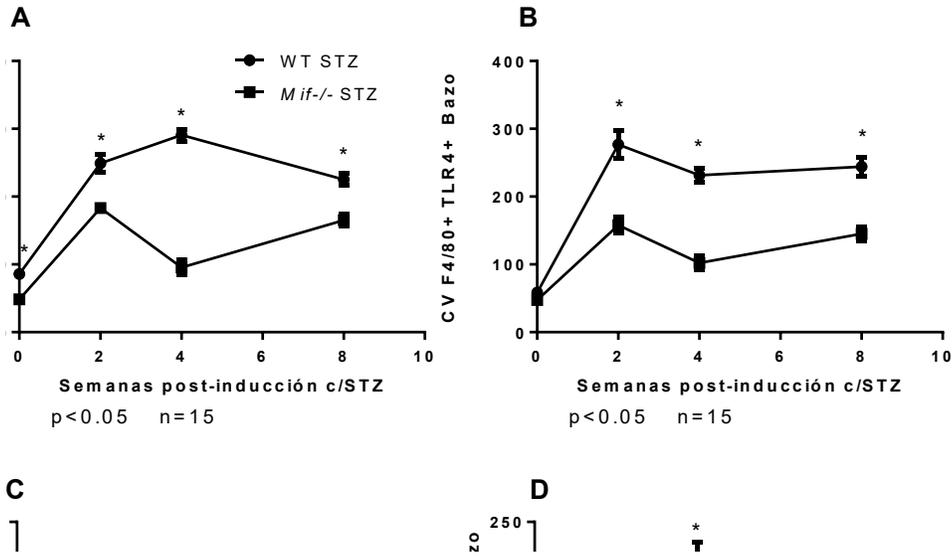
Los Mφ y CDs de peritoneo de ratones *Mif*^{-/-}-STZ expresaron niveles menores de MHC-II a partir de la segunda semana posterior a la inducción con STZ comparado con los ratones WT STZ (Gráfica 15 A y B).



Gráfica15. Cuantificación de la expresión de MHC-II en células de peritoneo en los diferentes tiempos experimentales posteriores a la inducción con STZ. A) Promedio del porcentaje de Mφ F480+ MHC-II+. B) Promedio del porcentaje de CDs CD11c+ MHC-II+. *t de Student $p < 0.05$, GraphPad Prism 6.

MIF participa en el proceso de expresión de receptores de membrana como TLR-2, TLR-4, CD40 y CCR5 en Mφ y CDs de bazo

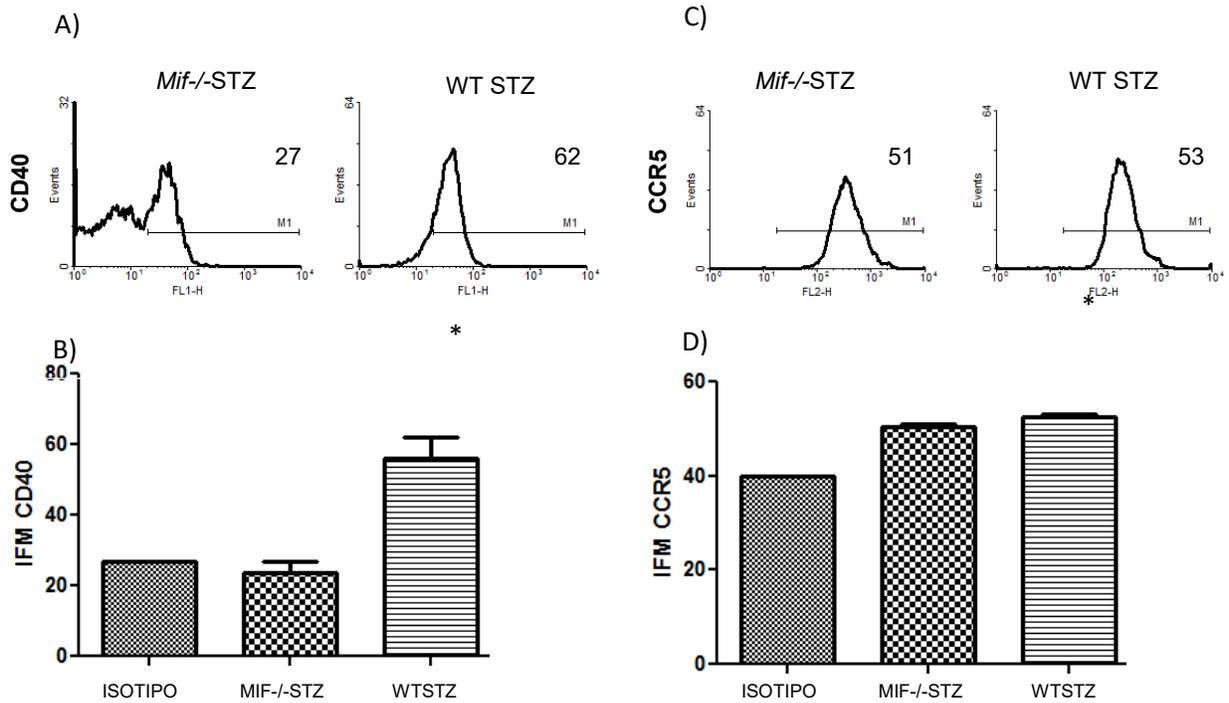
Analizamos la expresión de TLR-2 y TLR-4 en Mφ y CDs de bazo de ratones WT y *Mif*^{-/-} durante los diferentes tiempos experimentales posteriores a la inducción con STZ y observamos que los Mφ de ratones *Mif*^{-/-}STZ presentaron una menor expresión de TLR-2 y TLR-4 (Gráfica 16 A y B) a partir de la semana dos p.i., registraron una mayor diferencia durante la semana cuatro p.i. con STZ.



Gráfica 16. Cuantificación de la expresión de TLR-2 y TLR-4 en Mφ y CDs de bazo en los diferentes tiempos experimentales posteriores a la inducción con STZ. “t” de Student $p < 0.05$, GraphPad Prism 6.

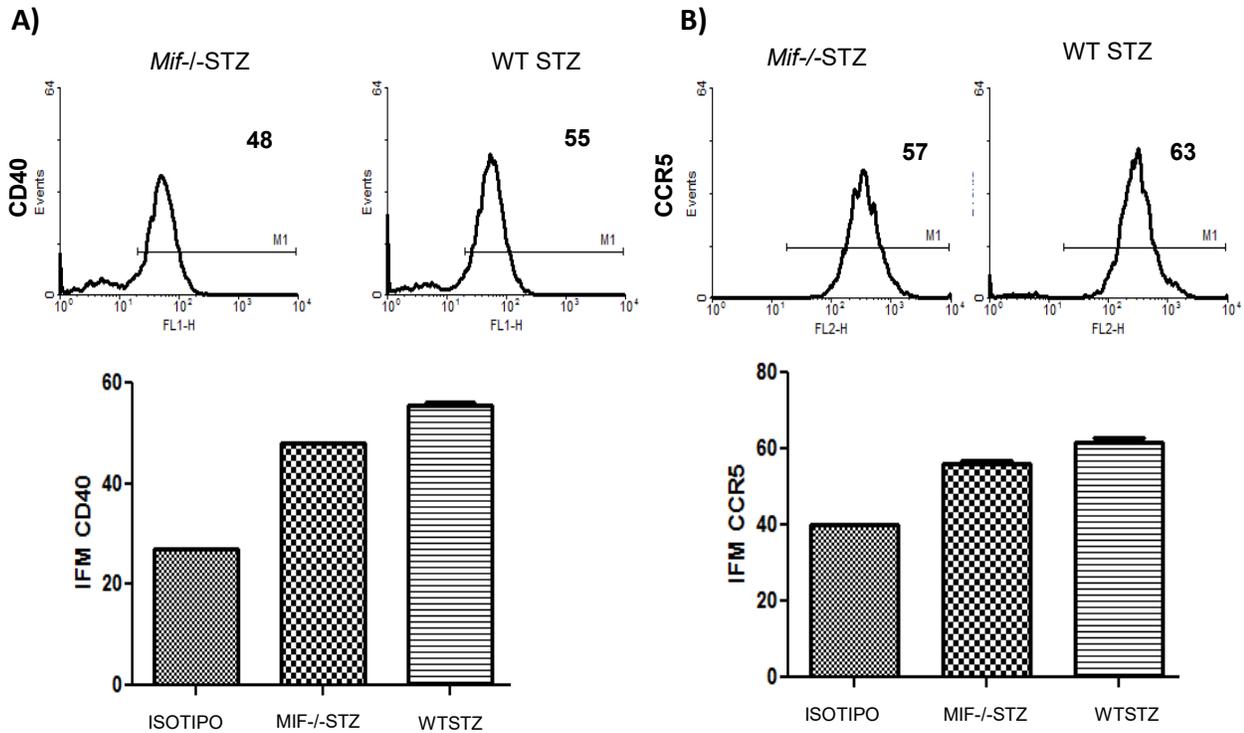
Las CDs de bazo de ratones *Mif*^{-/-} STZ presentaron una menor expresión de TLR-2 solo durante las semanas dos y cuatro, sin embargo, fue en ésta última en donde se encontraron las mayores diferencias en su expresión (gráfica 16 C). La expresión de TLR-4 en los ratones *Mif*^{-/-} STZ fue menor comparado con los ratones WT STZ únicamente durante la semana 4 p.i. (gráfica 16 D).

La expresión de CD40 y CCR5 en Mφ y CDs se determinó a la semana 8 p.i. con STZ. Se observó que los Mφ WT STZ presentaron una mayor expresión de la molécula CD40 y CCR5 (gráfica 17 C y D).



Gráfica 17. Expresión de CD40 y CCR5 en bazo. Histogramas representativos de 3 experimentos independientes en donde se observa el índice de fluorescencia media (IFM) de expresión de las moléculas CD40 (A y B) y CCR5 (C y D) en Mφ de bazo de ratones WT STZ y *Mif*^{-/-}STZ a las 8 semanas posteriores a la inducción. N=10 "t" de Student $p < 0.05$, GraphPad Prism 6.

Las CDs en bazo de ratones WT STZ presentaron mayor expresión de CD40 y CCR5 comparado con los ratones *Mif*^{-/-}STZ a las 8 semanas posteriores a la inducción (Gráfica 18 A y B).

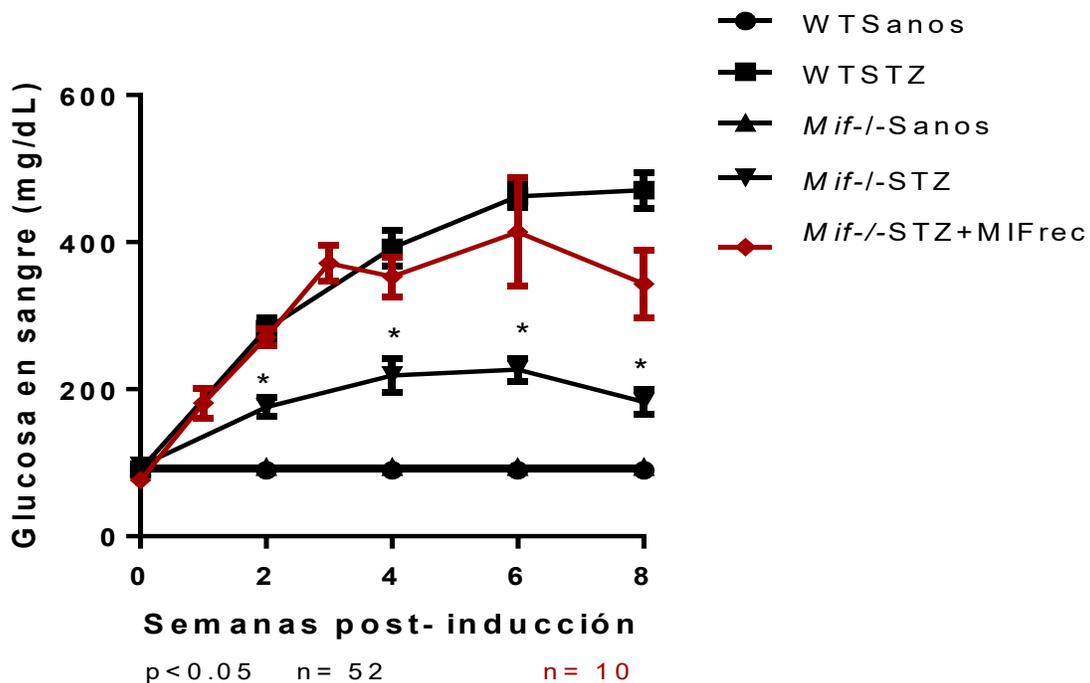


Gráfica 18. IFM de expresión de las moléculas CD40 y CCR5 en CDs de bazo de ratones WTSTZ y *Mif-/-*-STZ a las 8 semanas posteriores a la inducción. N=10 "t" de Student $p < 0.05$ GraphPad Prism 6.

CONCLUSIÓN 5. MIF es importante para la correcta expresión de moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86; así como para la expresión de otros receptores de membrana como MHC-II, TLR-2, TLR-4, CD40 y CCR5 en Mφ y CDs de bazo en un modelo de DMT1 por inducción con STZ. En peritoneo no se encontraron diferencias significativas en la expresión de las moléculas analizadas.

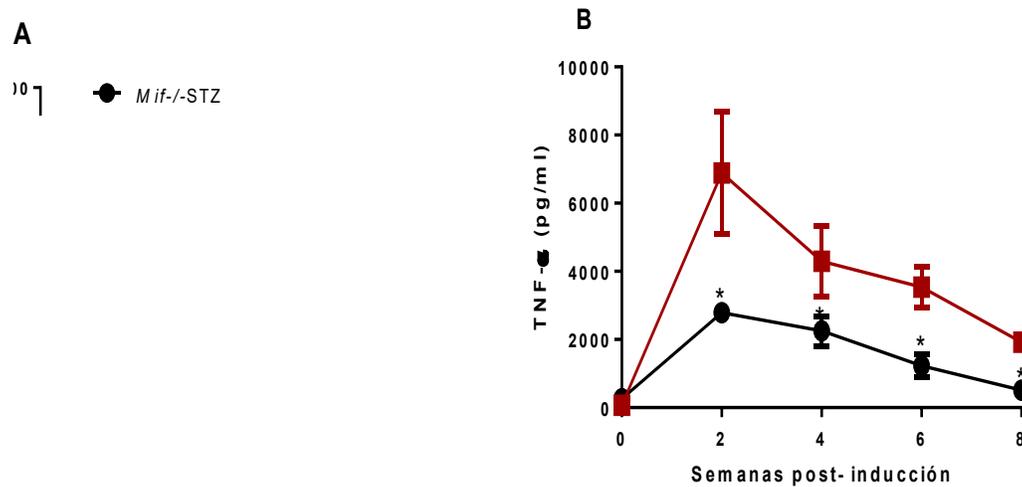
Las hiperglucemias y los niveles de citocinas pro-inflamatorias en sangre incrementan con la restitución sistémica de MIF en los ratones *Mif*^{-/-}-STZ

Para corroborar que MIF participa en el proceso inflamatorio relacionado con la insulinitis se restituyeron los niveles sistémicos de MIF en los ratones *Mif*^{-/-}-STZ. Observamos que durante las primeras dos semanas los ratones *Mif*^{-/-}-STZ+ MIF recombinante (MIFrec) desarrollaron niveles de glucosa en sangre cercanos a los encontrados en los ratones WT STZ. Fue hasta la semana 8 en la que observamos que la reconstitución exógena de MIF no fue suficiente para alcanzar los niveles de glucosa en sangre equitativos a los mostrados por los ratones WT STZ (gráfica 19), línea roja).



Gráfica 19. Glucemia en ratones *Mif*^{-/-} STZ posterior a la restitución de MIF. n = 10. p < 0.05 "t" de Student. (Graphpad Prism 6).

La restitución de MIF en ratones *Mif*^{-/-}-STZ+MIFrec generó hiperglucemias idénticas a las presentadas por los ratones WT STZ durante las 6 primeras semanas, por lo que medimos la producción de citocinas inflamatorias durante los tiempos tempranos posteriores a la inducción (gráfica 20 A) y también la semana 8 posterior a la inducción (gráfica 20 B) y observamos que en el caso de la citocina TNF- α ésta se incrementó a partir del día 5 posterior a la inducción. Los ratones *Mif*^{-/-}-STZ+MIFrec mantuvieron una alta producción de TNF α en la semana 6 y 8 posteriores a la inducción comparados con los ratones *Mif*^{-/-}-STZ.



Gráfica 10. Niveles de TNF- α posterior a la restitución de MIF en ratones *Mif*^{-/-}-STZ. A) Niveles de TNF- α en los primeros 5 días de restitución de MIF. B) Niveles de TNF- α a partir de la segunda semana posterior a la restitución de MIF. $n = 10$. $p < 0.05$ "t" de Student (Graphpad Prism 6).

Medimos la producción de IL-12 en ratones *Mif*^{-/-}-STZ+MIFrec y se observó que la restitución de MIF ocasionó el incremento en la producción de IL-12 en los ratones *Mif*^{-/-}-STZ+MIFrec de manera inmediata a partir del primer día posterior a la inducción, esta evaluación se mantuvo hasta la semana 8p.i. Los niveles de IL-12

producidos por los ratones *Mif*^{-/-}STZ+MIFrec superan a los que se produjeron en los ratones WT STZ en el mismo tiempo experimental (gráfica 21).



Gráfica 11. Niveles de IL-12 posterior a la restitución de MIF en ratones *Mif*^{-/-} STZ. A) Niveles de IL-12 en los primeros 5 días de restitución de MIF. B) Niveles de IL-12 a partir de la segunda semana posterior a la restitución de MIF. *n* =10. *p*<0.05 “*t*” de Student (Graphpad Prism 6).

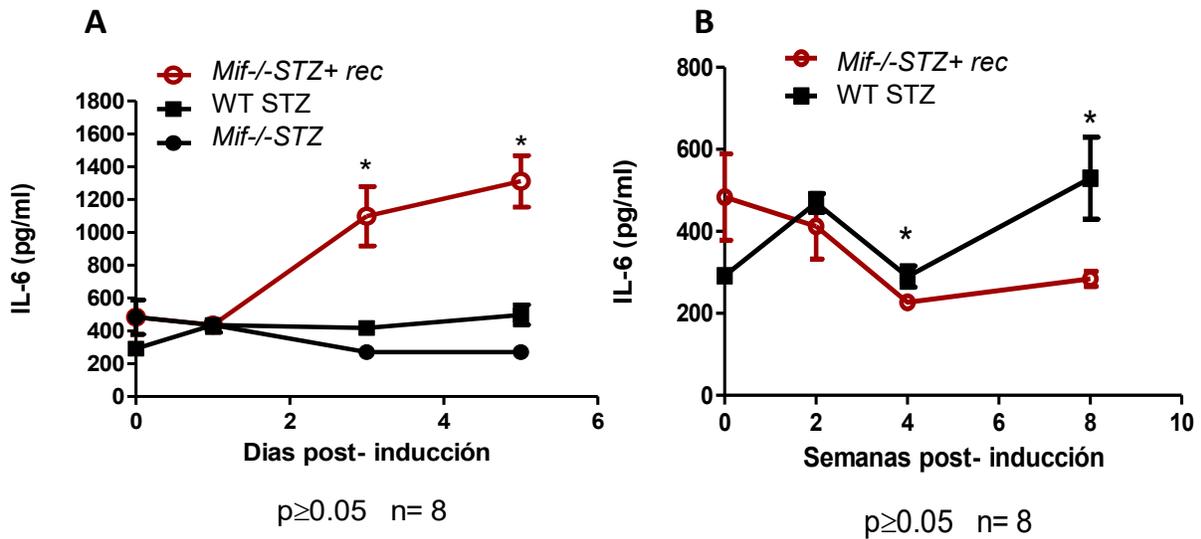
La citocina pro-inflamatoria IL-1 β es una de las más relacionadas con el desarrollo de la diabetes ya que se encuentra en concentraciones altas durante la enfermedad (156).

Al restituir los niveles sistémicos de MIF en los ratones *Mif*^{-/-}STZ+MIFrec se compensaron los niveles de IL-1 β a partir del día 5 post tratamiento con STZ y no se presentaron diferencias significativas en la concentración de esta citocina durante las semanas 2, 6 y 8 con respecto a los ratones silvestres (WT STZ) exceptuando la semana 4 en la cual los ratones WT STZ presentan un pico de producción de IL-1 β que no se observa con la adición del MIF recombinante en los ratones *Mif*^{-/-}STZ+MIFrec (gráfica 22).



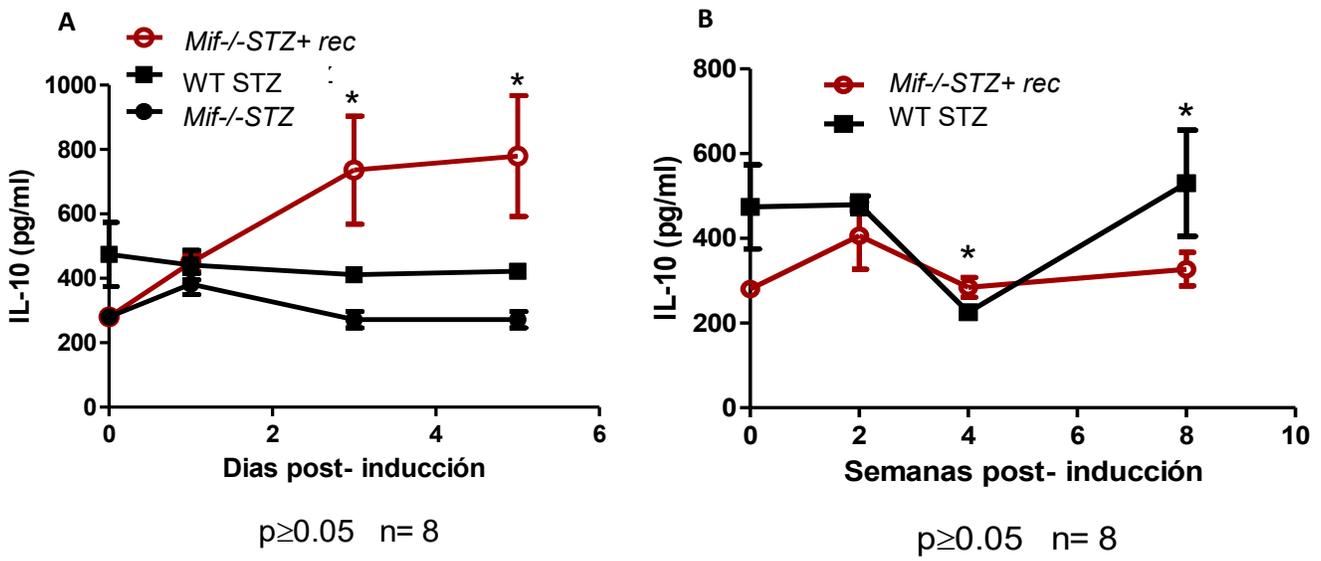
Gráfica 12. Niveles de IL-1 β posterior a la restitución de MIF en ratones *Mif*^{-/-}STZ. A) Niveles de IL-1 β en los primeros 5 días de restitución de MIF. B) Niveles de IL-1 β a partir de la segunda semana posterior a la restitución de MIF. \blacksquare *Mif*^{-/-}STZ+MIFrec. n =10. p<0.05 “t” de Student (Graphpad Prism 6).

Adicionalmente medimos los niveles de producción de IL-6 posterior a la restitución sistémica de MIF y observamos que durante los primeros 5 días de inducción la IL-6 se incrementó de manera significativa comparada con las concentraciones que presentaron los ratones *Mif*^{-/-}STZ e incluso superó los niveles producidos por los ratones WT STZ en una proporción dos veces mayor a partir del tercer día posterior a la inducción (gráfica 23 A). Sin embargo, la mayor producción de IL-6 en los ratones *Mif*^{-/-}STZ+MIFrec no se sostuvo y a partir de la segunda semana posterior a la inducción la producción en este grupo disminuyó comparado con los ratones WT STZ (gráfica 23 B).



Gráfica 13. Niveles de IL-6 posterior a la restitución de MIF en ratones *Mif*^{-/-}STZ. A) Niveles de IL-6 en los primeros 5 días de restitución de MIF. B) Niveles de IL-6 a partir de la segunda semana posterior a la restitución de MIF. n = 10. *p* < 0.05 "t" de Student (Graphpad Prism 6).

Por último, se midió la citocina IL-10 y se observó una mayor producción (en algunos casos casi el doble) durante la primera semana posterior a la inducción en los ratones a los cuales se les restituyó MIF, sin embargo, la IL-10 no se mantuvo con alta producción después de la segunda semana posterior a la inducción (gráfica 24).

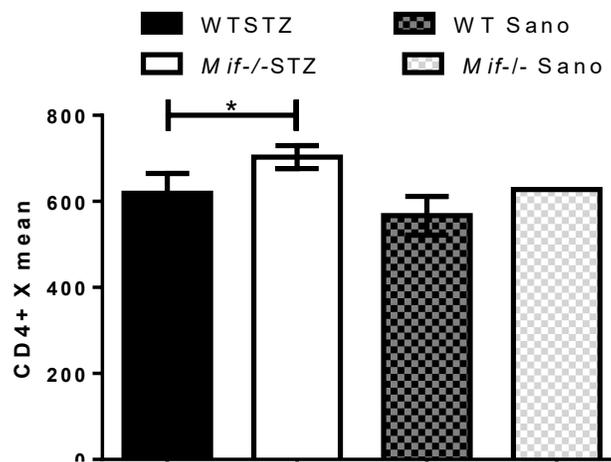


Gráfica 14. Niveles de IL-10 posterior a la restitución de MIF en ratones *Mif*^{-/-}STZ. A) Niveles de IL-10 en los primeros 5 días de restitución de MIF. B) Niveles de IL-10 a partir de la segunda semana posterior a la restitución de MIF. n = 10. p < 0.05 "t" de Student (Graphpad Prism 6).

CONCLUSIÓN 6. El papel de MIF en los signos de diagnóstico de la diabetes tipo uno se vio corroborado con la restitución de la proteína recombinante a nivel sistémico. Se reestableció la hiperglucemia y la concentración de las citocinas inflamatorias se elevaron, principalmente en la semana uno posterior a la inducción con STZ; el cual es el momento en el que se generó el daño inicial a los islotes pancreáticos y por lo tanto el desarrollo de la insulinitis.

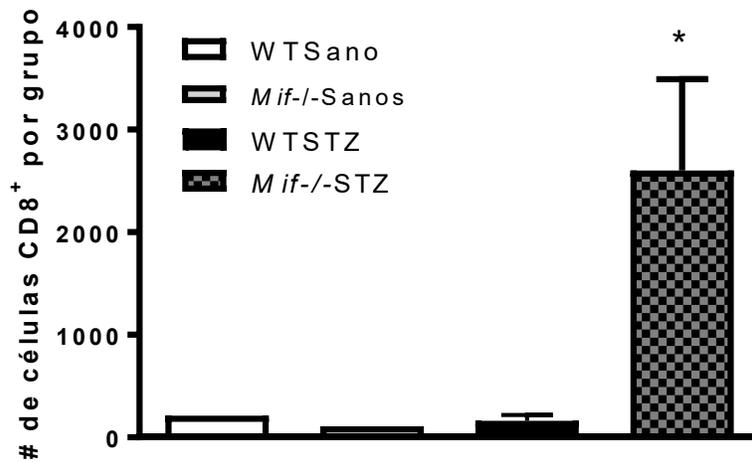
Caracterización general de las clonas de linfocitos T cuya proliferación se ve alterada por MIF en el modelo de diabetes autoinmune experimental

6.11.1 Linfocitos T CD4⁺. El número de linfocitos CD4⁺ en bazo no presentó diferencias significativas entre los ratones WT y *Mif*^{-/-} sanos. Sin embargo, después de 8 semanas de inducción con STZ los ratones *Mif*^{-/-} STZ presentaron un mayor número de células T CD4⁺ en bazo comparado con los números obtenidos de los ratones WT STZ (gráfica 25).



Gráfica 15. La ausencia de MIF promueve la proliferación de linfocitos T CD4⁺. n =10 p<0.05 "t" de Student (Graphpad Prism 6).

Linfocitos T CD8⁺. También medimos la proporción de linfocitos CD8⁺ en bazo a las 8 semanas posteriores a la inducción con STZ y observamos que los ratones *Mif*^{-/-} con STZ presentaron mayor número de linfocitos CD8⁺ (gráfica 26, figura 21).



Gráfica 16. La ausencia de MIF promueve la proliferación de linfocitos T CD8+ de bazo, en ratones inducidos con STZ a las 8 semanas posteriores a la inducción. $n = 10$. $p < 0.05$ "t" de Student (Graphpad Prism 6).

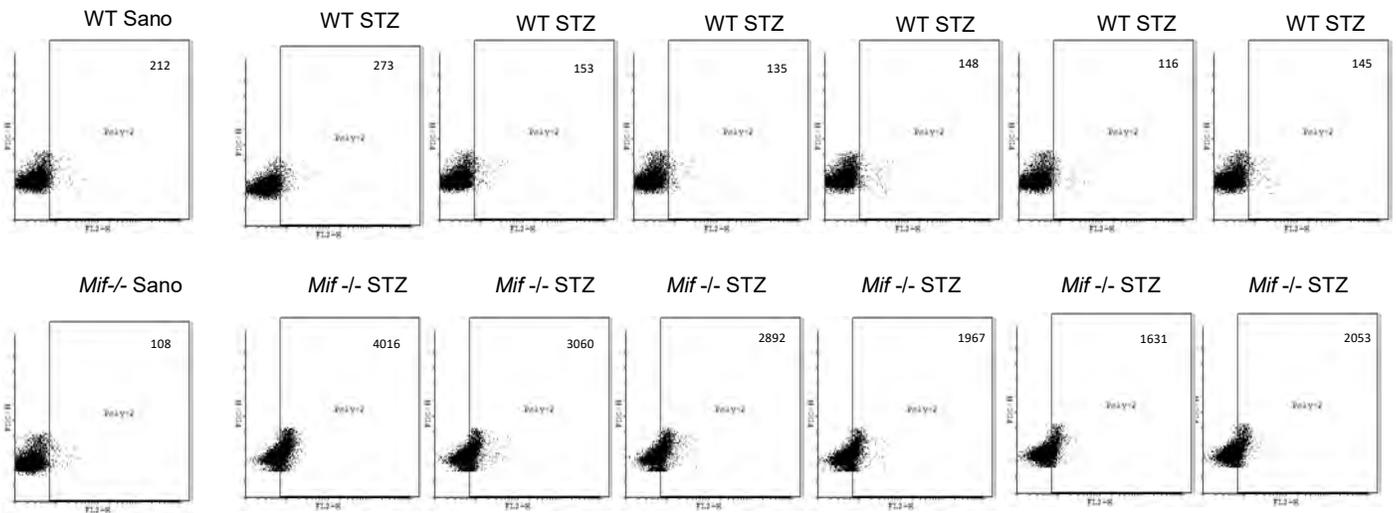


Figura 15. La ausencia de MIF promueve la proliferación de linfocitos T CD8+ de bazo. Histogramas representativos de 3 experimentos independientes, $n = 10$.

La ausencia de MIF favorece la proliferación de linfocitos T reguladores

Los ratones *Mif*^{-/-} inducidos con STZ presentaron una mayor proliferación de células Treg CD4⁺FOXP3⁺ y CD25⁺FOXP3⁺, como se muestra en la figura 22.

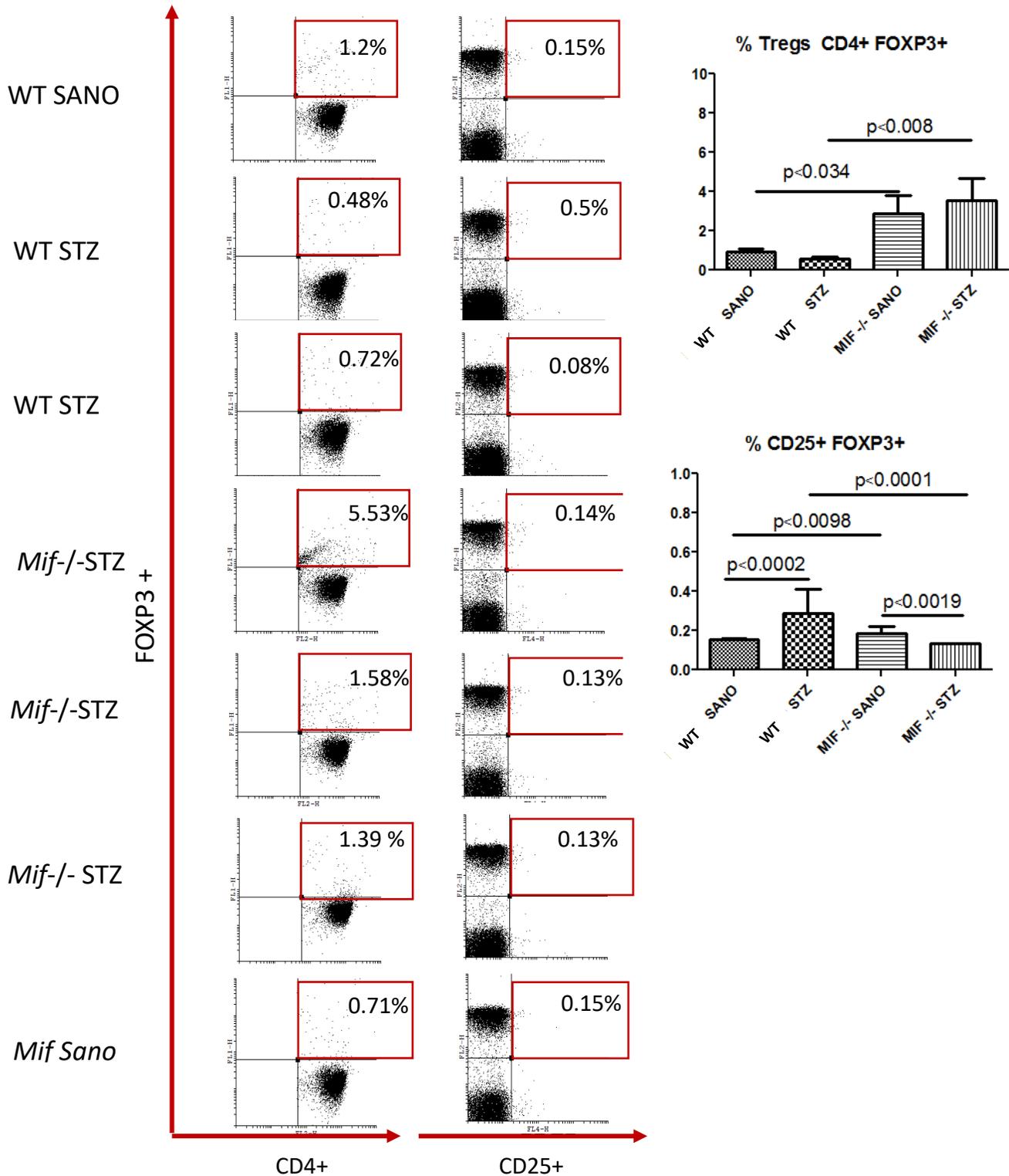


Figura 16. Proporción de linfocitos $CD4^{+}FOXP3^{+}$ y $CD25^{+}FOXP3^{+}$ en sangre de ratones BALB/c y *Mif*^{-/-} sanos y con STZ a las 8 semanas posteriores a la inducción.

Análisis de $M\phi$ y CDs de islotes pancreáticos de ratones WT y *Mif*^{-/-} sanos y a las 8 semanas posteriores a la inducción con STZ mediante inmunofluorescencia directa

De acuerdo con los resultados obtenidos, los ratones *Mif*^{-/-}-STZ presentan un infiltrado celular menor en los islotes pancreáticos comparado con el observado en los ratones WTSTZ a las 8 semanas posteriores a la inducción con STZ.

Para corroborarlo, se analizó la presencia de moléculas co-estimuladoras *in situ* en $M\phi$, CDs y con la técnica de inmunofluorescencia primaria utilizando anticuerpos para citometría de flujo.

Mφ F4/80+. En la Figura 23 se observa la tinción con anticuerpo Anti-F4/80APC, en los islotes pancreáticos correspondientes a los ratones WT y *Mif*^{-/-} sanos en los que no se observó fluorescencia, lo que indica la ausencia de $M\phi$ en los islotes pancreáticos. Además, se observó que los islotes de los ratones WT y *Mif*^{-/-} sanos presentan la morfología redonda característica de islotes no infiltrados (Figura16) Después de 8 semanas de inducción con STZ, los islotes de ratones WTSTZ presentan más puntos de fluorescencia comparado con los registrados en los ratones *Mif*^{-/-}-STZ. De esta manera, comprobamos *in situ* que hay un menor infiltrado de $M\phi$ en los islotes de ratones *Mif*^{-/-}-STZ, resultado que concuerda con el número de $M\phi$ contabilizados en páncreas (Figura 23, gráfica 8).

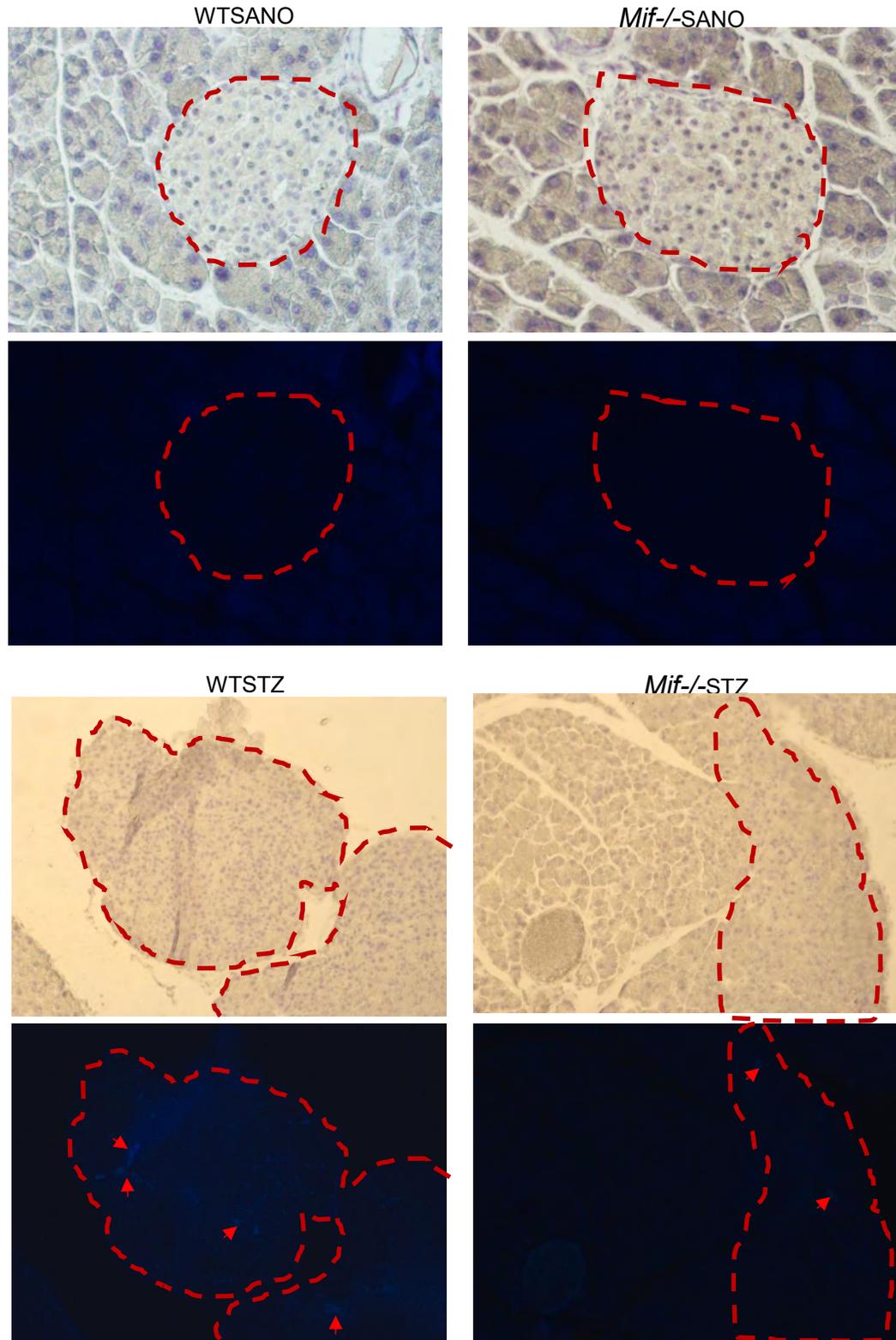


Figura 17. Inmunofluorescencia primaria de F4/80 en islotes pancreáticos de ratones WT y *Mif*^{-/-} sanos y a las 8 semanas posteriores a la inducción con STZ. Las flechas rojas indican la fluorescencia correspondiente a las células F480+.

CDs *CD11c*⁺. De igual forma analizamos la presencia de células dendríticas por medio de la tinción con anticuerpo anti-CD11c APC *in situ* en islotes pancreáticos de ratones WT y *Mif*^{-/-} sanos y a las 8 semanas posteriores a la inducción con STZ.

Se observó que en los islotes de los ratones WT y *Mif*^{-/-} sanos no se obtuvieron puntos de fluorescencia. Por el contrario, en los islotes pancreáticos de ratones WT STZ se obtuvieron puntos de fluorescencia, los islotes pancreáticos de este grupo se encontraron prácticamente destruidos, figura 24.

En los islotes de los ratones *Mif*^{-/-}-STZ no se encontraron puntos de fluorescencia, sin embargo, se observó una ligera deformación de la morfología de los islotes; lo que reveló que no son islotes sanos pero el daño es mínimo. Estos resultados concuerdan con lo observado mediante citometría de flujo en páncreas (gráfica 10).

CD80. Adicionalmente medimos la expresión de la molécula co-estimuladora CD80 con un fluorocromo anti CD80-FITC y observamos que la expresión de la molécula CD80 correlaciona con la presencia de Mφ y CDs en el infiltrado de los ratones WTSTZ, mientras que no se encontró fluorescencia positiva en los ratones *Mif*^{-/-}-STZ a las 8 semanas posteriores a la inducción (figura 25).

CD86. Por último, analizamos la presencia de la molécula co-estimuladora CD86 con un anticuerpo anti CD86-FITC y no se obtuvieron lecturas positivas en ninguno de los grupos (figura 26).

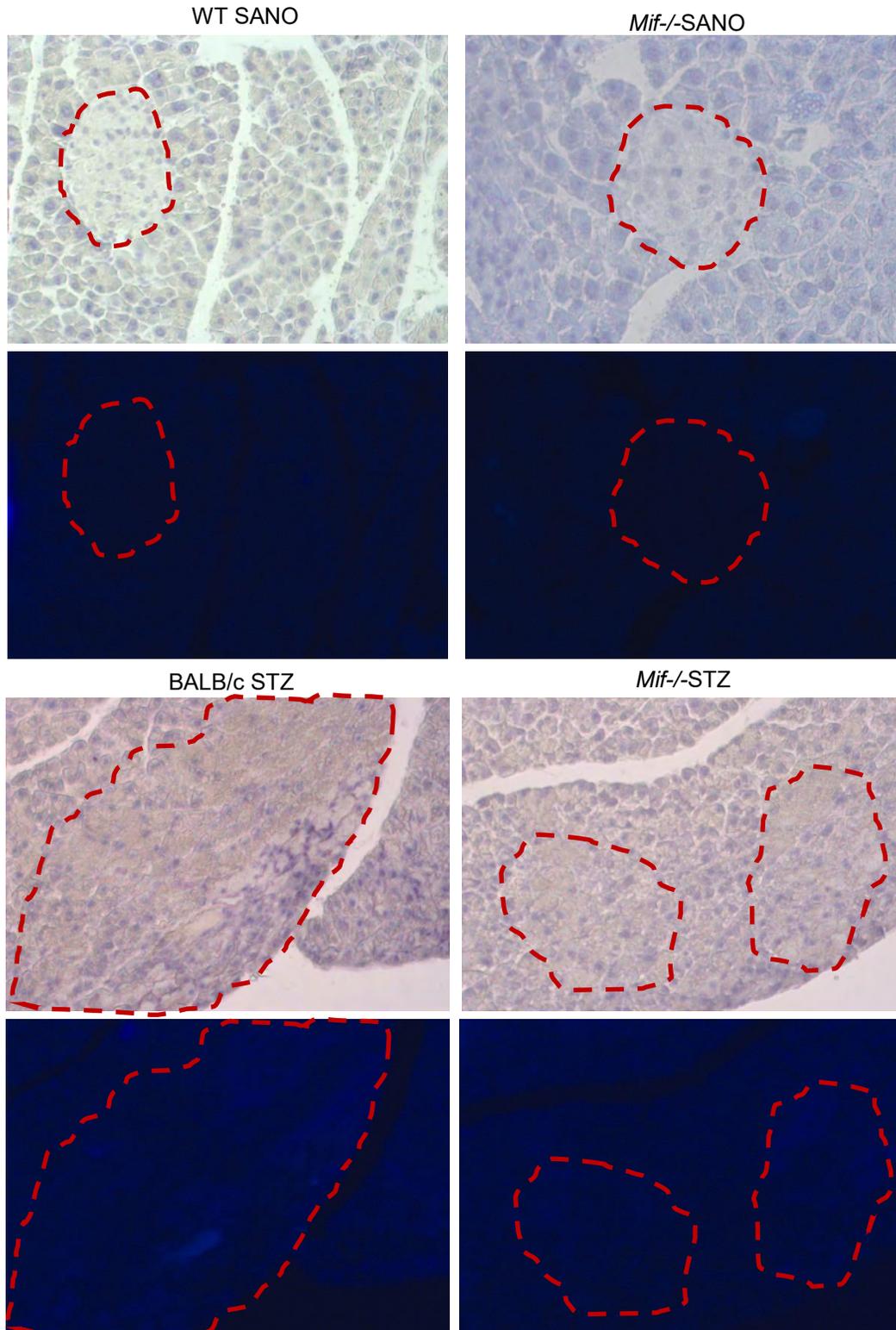


Figura 18. Inmunofluorescencia primaria de CD11c en islotes pancreáticos de ratones WT y *Mif*^{-/-} sanos y a las 8 semanas posteriores a la inducción con STZ.

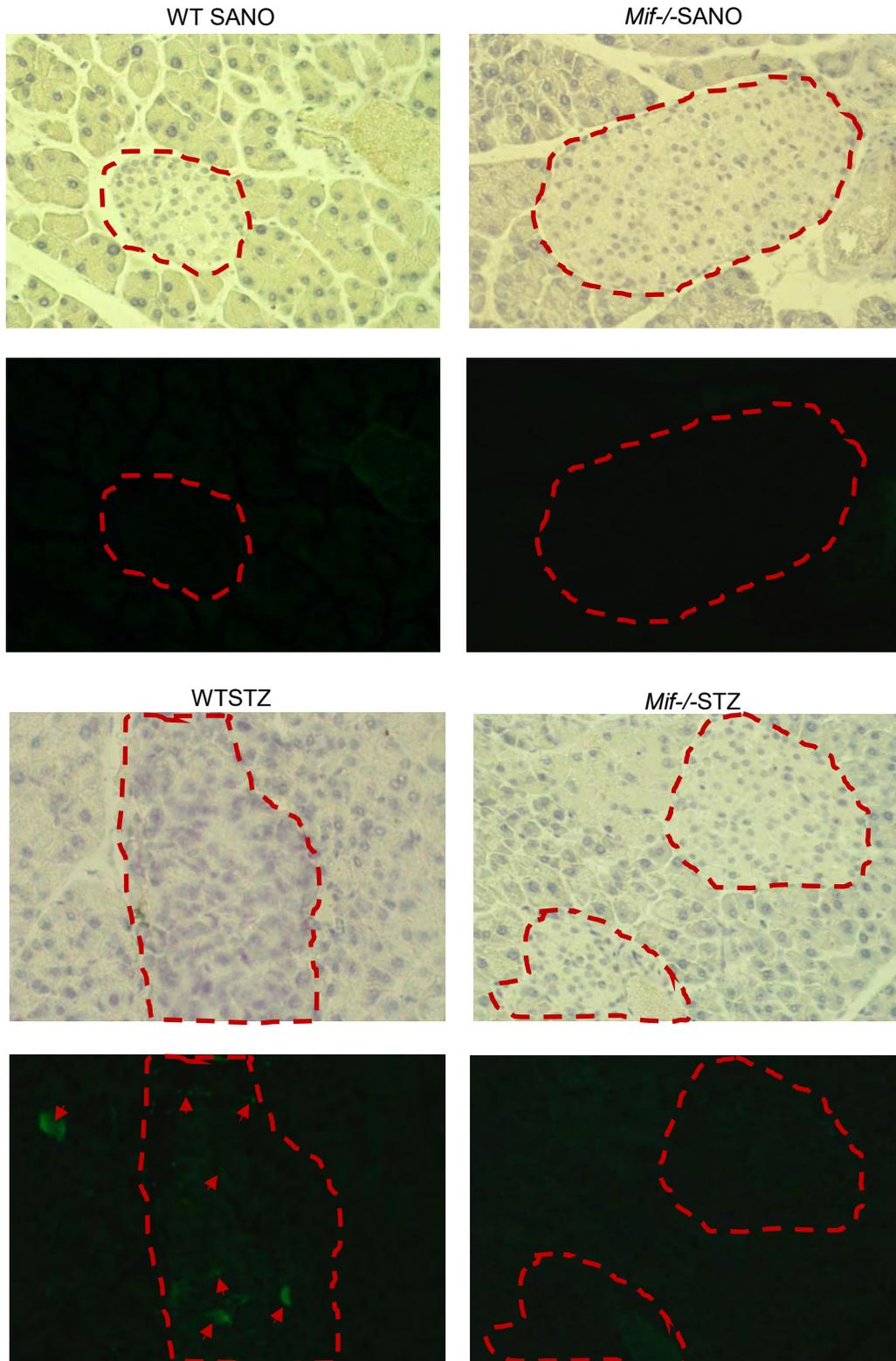


Figura 19. Inmunofluorescencia primaria de CD80- FITC en islotes pancreáticos de ratones WT y *Mif*^{-/-} sanos y a las 8 semanas posteriores a la inducción con STZ.

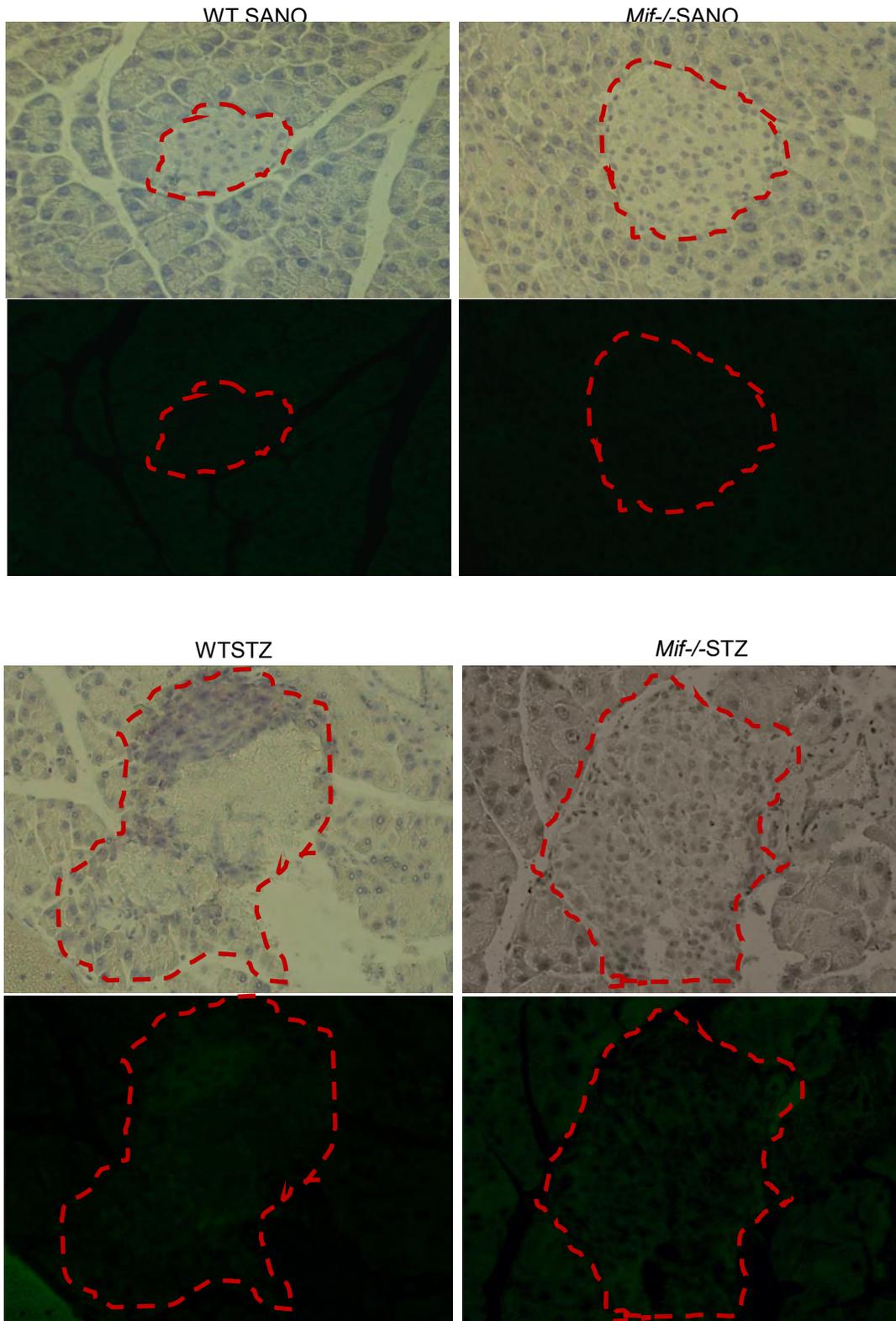
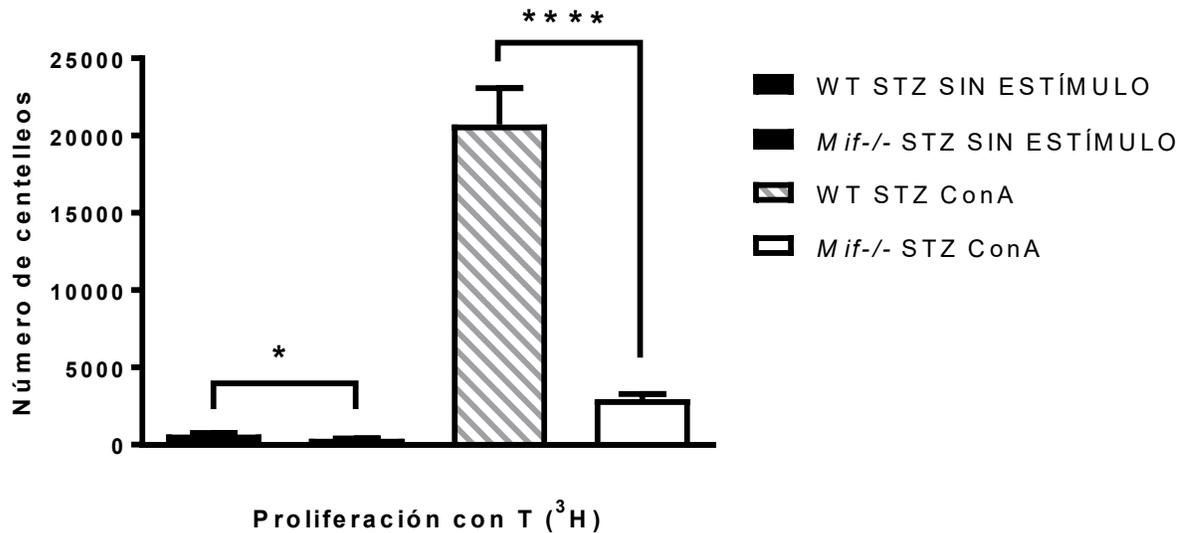


Figura 20. Inmunofluorescencia primaria de CD86- FITC en islotes pancreáticos de ratones WT y Mif-/- sanos y a las 8 semanas posteriores a la inducción con STZ.

Evaluación de presentación de Ag de Mφ de ratones WT y MIF-/- sanos y con 8 semanas post tratamiento con STZ.

Evaluamos la capacidad de presentación de Ag de Mφ de ratones WT y *Mif*^{-/-} sanos y con 8 semanas post inducción con STZ con base a su capacidad de promover la proliferación en linfocitos de ratones Tg OVA (por la técnica de incorporación con timidina tritiada- TdR H) y observamos que la mayor proliferación se obtuvo con los macrófagos originarios de ratones WT STZ comparado con la proliferación observada en las células provenientes de ratones *Mif*^{-/-}STZ, por lo que se comprueba que los macrófagos deficientes de MIF no son capaces de promover una proliferación de linfocitos eficiente, Gráfica 27.



Gráfica 17. Proliferación de esplenocitos en presencia de macrófagos WT STZ y *Mif*^{-/-} STZ a las 8 semanas p.i. con STZ por ³H (Timidina tritiada). Como se observa, los ratones *Mif*^{-/-} con STZ no son capaces de promover una proliferación de linfocitos eficiente en respuesta al mitógeno concanavalina A (ConA). GraphPad Prism 6.

Cuantificación de citocinas de esplenocitos totales de ratones WT y *Mif*^{-/-} con 8 semanas p.i. con STZ por el método de RT-PCR

Dado que el bazo es un órgano linfoide en el que se lleva a cabo la activación de linfocitos, se cuantificó la producción de citocinas en esplenocitos que pudieran darnos una idea de qué tipo de clones de linfocitos T estaban proliferando en bazo y obtuvimos lo siguiente (figura 27):

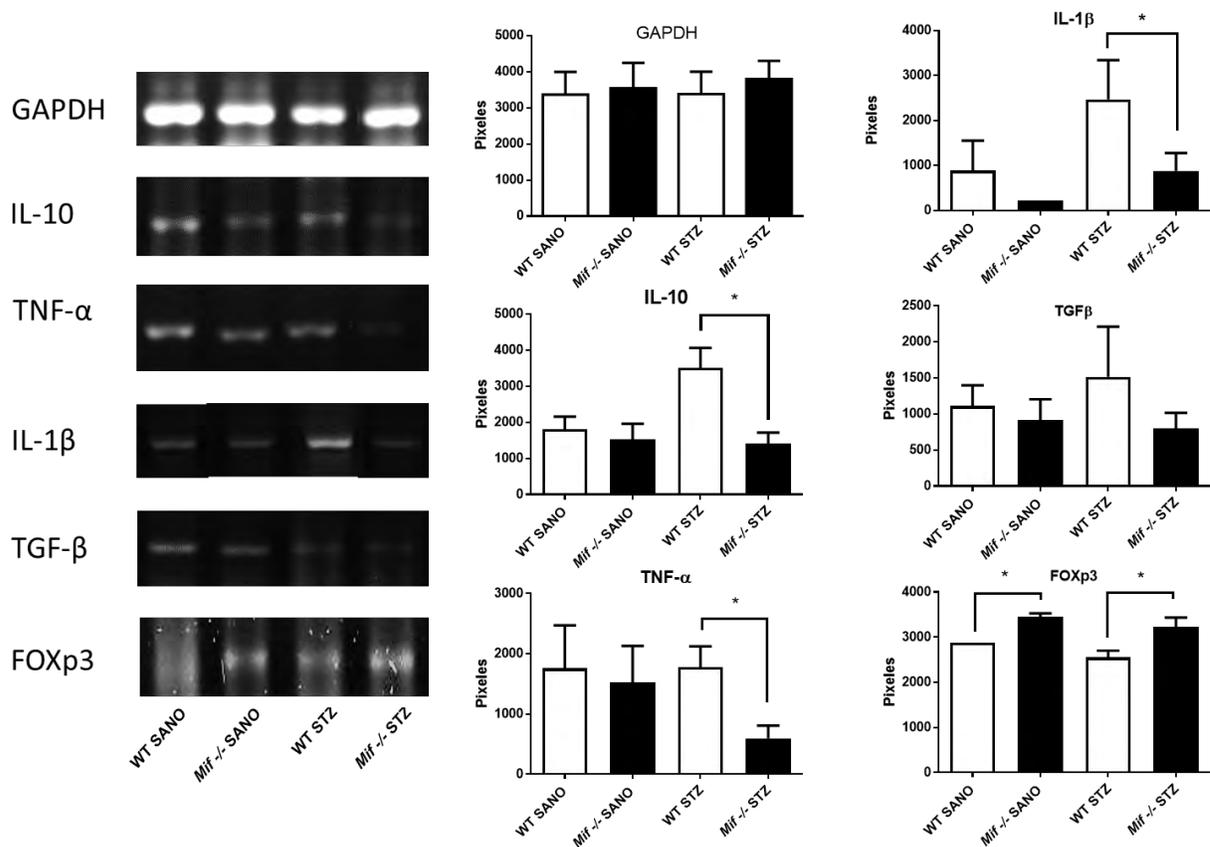


Figura 27. Cuantificación de IL-1β, IL-10, TGF-β, TNF-α y el regulador de la transcripción FOXP3 en esplenocitos totales de ratones WT y *Mif*^{-/-} sanos y con 8 semanas post-inducción con STZ. GraphPad Prism 6.

Los ratones *Mif*^{-/-}STZ presentaron menor expresión de IL-1β, IL-10 y TNF-α, con respecto a los ratones WT STZ, mientras que, en los ratones *Mif*^{-/-}STZ se presentó

mayor expresión del factor de transcripción FOXP3 que es un regulador maestro de la actividad y desarrollo de linfocitos T reguladores.

ANÁLISIS DE RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

Actualmente, no hay duda de que MIF es una molécula clave que promueve la respuesta inmune pro-inflamatoria (176). Esta propiedad contribuye al desarrollo de la respuesta inmune Th1 protectora en diferentes modelos de enfermedades parasitarias (161). Recientemente se ha establecido que los niveles elevados de MIF en sangre están asociados con DMT1 en humano, lo cual también se observa en modelos experimentales de DMT1 en ratones (162,141,143, 163).

En los estudios en ratones NOD o ratones tratados con múltiples dosis bajas de STZ (a pesar de las diferencias patogénicas entre estos modelos) se ha demostrado que la destrucción de las células pancreáticas resulta del efecto tóxico de los radicales libres (O_2^- , H_2O_2 y óxido nítrico) y citoquinas inflamatorias liberadas por M ϕ alternativamente activados y células T (164- 166). Por lo tanto, ambos modelos han sido ampliamente utilizados para diseccionar el papel de MIF en la patogénesis de la DMT1 utilizando anticuerpos monoclonales anti-MIF o utilizando ratones *Mif*^{-/-}. En cualquier caso, la falta de MIF resultó en la disminución de la manifestación de la enfermedad, la disminución de los niveles de glucosa en sangre, y la reducción de la producción de citocinas inflamatorias asociadas con el desarrollo de T1DM, incluyendo TNF- α , IL- 1 β , IFN- γ , IL- 12, e IL - 23 (141,167, 143).

Nuestro estudio valida y extiende estos hallazgos, demostrando un papel importante para MIF en la promoción de la expresión de las moléculas co-estimuladora en M ϕ y DCs durante el desarrollo de DMT1. Demostramos además que, los M ϕ aislados de ratones *Mif*^{-/-} - STZ muestran una activación de células T reducida.

En la DMT1 es importante el conocimiento del inicio de la insulinitis a nivel de presentación de antígenos propios ya que esto puede revelar nuevos blancos terapéuticos que, en sinergia con los ya existentes, puedan lograr un mejor control de la DMT1 e incluso favorecer un diagnóstico temprano de la enfermedad. MIF es una citocina pro-inflamatoria ampliamente relacionada con el diagnóstico y el desarrollo de la DMT1 (100,138); sin embargo, no se había evaluado a nivel celular en el proceso de presentación de antígenos y moléculas co-estimuladoras propios en esta enfermedad.

En este trabajo de tesis, evaluamos la participación de MIF en la activación y maduración de M ϕ y CD s que participan en la presentación de antígenos propios y por tanto en el inicio de la insulinitis. Como herramienta principal para desarrollar este trabajo se utilizaron ratones deficientes en la molécula de MIF (*Mif*^{-/-}) bajo el fondo genético Balb/c. Debido a que utilizar ratones Knock-out ha generado mucha polémica pues se ha sugerido que la deficiencia de un gen puede provocar alteraciones en otros genes (157,158), se validó el modelo de inducción de DMT1 con múltiples dosis de STZ en ratones WT y *Mif*^{-/-}.

La STZ (producida por la bacteria *Streptomyces achromogenes*) contiene en su estructura química una molécula de glucosa (en forma deoxi) vinculada con una fracción metil-nitroso-urea altamente reactiva (159), a la cual se le atribuyen los efectos citotóxicos, mientras que la glucosa se dirige directamente a las células β del páncreas (Figura 28).

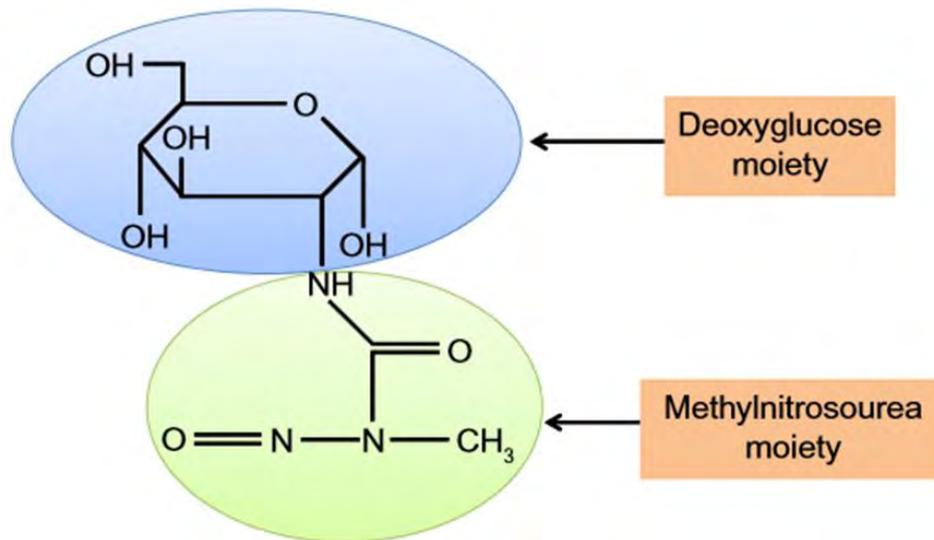


Figura 21. Estructura química de la estreptozotocina (STZ) (160).

La STZ es reconocida por el transportador de glucosa 2 (GLUT-2), el cual está ampliamente expresado en la membrana plasmática de las células β del páncreas, en las cuales provoca necrosis celular debido a la fragmentación del DNA por especies reactivas de oxígeno (160).

Recientemente, se ha reportado que MIF es producido por las células pancreáticas y que es liberado por los gránulos de insulina en forma autócrina (168, 169). El daño químico de los islotes pancreáticos por la STZ en los ratones WT resulta en la destrucción de los islotes pancreáticos; lo que podría reducir una fuente importante de MIF en este modelo experimental. Sin embargo, no se observó una reducción en los niveles de MIF en los ratones WT STZ este modelo. En contraste, los ratones WT produjeron altos niveles séricos de MIF después de la administración de STZ. En este sentido, se sabe que los islotes pancreáticos que quedan después del tratamiento con STZ producen altos niveles de MIF [21] y que una elevación de la

secreción de MIF precede la muerte de los islotes pancreáticos inducida por IFN- γ , TNF- α e IL-1 β (143). Esta evidencia establece que la STZ no influyó en la producción / liberación de MIF por islotes pancreáticos u otras fuentes, sin embargo, en los ratones *Mif*^{-/-}, la ausencia de MIF podría alterar la expresión del GLUT-2 importante para el inicio del modelo.

En el presente trabajo, se evaluó la producción o expresión de GLUT-2 en los islotes pancreáticos de ratones WT y *Mif*^{-/-} sanos con la finalidad de verificar que la ausencia de MIF no modifica la producción y expresión de GLUT-2; como se muestra en la figura 13 B, no se encontraron diferencias significativas en el mRNA de GLUT-2 entre los ratones WT y *Mif*^{-/-}. Se estudió la expresión del GLUT-2 en membrana plasmática de las células β pancreáticas por inmunofluorescencia (figura 13 A), en donde tampoco se encontraron diferencias en expresión del GLUT-2 entre los ratones WT y *Mif*^{-/-}. Además, se evaluó la forma de los islotes pancreáticos (figura 12) y la presencia de insulina (figura 14, gráfica 2) en ratones WT y *Mif*^{-/-} sanos sin encontrar ninguna diferencia significativa entre los grupos. Todo lo anterior nos llevó a concluir que la STZ es capaz de ejercer su efecto de manera equitativa en ambos grupos y que la ausencia de MIF no influye en este proceso. Además, para complementar la validación del modelo se administró STZ en altas concentraciones (80mg/Kg X5) con la cual ambos grupos estudiados mueren rápidamente. Con lo anterior, se prueba que el modelo es totalmente válido para ambos grupos.

De acuerdo con los resultados obtenidos posteriores a la inducción con STZ en ambos grupos, MIF es una molécula importante para el desarrollo de la

hiperglucemia en el modelo de DMT1 experimental (gráfica 3). Este resultado concuerda con reportes previos en los cuales MIF es inhibido con el fármaco “(S,R)-3-(4-hydroxyphenyl)-4,5-dihydro-5-isoxazole ácido acético metil éster” en un modelo de diabetes autoinmune (141) o con un anticuerpo anti-MIF en ratones NOD (43), logrando así un decremento en la hiperglucemia. Efecto que en este trabajo se demostró *in vivo* y con un método más confiable.

Por otro lado, MIF resultó ser una citocina clave en el proceso inflamatorio autoinmune que se lleva a cabo en los islotes pancreáticos. La deficiencia de MIF en los ratones MIF ko se reflejó en la baja producción de citocinas inflamatorias en los ratones *Mif*^{-/-}STZ (gráfica 4). Se ha reportado que las citocinas más importantes en el desarrollo de la DMT1 son IL-1 β , TNF α , IL-12 e IFN γ (42). Ante la ausencia de MIF, estas citocinas se encontraron en concentraciones bajas en ratones *Mif*^{-/-}STZ; este resultado coincide con otro reporte que establece que MIF promueve la producción de estas citocinas inflamatorias e incluso intervienen en la apoptosis de las células β pancreáticas (142).

MIF ha sido reconocido como una molécula que no sólo promueve la producción de citoquinas pro-inflamatorias, sino que también actúa como quimiocina. Por ejemplo, MIF desempeña un papel crucial en el reclutamiento y retención de leucocitos durante el desarrollo de la aterosclerosis [57]. Por lo tanto, MIF podría participar en el proceso de insulinitis promoviendo la producción de citoquinas pro-inflamatorias, y el reclutamiento de leucocitos en los islotes pancreáticos. En el presente modelo, los ratones WTSTZ presentaron un número mayor de islotes infiltrados a las 8 semanas posteriores a la inducción con STZ (tabla 1) comparado con los ratones

Mif^{-/-}-STZ. Además, el grado de infiltración fue mayor en los ratones WTSTZ, y presentaron concentraciones elevadas de anticuerpos IgG2a (relacionado a una respuesta Th1) específicos contra AgTIP; mientras que en los ratones *Mif*^{-/-}-STZ se encontró un menor número de islotes infiltrados y aquellos en los que se observó infiltración celular, ésta fue en menor grado. En ratones *Mif*^{-/-}-STZ se detectaron concentraciones menores de anticuerpo IgG2a y mayores concentraciones de anticuerpo IgG1 (ambos específicos contra AgTIP). Esto revela que la presencia de MIF conduce al establecimiento de una reacción inflamatoria eficiente y a la infiltración en los islotes pancreáticos.

Adicionalmente, se observó que MIF favorece el reclutamiento e infiltración celular en el páncreas en modelo experimental de DMT1 (figura 16; gráficas 8 y 9) ya que en los ratones *Mif*^{-/-}-STZ se contabilizaron cuentas menores de M ϕ y CDs comparado con los ratones WTSTZ. La misma tendencia se observó en órganos linfoides cercanos como bazo (figura 17, gráficas 10 y 11) y cavidad peritoneal (gráfica 12 y 13).

Las células presentadoras de antígeno, concretamente M ϕ y CDs, son mediadores clave del desarrollo de DMT1 [4]. Por otra parte, se ha propuesto que CDs orquestan la respuesta autoinmune en la DMT1 a través de TLR-2 y TLR-4 (170). Estudios anteriores han demostrado que MIF induce la expresión de moléculas co-estimuladoras en M ϕ y DC en algunas infecciones patológicas (171, 172). Aquí, se identificó la expresión de moléculas co-estimuladoras como CD80 y CD86, TLR-2 y TLR-4 en M ϕ y CDs, así como la capacidad de los M ϕ para activar linfocitos T.

MIF influye en la expresión de moléculas co-estimuladoras CD80 y CD86 en M ϕ y CDs (figuras 18- 20; gráficas 8- 13), estos resultados concuerdan con un estudio en ratones NOD en donde se demuestra que el bloqueo de CD86 previene el desarrollo de la DMT1 [63] MIF también influye la expresión apropiada de receptores de membrana como MHC-II, TLR-2 y TLR-4 (gráficas 14- 16) y moléculas de membrana como CD40 y CCR5 (figuras 17 y 18). Trabajos previos han propuesto que MIF puede mediar la expresión de moléculas co-estimuladoras en M ϕ y CDs, ya sea por estímulos inflamatorios o enfermedades infecciosas (136,137). Nuestros resultados obtenidos en el modelo de DMT1 experimental coinciden con estos antecedentes.

Para corroborar que los resultados obtenidos en este trabajo se debían a MIF, se reconstituyeron las concentraciones de MIF en ratones *Mif*^{-/-}-STZ con base a las concentraciones plasmáticas de MIF en ratones WTSTZ (figura 11); tras la reconstitución de MIF en ratones deficientes, la hiperglucemia se restableció (gráficas 19) y la producción de citocinas inflamatorias aumentó a niveles parecidos en los ratones WTSTZ (gráficas 20- 24), con lo que se ratificó el papel de MIF en el proceso de inflamación en la DMT1 experimental. Dado que los niveles de IL-6 e IL-12 bajaron en las últimas semanas posteriores a la restitución con STZ, se confirma que MIF es un poderoso inductor de IL-6 e IL-12, pero sólo si está presente en una concentración constante.

Además, observamos que los ratones *Mif*^{-/-} STZ no produjeron niveles altos de auto anticuerpos de islotes, en contraste con los ratones WT STZ, que produjeron altos niveles de auto anticuerpos contra ATIP. Es bien sabido que la presencia temprana

de auto anticuerpos de islotes es decisiva en el desarrollo de la diabetes en los ratones NOD, así como en humanos (173- 175). Nuestros resultados confirman que MIF es esencial para el desarrollo de la hiperglucemia y sugieren que MIF no sólo juega un papel importante en la respuesta inmune innata, sino también en la respuesta inmune adaptativa en T1DM.

Por otro lado, con base en nuestras observaciones, se probó que MIF es importante para controlar la proliferación de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺ (figura 21, graficas 25 y 26). Además de ser un factor limitante en la proliferación de células T reguladoras (figura 22).

Con los datos obtenidos en este estudio se puede establecer a MIF como una molécula que promueve el desarrollo de la insulinitis a diferentes niveles, como se muestra en la figura 29.

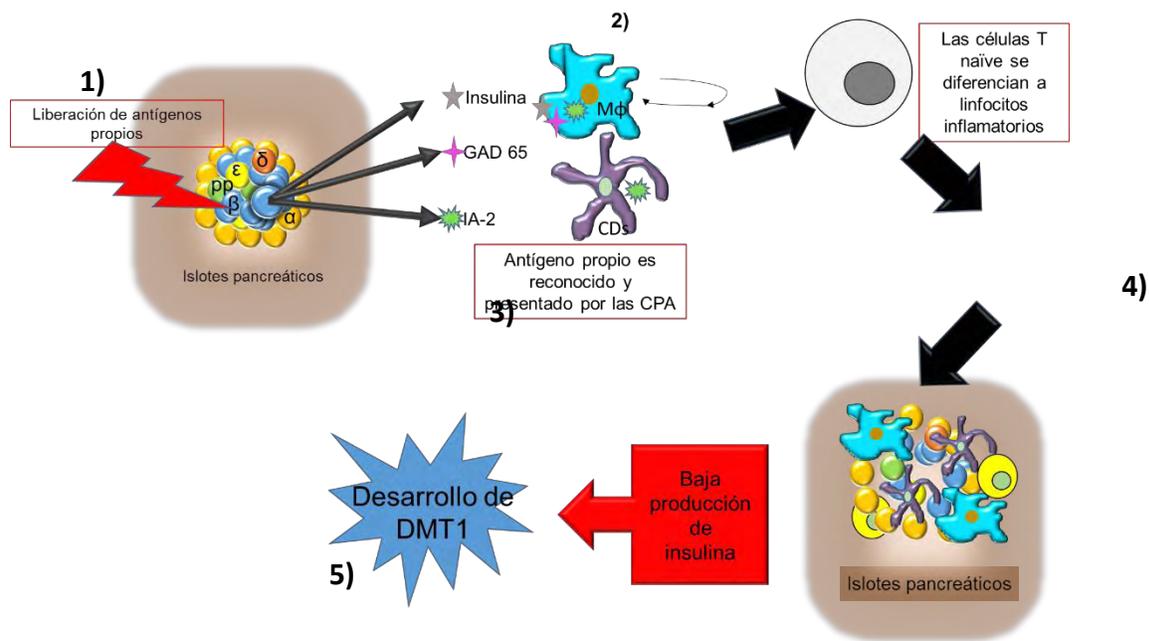


Figura 29. Papel de MIF en el desarrollo de la insulinitis. 1) Posterior a la liberación de antígenos propios en los islotes pancreáticos, 2) MIF favorece la producción de citocinas inflamatorias como

IL-1 β , TNF- α e IL-12. 3) MIF favorece el reconocimiento y presentación de antígenos propios en CPA y 4) promueve la activación de una respuesta inflamatoria, dando lugar a la insulinitis 5) y al desarrollo de la DMT1, imagen modificada de 100.

Resumen de resultados

Con base a los resultados anteriormente descritos y analizados, se puede resumir que:

- 1.- No hay evidencia de que el efecto “tóxico” de la STZ pudiera ser diferente entre los ratones WT y *Mif*^{-/-}.
2. Los ratones WT STZ desarrollaron un grado de inflamación mayor, mientras que los ratones *Mif*^{-/-}-STZ desarrollaron una menor respuesta inflamatoria, lo anterior fue determinado por los niveles de citocinas pro-inflamatorias en sangre
3. Los islotes pancreáticos de los ratones WT STZ presentaron mayor infiltrado celular a las 8 semanas p.i. comparado con los ratones *Mif*^{-/-}-STZ, lo que indicó que MIF tiene una participación importante en el proceso de atracción celular hacia los islotes pancreáticos o participa en el reconocimiento y presentación de los antígenos propios de manera indirecta.
4. MIF influye en el reclutamiento de M ϕ y CDs en el páncreas en el modelo de DMT1 experimental. Además, influye en la expresión de las moléculas co-estimuladoras CD80, CD86 y CD40 en estas células.
5. MIF es importante para la correcta expresión de receptores de membrana como MHC-II, TLR-2, TLR-4 y CCR5 en macrófagos y células dendríticas en un modelo de DMT1 inducida con STZ.

6. Con la restitución de la proteína recombinante de MIF en ratones *Mif*^{-/-} STZ a nivel sistémico se reestableció la hiperglucemia y la concentración de las citocinas inflamatorias, promoviendo el desarrollo de la insulinitis.

7. MIF es importante para el control de la proliferación de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺. Además de ser un factor limitante en la proliferación de linfocitos T reguladores CD4⁺CD8⁺Foxp3⁺.

8. Los linfocitos de bazo de ratones WT STZ fueron más reactivos en el proceso de presentación de Ag.

CONCLUSIÓN

MIF es una citocina característica del sistema inmune innato que favorece al desarrollo de la insulinitis presente en la DMT1, debido a que MIF beneficia la expresión de moléculas co-estimuladoras, que apoyan el reconocimiento de los antígenos propios, promueve la producción de auto anticuerpos contra los antígenos de islote pancreático e intensifica la insulinitis, por lo que MIF puede ser considerado como un blanco terapéutico eficiente para el control de síntomas y diagnóstico de la enfermedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Pascale, R., Vitale, M., Zeppa, P., Russo, E., and Esposito, S. (2012) *Infez Med* **20 Suppl 1**, 5-7
2. Yamashita, K. (1999) *Nihon Rinsho* **57**, 556-560
3. Whiting, D. R., Guariguata, L., Weil, C., and Shaw, J. (2011) *Diabetes Res Clin Pract* **94**, 311-321
4. INEGI. (2012) *Disponible en: <http://www3.inegi.org.mx/sistemas/sisept/Default.aspx?t=mdemo107&s=est&c=23587>*
5. Federación Mexicana de Diabetes, A. C. (2014) *Disponible en: <http://fmdiabetes.org.mx/diabetes-en-mexico/>*
6. (2010) *Diabetes Care* **33 Suppl 1**, S62-69
7. Acharjee, S., Ghosh, B., Al-Dhubiab, B. E., and Nair, A. B. (2013) *Can J Diabetes* **37**, 269-276
8. Gale, E. A. (2002) *Diabetes* **51**, 3353-3361
9. Billings, L. K., and Florez, J. C. (2010) *Ann N Y Acad Sci* **1212**, 59-77
10. Banerjee, M., and Vats, P. (2014) *Indian J Hum Genet* **20**, 10-19
11. Faganello, G., Cioffi, G., Faggiano, P., Candido, R., Tarantini, L., De Feo, S., Di Lenarda, A., and de Simone, G. (2014) *Acta Diabetol*
12. Shin, J. A., Lee, J. H., Lim, S. Y., Ha, H. S., Kwon, H. S., Park, Y. M., Lee, W. C., Kang, M. I., Yim, H. W., Yoon, K. H., and Son, H. Y. (2013) *J Diabetes Investig* **4**, 334-343
13. Eckel, R. H., Grundy, S. M., and Zimmet, P. Z. (2005) *Lancet* **365**, 1415-1428
14. Verschuren, L., Kooistra, T., Bernhagen, J., Voshol, P. J., Ouwens, D. M., van Erk, M., de Vries-van der Weij, J., Leng, L., van Bockel, J. H., van Dijk, K. W., Fingerle-Rowson, G., Bucala, R., and Kleemann, R. (2009) *Circ Res* **105**, 99-107
15. Kerner, W., and Bruckel, J. (2014) *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **122**, 384-386
16. Roden, M. (2012) *Wien Klin Wochenschr* **124 Suppl 2**, 1-3
17. Roden, M. (2004) *Acta Med Austriaca* **31**, 156-157
18. Alberti, K. G., and Zimmet, P. Z. (1998) *Diabet Med* **15**, 539-553
19. Boitard, C. (2012) *Presse Med* **41**, e636-650
20. Dumont-Driscoll, M. C. (2012) *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* **42**, 267-268
21. Gan, M. J., Albanese-O'Neill, A., and Haller, M. J. (2012) *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* **42**, 269-291
22. Maahs, D. M., West, N. A., Lawrence, J. M., and Mayer-Davis, E. J. (2010) *Endocrinol Metab Clin North Am* **39**, 481-497
23. Zipris, D. (2009) *Clin Immunol* **131**, 11-23
24. Craig, M. E., Howard, N. J., Silink, M., and Chan, A. (2000) *J Pediatr Endocrinol Metab* **13**, 363-372
25. Yang, Z., Wang, K., Li, T., Sun, W., Li, Y., Chang, Y. F., Dorman, J. S., and LaPorte, R. E. (1998) *Diabetes Care* **21**, 525-529
26. Li, S., Zhang, M., Tian, H., Liu, Z., Yin, X., and Xi, B. (2014) *Obes Rev*
27. Foulis, A. K., Liddle, C. N., Farquharson, M. A., Richmond, J. A., and Weir, R. S. (1986) *Diabetologia* **29**, 267-274
28. Kroemer, G., Hirsch, F., Gonzalez-Garcia, A., and Martinez, C. (1996) *Autoimmunity* **24**, 25-33
29. (2008) *Ann N Y Acad Sci* **1150**, 1-13
30. Sabanayagam, C., Khoo, E. Y., Lye, W. K., Ikram, M. K., Lamoureux, E. L., Cheng, C. Y., Tan, M. L., Salim, A., Lee, J. J., Lim, S. C., Tavintharan, S., Thai, A. C., Heng, D., Ma, S., Tai, E. S., and Wong, T. Y. (2014) *J Clin Endocrinol Metab*, jc20142498

31. Uehara, A., Kurotani, K., Kochi, T., Kuwahara, K., Eguchi, M., Imai, T., Nishihara, A., Tomita, K., Yamamoto, M., Kuroda, R., Nagata, T., Omoto, D., Murakami, T., Shimizu, C., Shimizu, M., Miyamoto, T., Nagahama, S., Nakagawa, T., Honda, T., Yamamoto, S., Okazaki, H., Sasaki, N., Nanri, A., Pham, N. M., Kabe, I., Mizoue, T., Kunugita, N., and Dohi, S. (2014) *Diabetes Res Clin Pract* **106**, 118-127
32. Hummel, M., Bonifacio, E., Schmid, S., Walter, M., Knopff, A., and Ziegler, A. G. (2004) *Ann Intern Med* **140**, 882-886
33. Jahromi, M. M., and Eisenbarth, G. S. (2007) *Cell Mol Life Sci* **64**, 865-872
34. Barker, J. M., Barriga, K. J., Yu, L., Miao, D., Erlich, H. A., Norris, J. M., Eisenbarth, G. S., and Rewers, M. (2004) *J Clin Endocrinol Metab* **89**, 3896-3902
35. Orban, T., Sosenko, J. M., Cuthbertson, D., Krischer, J. P., Skyler, J. S., Jackson, R., Yu, L., Palmer, J. P., Schatz, D., and Eisenbarth, G. (2009) *Diabetes Care* **32**, 2269-2274
36. Niskanen, L., Karjalainen, J., Sarlund, H., Siitonen, O., and Uusitupa, M. (1991) *Diabetologia* **34**, 402-408
37. Atkinson, M. A., Maclaren, N. K., Holmes, L., Scharp, D. W., Lacy, P. E., and Riley, W. J. (1990) *J Autoimmun* **3 Suppl 1**, 41-45
38. Libman, I. M., Pietropaolo, M., Trucco, M., Dorman, J. S., LaPorte, R. E., and Becker, D. (1998) *Diabetes Care* **21**, 1824-1827
39. Taplin, C. E., and Barker, J. M. (2008) *Autoimmunity* **41**, 11-18
40. Wenzlau, J. M., Juhl, K., Yu, L., Moua, O., Sarkar, S. A., Gottlieb, P., Rewers, M., Eisenbarth, G. S., Jensen, J., Davidson, H. W., and Hutton, J. C. (2007) *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 17040-17045
41. Kawasaki, E. (2014) *Clin Pediatr Endocrinol* **23**, 99-105
42. Baumann, B., Salem, H. H., and Boehm, B. O. (2012) *Curr Diab Rep* **12**, 499-509
43. Stosic-Grujicic, S., Stojanovic, I., Maksimovic-Ivanic, D., Momcilovic, M., Popadic, D., Harhaji, L., Miljkovic, D., Metz, C., Mangano, K., Papaccio, G., Al-Abed, Y., and Nicoletti, F. (2008) *J Cell Physiol* **215**, 665-675
44. Eizirik, D. L., Colli, M. L., and Ortis, F. (2009) *Nat Rev Endocrinol* **5**, 219-226
45. Buckwalter, M. R., and Albert, M. L. (2009) *Curr Biol* **19**, R355-361
46. Steinman, R. M. (2007) *Nat Med* **13**, 1155-1159
47. Lewis, K. L., and Reizis, B. (2012) *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, a007401
48. Sato, K., and Fujita, S. (2007) *Allergol Int* **56**, 183-191
49. Merad, M., Sathe, P., Helft, J., Miller, J., and Mortha, A. (2013) *Annu Rev Immunol* **31**, 563-604
50. Hivroz, C., Chemin, K., Turret, M., and Bohineust, A. (2012) *Crit Rev Immunol* **32**, 139-155
51. Wilson, N. S., Young, L. J., Kupresanin, F., Naik, S. H., Vremec, D., Heath, W. R., Akira, S., Shortman, K., Boyle, J., Maraskovsky, E., Belz, G. T., and Villadangos, J. A. (2008) *Immunol Cell Biol* **86**, 200-205
52. Steinman, R. M., and Nussenzweig, M. C. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 351-358
53. Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2010) *Science* **327**, 291-295
54. Kawai, T., and Akira, S. (2011) *Immunity* **34**, 637-650
55. Chen, G. Y., and Nunez, G. (2010) *Nat Rev Immunol* **10**, 826-837
56. Yao, V., Platell, C., and Hall, J. C. (2002) *ANZ J Surg* **72**, 501-506
57. Sozzani, S., Allavena, P., D'Amico, G., Luini, W., Bianchi, G., Kataura, M., Imai, T., Yoshie, O., Bonocchi, R., and Mantovani, A. (1998) *J Immunol* **161**, 1083-1086
58. Stockwin, L. H., McGonagle, D., Martin, I. G., and Blair, G. E. (2000) *Immunol Cell Biol* **78**, 91-102

59. Inaba, K., Witmer-Pack, M., Inaba, M., Hathcock, K. S., Sakuta, H., Azuma, M., Yagita, H., Okumura, K., Linsley, P. S., Ikehara, S., Muramatsu, S., Hodes, R. J., and Steinman, R. M. (1994) *J Exp Med* **180**, 1849-1860
60. Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Azuma, M., Okumura, K., Lanier, L. L., and Banchereau, J. (1994) *J Exp Med* **180**, 1841-1847
61. Steinman, R. M., Turley, S., Mellman, I., and Inaba, K. (2000) *J Exp Med* **191**, 411-416
62. Snijders, A., Kalinski, P., Hilkens, C. M., and Kapsenberg, M. L. (1998) *Int Immunol* **10**, 1593-1598
63. Takahashi, K., Honeyman, M. C., and Harrison, L. C. (1998) *J Immunol* **161**, 2629-2635
64. Italiani, P., and Boraschi, D. (2014) *Front Immunol* **5**, 514
65. Sieweke, M. H., and Allen, J. E. (2013) *Science* **342**, 1242974
66. Epelman, S., Lavine, K. J., and Randolph, G. J. (2014) *Immunity* **41**, 21-35
67. Arango Duque, G., and Descoteaux, A. (2014) *Front Immunol* **5**, 491
68. Murray, P. J., and Wynn, T. A. (2011) *J Leukoc Biol* **89**, 557-563
69. Fairweather, D., and Cihakova, D. (2009) *J Autoimmun* **33**, 222-230
70. Shanker, A. (2010) *Immunol Lett* **131**, 107-112
71. Mancino, A., and Lawrence, T. (2010) *Clin Cancer Res* **16**, 784-789
72. Mantovani, A., and Sica, A. (2010) *Curr Opin Immunol* **22**, 231-237
73. Silberman, D., Bucknum, A., Kozlowski, M., Matlack, R., and Riggs, J. (2010) *Immunobiology* **215**, 70-80
74. Nazimek, K., and Bryniarski, K. (2012) *Postepy Hig Med Dosw (Online)* **66**, 507-520
75. van den Berg, T. K., and Kraal, G. (2005) *Trends Immunol* **26**, 506-509
76. Sweeney, S., Grandolfo, D., Ruenraroengsak, P., and Tetley, T. D. (2015) *Int J Nanomedicine* **10**, 3115-3129
77. van Kasteren, S. I., Overkleeft, H., Ovaa, H., and Neefjes, J. (2014) *Curr Opin Immunol* **26**, 21-31
78. Fooksman, D. R. (2014) *Front Immunol* **5**, 158
79. Palmer, E. (2003) *Nat Rev Immunol* **3**, 383-391
80. Bouneaud, C., Kourilsky, P., and Bousso, P. (2000) *Immunity* **13**, 829-840
81. Zehn, D., and Bevan, M. J. (2006) *Immunity* **25**, 261-270
82. Tsai, S., and Santamaria, P. (2013) *Front Immunol* **4**, 321
83. Banchereau, J., Dubois, B., Fayette, J., Burdin, N., Briere, F., Miossec, P., Rissoan, M. C., van Kooten, C., and Caux, C. (1995) *Adv Exp Med Biol* **378**, 79-83
84. Bourgeois, C., Rocha, B., and Tanchot, C. (2002) *Science* **297**, 2060-2063
85. van Kooten, C., and Banchereau, J. (1997) *Curr Opin Immunol* **9**, 330-337
86. Bishop, G. A., Moore, C. R., Xie, P., Stunz, L. L., and Kraus, Z. J. (2007) *Adv Exp Med Biol* **597**, 131-151
87. Elgueta, R., Benson, M. J., de Vries, V. C., Wasiuk, A., Guo, Y., and Noelle, R. J. (2009) *Immunol Rev* **229**, 152-172
88. Jenkins, M. K., and Schwartz, R. H. (1987) *J Exp Med* **165**, 302-319
89. Harding, F. A., McArthur, J. G., Gross, J. A., Raulet, D. H., and Allison, J. P. (1992) *Nature* **356**, 607-609
90. Jenkins, M. K., Taylor, P. S., Norton, S. D., and Urdahl, K. B. (1991) *J Immunol* **147**, 2461-2466
91. Linsley, P. S., Wallace, P. M., Johnson, J., Gibson, M. G., Greene, J. L., Ledbetter, J. A., Singh, C., and Tepper, M. A. (1992) *Science* **257**, 792-795
92. Levisetti, M. G., Padrid, P. A., Szot, G. L., Mittal, N., Meehan, S. M., Wardrip, C. L., Gray, G. S., Bruce, D. S., Thistlethwaite, J. R., Jr., and Bluestone, J. A. (1997) *J Immunol* **159**, 5187-5191

93. Salomon, B., and Bluestone, J. A. (2001) *Annu Rev Immunol* **19**, 225-252
94. Tzachanis, D., Berezovskaya, A., Nadler, L. M., and Boussiotis, V. A. (2002) *Blood* **99**, 1465-1473
95. Lenschow, D. J., Ho, S. C., Sattar, H., Rhee, L., Gray, G., Nabavi, N., Herold, K. C., and Bluestone, J. A. (1995) *J Exp Med* **181**, 1145-1155
96. Poirier, N., Blancho, G., and Vanhove, B. (2011) *Transpl Int* **24**, 2-11
97. Bloom, B. R., and Bennett, B. (1966) *Science* **153**, 80-82
98. David, J. R. (1966) *Proc Natl Acad Sci U S A* **56**, 72-77
99. Calandra, T., and Roger, T. (2003) *Nat Rev Immunol* **3**, 791-800
100. Sanchez-Zamora, Y. I., and Rodriguez-Sosa, M. (2014) *J Diabetes Res* **2014**, 804519
101. Sun, H. W., Swope, M., Cinquina, C., Bedarkar, S., Bernhagen, J., Bucala, R., and Lolis, E. (1996) *Protein Eng* **9**, 631-635
102. Sun, H. W., Bernhagen, J., Bucala, R., and Lolis, E. (1996) *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 5191-5196
103. Cavallo, G. P., and Landolfo, S. (1980) *G Bacteriol Virol Immunol* **73**, 196-201
104. Sotnikova, N., and Koval'chuk, L. V. (1979) *Biull Eksp Biol Med* **88**, 311-314
105. Kotkes, P., and Pick, E. (1979) *Clin Exp Immunol* **37**, 532-539
106. Malorny, U., Goebeler, M., Gutwald, J., Roth, J., and Sorg, C. (1990) *Int Arch Allergy Appl Immunol* **92**, 356-360
107. de Jong, Y. P., Abadia-Molina, A. C., Satoskar, A. R., Clarke, K., Rietdijk, S. T., Faubion, W. A., Mizoguchi, E., Metz, C. N., Alshali, M., ten Hove, T., Keates, A. C., Lubetsky, J. B., Farrell, R. J., Michetti, P., van Deventer, S. J., Lolis, E., David, J. R., Bhan, A. K., and Terhorst, C. (2001) *Nat Immunol* **2**, 1061-1066
108. Abe, R., Shimizu, T., Ohkawara, A., and Nishihira, J. (2000) *Biochim Biophys Acta* **1500**, 1-9
109. Roger, T., Froidevaux, C., Martin, C., and Calandra, T. (2003) *J Endotoxin Res* **9**, 119-123
110. Sugimoto, H., Taniguchi, M., Nakagawa, A., Tanaka, I., Suzuki, M., and Nishihira, J. (1999) *Biochemistry* **38**, 3268-3279
111. Terrazas, C. A., Juarez, I., Terrazas, L. I., Saavedra, R., Calleja, E. A., and Rodriguez-Sosa, M. (2010) *Exp Parasitol* **126**, 348-358
112. Flores, M., Saavedra, R., Bautista, R., Viedma, R., Tenorio, E. P., Leng, L., Sanchez, Y., Juarez, I., Satoskar, A. A., Shenoy, A. S., Terrazas, L. I., Bucala, R., Barbi, J., Satoskar, A. R., and Rodriguez-Sosa, M. (2008) *FASEB J* **22**, 3661-3671
113. Reyes, J. L., Terrazas, L. I., Espinoza, B., Cruz-Robles, D., Soto, V., Rivera-Montoya, I., Gomez-Garcia, L., Snider, H., Satoskar, A. R., and Rodriguez-Sosa, M. (2006) *Infect Immun* **74**, 3170-3179
114. Renner, P., Roger, T., and Calandra, T. (2005) *Clin Infect Dis* **41 Suppl 7**, S513-519
115. Hoi, A. Y., Iskander, M. N., and Morand, E. F. (2007) *Inflamm Allergy Drug Targets* **6**, 183-190
116. Mitchell, R. A., Liao, H., Chesney, J., Fingerle-Rowson, G., Baugh, J., David, J., and Bucala, R. (2002) *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 345-350
117. Babu, S. N., Chetal, G., and Kumar, S. (2012) *Asian Pac J Cancer Prev* **13**, 1737-1744
118. Nishihira, J. (2012) *Ann N Y Acad Sci* **1271**, 53-57
119. Liu, R., Xu, N., Wang, X., Shen, L., Zhao, G., Zhang, H., and Fan, W. (2012) *Mol Biol Rep* **39**, 6915-6922
120. Liu, M., and Hu, C. (2012) *Clin Biochem* **45**, 737-739
121. Llamas-Covarrubias, M. A., Valle, Y., Navarro-Hernandez, R. E., Guzman-Guzman, I. P., Ramirez-Duenas, M. G., Rangel-Villalobos, H., Estrada-Chavez, C., and Munoz-Valle, J. F. (2012) *Rheumatol Int* **32**, 2307-2311

122. Sivaram, G., Tiwari, S. K., Bardia, A., Anjum, F., Vishnupriya, S., Habeeb, A., and Khan, A. A. (2012) *Hum Immunol* **73**, 201-205
123. Sohlberg, S. (1990) *Acta Psychiatr Scand Suppl* **361**, 29-33
124. Kleemann, R., and Bucala, R. (2010) *Mediators Inflamm* **2010**, 610479
125. Fain, J. N. (2006) *Vitam Horm* **74**, 443-477
126. Finucane, O. M., Reynolds, C. M., McGillicuddy, F. C., and Roche, H. M. (2012) *Proc Nutr Soc* **71**, 622-633
127. Brautigam, W. (1990) *Z Psychosom Med Psychoanal* **36**, 195-209
128. Grieb, G., Merk, M., Bernhagen, J., and Bucala, R. (2010) *Drug News Perspect* **23**, 257-264
129. Mitterski, B., Drynda, S., Boschow, G., Klein, W., Oppermann, J., Kekow, J., and Epplen, J. T. (2004) *BMC Genet* **5**, 2
130. Rueda, B., Orozco, G., Sanchez, E., Oliver, J., and Martin, J. (2008) *Reumatol Clin* **4 Suppl 1**, 1-4
131. Hanifi-Moghaddam, P., Schloot, N. C., Kappler, S., Seissler, J., and Kolb, H. (2003) *Diabetes* **52**, 1137-1142
132. Herder, C., Kolb, H., Koenig, W., Haastert, B., Muller-Scholze, S., Rathmann, W., Holle, R., Thorand, B., and Wichmann, H. E. (2006) *Diabetes Care* **29**, 368-371
133. Dogan, Y., Akarsu, S., Ustundag, B., Yilmaz, E., and Gurgoze, M. K. (2006) *Mediators Inflamm* **2006**, 59206
134. Bozza, M., Satoskar, A. R., Lin, G., Lu, B., Humbles, A. A., Gerard, C., and David, J. R. (1999) *J Exp Med* **189**, 341-346
135. Toso, C., Serre-Beinier, V., Emamaullee, J., Merani, S., Armanet, M., Wojtuszczyk, A., Bosco, D., Calandra, T., Roger, T., Morel, P., Shapiro, A. M., and Berney, T. (2008) *Transplantation* **86**, 1361-1369
136. Terrazas, C. A., Huitron, E., Vazquez, A., Juarez, I., Camacho, G. M., Calleja, E. A., and Rodriguez-Sosa, M. (2011) *Int J Biol Sci* **7**, 1298-1310
137. Stavitsky, A. B., and Xianli, J. (2002) *Cell Immunol* **217**, 95-104
138. Tong, C., Morrison, A., Yan, X., Zhao, P., Yeung, E. D., Wang, J., Xie, J., and Li, J. (2010) *J Diabetes* **2**, 267-274
139. Tchakonte, B., Ndip, A., Aubry, P., Malvy, D., and Mbanya, J. C. (2005) *Bull Soc Pathol Exot* **98**, 94-98
140. Saksida, T., Stosic-Grujicic, S., Timotijevic, G., Sandler, S., and Stojanovic, I. (2012) *Immunol Cell Biol* **90**, 688-698
141. Cvetkovic, I., Al-Abed, Y., Miljkovic, D., Maksimovic-Ivanic, D., Roth, J., Bacher, M., Lan, H. Y., Nicoletti, F., and Stosic-Grujicic, S. (2005) *Endocrinology* **146**, 2942-2951
142. Stojanovic, I., Saksida, T., Nikolic, I., Nicoletti, F., and Stosic-Grujicic, S. (2012) *Clin Exp Immunol* **169**, 156-163
143. Stojanovic, I., Saksida, T., Timotijevic, G., Sandler, S., and Stosic-Grujicic, S. (2012) *Growth Factors* **30**, 385-393
144. Hayashi, K., Kojima, R., and Ito, M. (2006) *Biol Pharm Bull* **29**, 1110-1119
145. Renshaw, M., Rockwell, J., Engleman, C., Gewirtz, A., Katz, J., and Sambhara, S. (2002) *J Immunol* **169**, 4697-4701
146. Ulett, G. C., Ketheesan, N., and Hirst, R. G. (2000) *Acta Trop* **74**, 229-234
147. Ulett, G. C., Ketheesan, N., and Hirst, R. G. (2000) *Infect Immun* **68**, 2034-2042
148. Okamura, M., Sumida, K., Muto, T., Kashida, Y., Machida, N., Watanabe, T., and Mitsumori, K. (2004) *Arch Toxicol* **78**, 688-696
149. Eusebio, M., Kuna, P., Kraszula, L., Kupczyk, M., and Pietruczuk, M. (2014) *J Biol Regul Homeost Agents* **28**, 461-470

150. Brissova, M., Fowler, M. J., Nicholson, W. E., Chu, A., Hirshberg, B., Harlan, D. M., and Powers, A. C. (2005) *J Histochem Cytochem* **53**, 1087-1097
151. Malaisse, W. J. (1994) *Diabetologia* **37 Suppl 2**, S36-42
152. Lenzen, S. (2008) *Diabetologia* **51**, 216-226
153. Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., and Kuchroo, V. K. (2009) *Annu Rev Immunol* **27**, 485-517
154. Yoon, J. W., Jun, H. S., and Santamaria, P. (1998) *Autoimmunity* **27**, 109-122
155. Pearl-Yafe, M., Kaminitz, A., Yolcu, E. S., Yaniv, I., Stein, J., and Askenasy, N. (2007) *Curr Pharm Des* **13**, 749-760
156. Grishman, E. K., White, P. C., and Savani, R. C. (2012) *Pediatr Res* **71**, 626-632
157. Nelson, R. J. (1997) *Horm Behav* **31**, 188-196
158. Picciotto, M. R. (1999) *Crit Rev Neurobiol* **13**, 103-149
159. Johansson, E. B., and Tjalve, H. (1978) *Acta Endocrinol (Copenh)* **89**, 339-351
160. Wu, J., and Yan, L. J. (2015) *Diabetes Metab Syndr Obes* **8**, 181-188
161. J. D. D. Rosado and M. Rodriguez-Sosa, "Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a key player in protozoan infections," *International Journal of Biological Sciences* ,vol.7,no.9, pp.1239–1256,2011
162. J. Bojunga, K. Kusterer, M. Bacher, R. Kurek, K.-H. Usadel, and H. Renneberg, "Macrophage migration inhibitory factor and development of type-1 diabetes in non-obese diabetic mice," *Cytokine* ,vol.21,no.4,pp.179–186,2003.
163. C.Pfleger,N.C.Schloot,M.D.Brendeletal., "Circulating cytokines are associated with human islet graft function in type 1diabetes," *Clinical Immunology* ,vol.138,no.2,pp.154–161,2011.
164. X.-L. Zou, Z.-Y. Zhao, Y.-Y. Wan, Z.-Q. Su, and M. Xiang, "Diabetogenic T cells induce autoimmune diabetes in BALB/c mice," *Chinese Medical Sciences Journal* ,vol.23,no.2,pp.88–94, 2008.
165. M. L. Lukic, S. Stosic-Grujicic, and A. Shahin, "Effector mechanisms in low-dose streptozotocin-induced diabetes," *Developmental Immunology* ,vol.6,no.1-2,pp.119–128,1998
166. H. Kolb, "Mouse models of insulin dependent diabetes: lowdose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice," *Diabetes/Metabolism Reviews* ,vol.3,no.3,pp. 751–778, 1987.
168. S. Stosic-Grujicic, I. Stojanovic, D. Maksimovic-Ivanic et al., "Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is necessary for progression of autoimmune diabetes mellitus," *Journal of Cellular Physiology* ,vol.215,no.3,pp.665–675,2008
169. G. Waeber, T. Calandra, C. Bonny, and R. Bucala, "A role for the endocrine and pro-inflammatory mediator MIF in the control of insulin secretion during stress," *Diabetes/Metabolism. Research and Reviews* ,vol.15,no.1,pp.47–54,1999.
170. D. L. Eizirik, M. L. Colli, and F. Ortis, "The role of inflammation in insulinitis and β -cell loss in type 1 diabetes," *Nature Reviews Endocrinology* ,vol.5,no.4,pp.219–226,2009

171. A. B. Stavitsky and J. Xianli, "In vitro and in vivo regulation by macrophage migration inhibitory factor (MIF) f expression of MHC-II, costimulatory, adhesion, receptor, and cytokine molecules," *Cellular Immunology* ,vol.217,no.1- 2,pp.95–104, 2002
172. J. de Dios Ruiz-Rosado, J. E. Olgún, I. Juárez-Avelar et al., "MIF promotes classical activation and conversion of inflammatory Ly6C monocytes into tipdcs during murine toxoplasmosis," *Mediators of Inflammation* ,vol.2016,ArticleID9101762,18 pages, 2016
173. L. Yu, D. T. Robles, N. Abiru et al., "Early expression of anti-insulin autoantibodies of humans and the NOD mouse: evidence for early determination of subsequent diabetes," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* , vol.97,no.4,pp.1701–1706,2000.
174. A. K. Steck, K. Johnson, K. J. Barriga et al., "Age of islet autoantibody appearance and mean levels of insulin, but not GAD or IA-2 autoantibodies, predict age of diagnosis of type 1 diabetes: diabetes autoimmunity study in the young," *Diabetes Care* , vol. 34, no. 6, pp. 1397–1399, 2011.
175. A. K. Steck, K. Vehik, E. Bonifacio et al., "Predictors of progression from the appearance of islet autoantibodies to early childhood diabetes: the Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY)," *Diabetes Care* ,vol.38,no.5, pp.808–813,2015.
176. S. Rex, S. Kraemer, G. Grieb et al., "The role of macrophage migration inhibitory factor in critical illness," *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry* , vol. 14, no. 14, pp. 1116–1124, 2014

APÉNDICE 1

Artículo de revisión

THE ROLE OF MIF IN TYPE 1 AND TYPE 2 DIABETES MELLITUS

Yuriko I. Sánchez-Zamora and Miriam Rodríguez-Sosa

Review Article

The Role of MIF in Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus

Yuriko I. Sánchez-Zamora and Miriam Rodríguez-Sosa

Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida de los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, 54090 Tlalnepantla, MEX, Mexico

Correspondence should be addressed to Miriam Rodríguez-Sosa; rodriguezsm@campus.iztacala.unam.mx

Received 9 October 2013; Accepted 11 December 2013; Published 2 January 2014

Academic Editor: Alfredo Vannacci

Academic Editor: Alfredo Vannacci

Copyright © 2014 Y. I. Sánchez-Zamora and M. Rodríguez-Sosa. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Autoimmunity and chronic low-grade inflammation are hallmarks of diabetes mellitus type one (T1DM) and type two (T2DM), respectively. Both processes are orchestrated by inflammatory cytokines, including the macrophage migration inhibitory factor (MIF). To date, MIF has been implicated in both types of diabetes; therefore, understanding the role of MIF could affect our understanding of the autoimmune or inflammatory responses that influence diabetic pathology. This review highlights our current knowledge about the involvement of MIF in both types of diabetes in the clinical environment and in experimental disease models.

1. Introduction

MIF was originally reported in 1966 by two different groups and was described as a T cell derived cytokine that inhibited the random migration of macrophages *in vitro* and promoted macrophage accumulation during delayed-type hypersensitivity reactions [1, 2]. Human and mouse MIF genes are 90% homologous; MIF protein has a molecular weight of 12.5 kDa [3]. MIF is an evolutionarily conserved molecule that is constitutively expressed in many tissues and cells (Figure 1).

Moreover, MIF is stored in intracellular pools and therefore does not require immediate synthesis before secretion. MIF lacks an aminoterminal leader sequence; this indicates that MIF is released from cells through a nonconventional protein-secretion pathway [3].

After the discovery of MIF, several studies were conducted to establish its role in the immune response [4–6]. However, not until 1990 was MIF recognized as the first molecule to arrive at the inflammation site and the factor that likely determines the degree of cellular inflammation [7]. Different experimental strategies, including anti-MIF antibodies and knockout (KO) and transgenic MIF mice (MIF-Tg), have been used to establish that MIF counterregulates the immunosuppressive effects of steroids and to implicate MIF in tumor necrosis factor (TNF α) and nitric oxide (NO) production [8]; additionally, MIF was found to possess growth factor activity [9], overregulate the expression of Toll-like receptor

(TLR)-4 on antigen-presenting cells [10], sustain macrophage proinflammatory abilities by inhibiting p53, and also possess tautomerase and oxidoreductase activities [11].

All the above-described inherent properties permitted the recognition of MIF as a critical molecule in proinflammatory innate immune responses and the restriction of certain parasite infections [12–14]. Additionally, MIF involvement has been demonstrated in immunological and inflammatory diseases [15, 16] such as septic shock [17], cancer [18], and chronic diseases including bowel disease [19], rheumatoid arthritis [20–22], colitis [23], obesity [24–26], and diabetes [25, 27, 28]. More recently, MIF was proposed as a diagnostic biomarker for autoimmune diseases such as arthritis, ulcerative colitis, and diabetes [23, 29, 30].

In this review, we will focus on some of the properties that have been conferred upon MIF with regard to the development and maintenance of T1DM and T2DM. We will discuss the data that have been collected in clinical studies and studies of MIF-KO mice and other protocols in which MIF has been proposed as a therapeutic diabetes mellitus pathological target.

2. MIF and Diabetes

2.1. Diabetes. This disease comprises a group of metabolic diseases that are characterized by hyperglycemia, which is

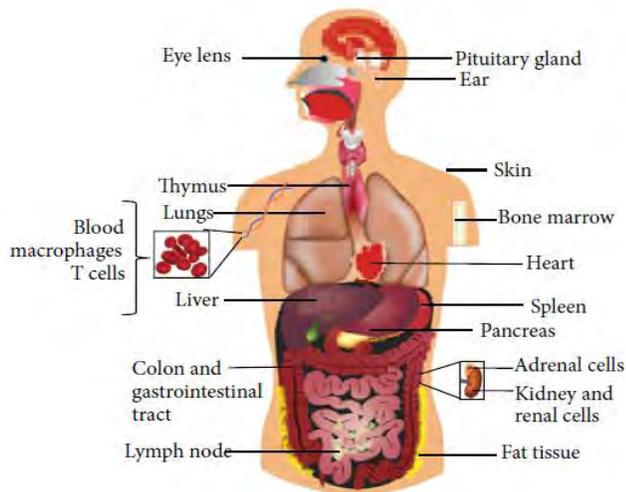


FIGURE 1: MIF expression pattern. MIF, a cytokine, is distributed

throughout almost the entire body. This is because MIF is part of the innate immune system or first line of immune defense.

associated with damage to and/or malfunction or failure of various organs, including the eyes, kidneys, nerves, heart, and blood vessels, among others. The causes of this disease range from autoimmune or metabolic abnormalities to deficiencies in insulin activity and secretion [31]. Currently, there is no cure for this chronic degenerative disease; however, the constant development of knowledge helps us to better understand the disease etiology and potential therapeutical targets that, when combined, could lead to good symptom and disease control [31].

2.2. MIF and T1DM or Insulin-Dependent Diabetes Mellitus (IDDM). According to the American Diabetes Association, T1DM patients comprise only 5–10% of those with diabetes [26]. This disease is a multifactorial, organ-specific autoimmune disease that occurs in genetically susceptible individuals [32]. T1DM is the result of the autoimmune destruction of pancreatic islet β cells by infiltrating immune cells (insulinitis); this occurs due to a failure in immune tolerance because the organism has had contact with specific viruses [33] such as cytomegalovirus [34] or with food molecules that caused molecular mimicry [35]. The common autoantigens recognized in this disease are insulin, glutamate decarboxylase 65 (GAD65), and the islet antigens IA-2 and IA-2 β [36, 37]. During insulinitis, high levels of proinflammatory cytokines, including IL-1 β , TNF α , IL-12, MIF, and IFN γ , are secreted by effector T cells to trigger the β cell destruction process [32]. MIF is considered one of the most common factors in autoimmunity [38]. In humans with T1DM, blood MIF concentrations were found to be high, compared to those in healthy controls [39]; normal plasma MIF concentrations in healthy humans range from 2.3 to 8.4 ng/mL [40]. In contrast, plasma MIF concentrations dramatically change from 5 ng/mL to 1 ng/mL after islet transplantation [41]. Also high MIF concentrations are associated with a subsequent loss of islet graft

function [41]. IL-1 β and TNF- α are expressed at high levels along with advanced type one diabetes complications such as ketoacidosis [42], and thus it is possible that high levels of MIF are also expressed at this point in the disease. MIF studies were facilitated by the development of MIF-KO mice in 1999 [43]. Using these mice as an efficient tool, MIF was shown to be an important molecule in early syngeneic islet transplantation function, and blocking of MIF resulted in transplant success [44]. Additionally, we know that MIF participates in T1DM by controlling the functional activities of monocytes/macrophages and T cells and modulating their abilities to secrete proinflammatory molecules [45]. Furthermore, MIF has been recognized as important molecule to the development of T1DM complications such as cardiac dysfunction, which is associated with AMPK signaling [46], and diabetic foot disease [47] and is known to promote inflammatory cytokine and palmitic acid-induced pancreatic islet apoptosis [48, 49]. After successful antibody and pharmacological inhibitor-mediated MIF neutralization, MIF was proposed as a new target strategy for the treatment of T1DM [45, 50].

The involvement of MIF in T1DM is summarized in Figure 2. With the above-outlined information, we can conclude that the participation of MIF in the pathology of T1DM is a well-documented fact; however, we do not know the exact point in disease development at which MIF exerts the most influence. Considering that the insulinitis process marks the beginning of the disease and is an autoimmune inflammatory process, we propose the hypothesis that MIF plays an important role in insulinitis onset or development. This hypothesis is supported by studies in which MIF was found to play important roles in the processes of antigen presentation and inflammatory cell activation [13, 51]. However, additional studies should be performed to establish the mechanism related to the role of MIF in T1DM.

2.3. MIF and T2DM or Noninsulin-Dependent Diabetes Mellitus (NIDDM). T2DM patients account for 90–95% of all diabetic patients, and this disease is characterized by the presence of insulin resistance and, usually, relative insulin deficiency. The most common risk factors for this type of diabetes are genetic conditions, obesity, lifestyle, and eating habits. Therefore involvement of the inflammatory response is equally important in disease development, hence the reason why the role of MIF has been studied most in T2DM [31].

Several clinical studies have shown that the serum MIF levels are elevated in patients with T2DM [52]. In 2006, high blood MIF levels were suggested to precede the onset of T2DM [40]. More recently, both patients with T2DM and those with impaired glucose tolerance were shown to have significantly elevated MIF serum levels [25, 27, 53]. Some data report normal plasma MIF concentrations in healthy humans to range from 2.3 to 8.4 ng/mL [35]. In contrast, plasma MIF concentrations from T2DM subjects range from 7.3 to 15.8 ng/mL. As in T1DM, MIF is highly expressed in T2DM complications such as myocardial damage [54], coronary artery disease [53], diabetic retinopathy [55], obesity [56],

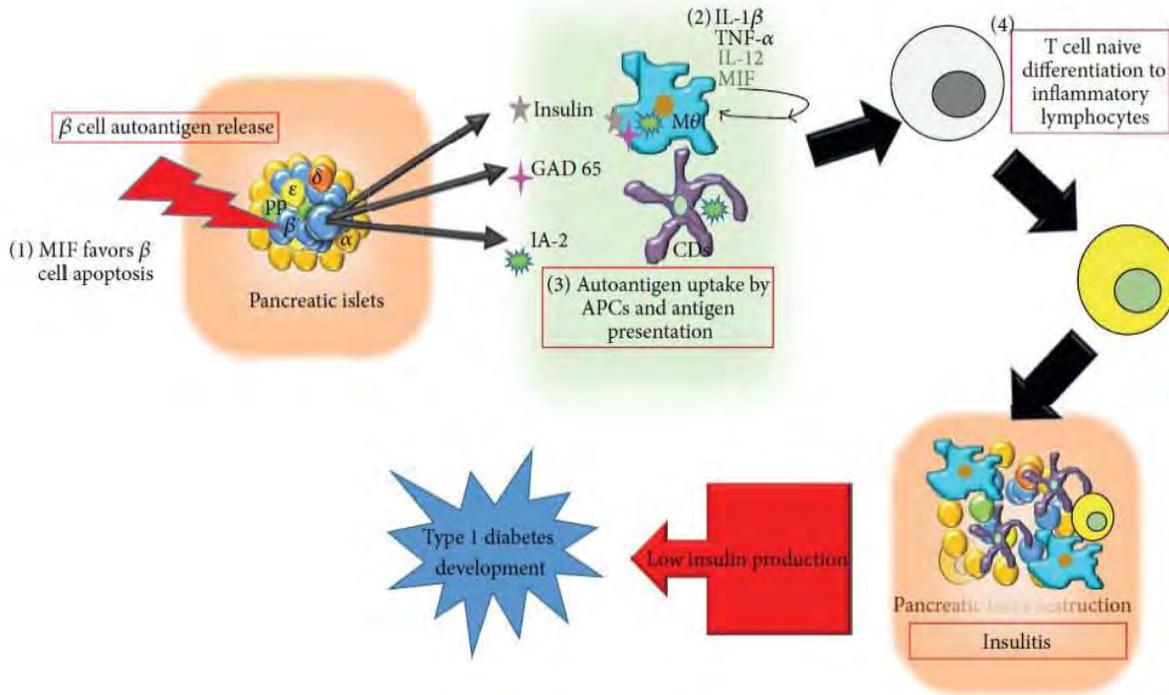


FIGURE 2: MIF involvement in T1DM development. (1) MIF promotes pancreatic β cell apoptosis. (2) MIF promotes the production of inflammatory cytokines such as IL-1 β , TNF- α , and IL-12. (3) MIF favors autoantigen presentation. (4) MIF promotes the activation of an inflammatory response, leading to insulinitis.

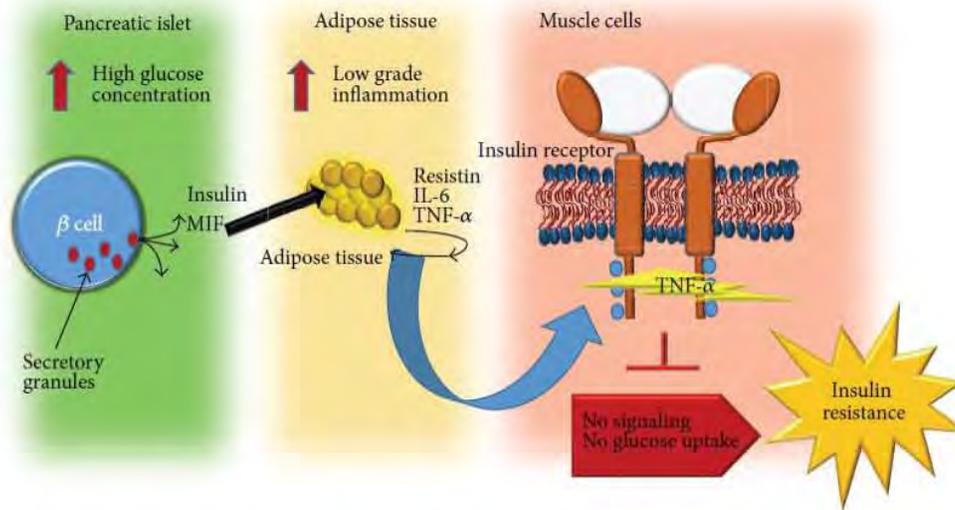


FIGURE 3: MIF plays an indirect role in T2DM development by promoting the production of proinflammatory cytokines and adipocytokines that are involved in insulin receptor signaling, leading to insulin resistance.

and metabolic syndrome [57]. The role of MIF in T2DM has been studied in murine models. Using db/db mice, MIF was suggested as a factor that could initiate the onset of microalbuminuria in diabetic nephropathy [58]. MIF plays an important role in the chronic, obesity-associated adipose tissue inflammation that leads to the development of insulin resistance in MIF-KO mice [59]. Additionally, we previously

demonstrated in a NIDDM mice model that MIF could be a therapeutic target for disease treatment. Indeed, two candidate drugs (synthetic inhibitors for MIF) for diabetes treatment were described as very effective in the control of the systemic inflammation and the control of some diabetes symptoms [60]. Additionally, we showed that MIF is important to the production of some adipocytokines such as

resistin, which is the most important adipocytokine in the development of insulin resistance [60]. In this type of diabetes, MIF has been suggested to contribute to the disease in an indirect form due to its ability to stimulate the production of other inflammatory cytokines that directly cause damage to muscle cells. This is true for TNF- α , which acts on the insulin receptor and prevents the dephosphorylation of insulin receptor substrates, thus blocking receptor signaling and preventing glucose entry into the cell (insulin resistance). Furthermore, MIF also stimulates the production of certain inflammatory adipocytokines, such as resistin and IL-6, which are key molecules in the development of insulin resistance. As demonstrated, MIF influences T2DM development at different levels. In the pancreas, adipose tissue, and muscle cells, the pleiotropic characteristics of MIF are reflected in the different routes that lead to insulin resistance (Figure 3).

3. MIF and Pancreatic Beta Cells (β Cells)

MIF was shown to colocalize in secretory insulin granules within β cells and to be released during both phases of insulin secretion. Most importantly, in this regard, MIF appears to have an autocrine, glucose-dependent regulatory effect on insulin secretion [45].

While MIF is related to insulin secretion under homeostatic conditions, altered homeostasis in an organism (such as the presence of inflammation) apparently induces MIF to act differently and become a destructive molecule that can lead to β cell apoptosis [48, 61]. Apparently, MIF is not a foreign molecule in the pancreatic β cell microenvironment and can act in response to the concentration of glucose and the presence of inflammation.

4. Conclusions

Previously, different models were used to show that MIF is a pleiotropic molecule [62–64], and this property is very evident in pancreatic islets. Due to the large number of studies that support this idea, we can conclude that MIF is a proinflammatory cytokine with great importance not only during the course of diabetes but also before the establishment of diabetes and in the risk factors of disease such as obesity. We support the statement that MIF is a therapeutic target and propose that it is necessary to design synthetic MIF inhibitors that could interact with the existing therapies used to treat diabetes.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests.

Acknowledgments

The authors thank M. S. Imelda Juarez for collecting the items required for this paper. National Council of Science and Technology (CONACYT), Mexico, supported Ph.D. fellowship for Yuriko I. Sánchez-Zamora (no. 349680) and this review is a requirement to obtain her degree in Biomedical

Sciences, UNAM. The author's research was supported by the Grants UNAM-DGAPA-PAPIIT (IN212412), Miguel Aleman Foundation, and CONACyT-152224.

References

- [1] B. R. Bloom and B. Bennett, "Mechanism of a reaction in vitro associated with delayed-type hypersensitivity," *Science*, vol. 153, no. 3731, pp. 80–82, 1966.
- [2] J. R. David, "Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 56, no. 1, pp. 72–77, 1966.
- [3] T. Calandra and T. Roger, "Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity," *Nature Reviews Immunology*, vol. 3, no. 10, pp. 791–800, 2003.
- [4] P. Kotkes and E. Pick, "Studies on guinea-pig macrophage migration inhibitory factor (MIF). I. Glycoprotein nature and net charge," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 37, no. 3, pp. 532–539, 1979.
- [5] N. I. Sotnikova and L. V. Kovalchuk, "Role of the thymus in regulation of the macrophage migration inhibitory factor production in mice of different genotypes," *Byulleten Eksperimentalnoi Biologii i Meditsiny*, vol. 88, no. 9, pp. 311–314, 1979.
- [6] G. P. Cavallo and S. Landolfo, "Biologic aspects of macrophage migration inhibitory factor," *Giornale di Batteriologia Virologia ed Immunologia*, vol. 73, no. 7–12, pp. 196–201, 1980.
- [7] U. Malorny, M. Goebeler, J. Gutwald, J. Roth, and C. Sorg, "Differences in migration inhibitory factor production by C57Bl/6 and BALB/c mice in allergic and irritant contact dermatitis," *International Archives of Allergy and Applied Immunology*, vol. 92, no. 4, pp. 356–360, 1990.
- [8] Y. P. de Jong, A. C. Abadia-Molina, A. R. Satoskar et al., "Development of chronic colitis is dependent on the cytokine MIF," *Nature Immunology*, vol. 2, no. 11, pp. 1061–1066, 2001.
- [9] R. Abe, T. Shimizu, A. Ohkawara, and J. Nishihira, "Enhancement of macrophage migration inhibitory factor (MIF) expression in injured epidermis and cultured fibroblasts," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1500, no. 1, pp. 1–9, 2000.
- [10] T. Roger, C. Froidevaux, C. Martin, and T. Calandra, "Macrophage migration inhibitory factor (MIF) regulates host responses to endotoxin through modulation of toll-like receptor 4 (TLR4)," *Journal of Endotoxin Research*, vol. 9, no. 2, pp. 119–123, 2003.
- [11] H. Sugimoto, M. Taniguchi, A. Nakagawa, I. Tanaka, M. Suzuki, and J. Nishihira, "Crystal structure of human D-Dopachrome tautomerase, a homologue of macrophage migration inhibitory factor, at 1.54 Å resolution," *Biochemistry*, vol. 38, no. 11, pp. 3268–3279, 1999.
- [12] C. A. Terrazas, I. Juarez, L. I. Terrazas, R. Saavedra, E. A. Calleja, and M. Rodriguez-Sosa, "Toxoplasma gondii: impaired maturation and pro-inflammatory response of dendritic cells in MIF-deficient mice favors susceptibility to infection," *Experimental Parasitology*, vol. 126, no. 3, pp. 348–358, 2010.
- [13] M. Flores, R. Saavedra, R. Bautista et al., "Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is critical for the host resistance against Toxoplasma gondii," *FASEB Journal*, vol. 22, no. 10, pp. 3661–3671, 2008.
- [14] J. L. Reyes, L. I. Terrazas, B. Espinoza et al., "Macrophage migration inhibitory factor contributes to host defense against acute Trypanosoma cruzi Infection," *Infection and Immunity*, vol. 74, no. 6, pp. 3170–3179, 2006.

- [15] P. Renner, T. Roger, and T. Calandra, "Macrophage migration inhibitory factor: gene polymorphisms and susceptibility to inflammatory diseases," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 41, supplement 7, pp. S513–S519, 2005.
- [16] A. Y. Hoi, M. N. Iskander, and E. F. Morand, "Macrophage migration inhibitory factor: a therapeutic target across inflammatory diseases," *Inflammation and Allergy—Drug Targets*, vol. 6, no. 3, pp. 183–190, 2007.
- [17] R. A. Mitchell, H. Liao, J. Chesney et al., "Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 1, pp. 345–350, 2002.
- [18] S. N. Babu, G. Chetal, and S. Kumar, "Macrophage migration inhibitory factor: a potential marker for cancer diagnosis and therapy," *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, vol. 13, no. 5, pp. 1737–1744, 2012.
- [19] J. Nishihira, "Molecular function of macrophage migration inhibitory factor and a novel therapy for inflammatory bowel disease," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1271, pp. 53–57, 2012.
- [20] R. Liu, N. Xu, X. Wang et al., "Influence of MIF, CD40, and CD226 polymorphisms on risk of rheumatoid arthritis," *Molecular Biology Reports*, vol. 39, no. 6, pp. 6915–6922, 2012.
- [21] M. Liu and C. Hu, "Association of MIF in serum and synovial fluid with severity of knee osteoarthritis," *Clinical Biochemistry*, vol. 45, no. 10–11, pp. 737–739, 2012.
- [22] M. A. Llamas-Covarrubias, Y. Valle, R. E. Navarro-Hernández et al., "Serum levels of macrophage migration inhibitory factor are associated with rheumatoid arthritis course," *Rheumatology International*, vol. 32, no. 8, pp. 2307–2311, 2012.
- [23] G. Sivaram, S. K. Tiwari, A. Bardia et al., "Macrophage migration inhibitory factor, toll-like receptor 4, and CD14 polymorphisms with altered expression levels in patients with ulcerative colitis," *Human Immunology*, vol. 73, no. 2, pp. 201–205, 2012.
- [24] S. Sohlberg, "Personality, life stress and the course of eating disorders," *Acta Psychiatrica Scandinavica, Supplementum*, vol. 82, no. 361, pp. 29–33, 1990.
- [25] R. Kleemann and R. Bucala, "Macrophage migration inhibitory factor: critical role in obesity, insulin resistance, and associated comorbidities," *Mediators of Inflammation*, vol. 2010, Article ID 610479, 7 pages, 2010.
- [26] J. N. Fain, "Release of interleukins and other inflammatory cytokines by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily due to the nonfat cells," *Vitamins and Hormones*, vol. 74, pp. 443–477, 2006.
- [27] O. M. Finucane, C. M. Reynolds, F. C. McGillicuddy, and H. M. Roche, "Insights into the role of macrophage migration inhibitory factor in obesity and insulin resistance," *The Proceedings of the Nutrition Society*, vol. 71, no. 4, pp. 622–633, 2012.
- [28] I. Stojanovic, T. Saksida, and S. Stosic-Grujicic, "Beta cell function: the role of macrophage migration inhibitory factor," *Immunologic Research*, vol. 52, no. 1–2, pp. 81–88, 2012.
- [29] G. Grieb, M. Merk, J. Bernhagen, and R. Bucala, "Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a promising biomarker," *Drug News and Perspectives*, vol. 23, no. 4, pp. 257–264, 2010.
- [30] B. Miterski, S. Drynda, G. Böschow et al., "Complex genetic predisposition in adult and juvenile rheumatoid arthritis," *BMC Genetics*, vol. 5, article 2, 2004.
- [31] American Diabetes Association, "Diagnosis and classification of diabetes mellitus," *Diabetes Care*, vol. 33, supplement 1, pp. S62–S69, 2010.
- [32] B. Baumann, H. H. Salem, and B. O. Boehm, "Anti-inflammatory therapy in type 1 diabetes," *Current Diabetes Reports*, vol. 12, no. 5, pp. 499–509, 2012.
- [33] L. Galleri, G. Sebastiani, F. Vendrame, F. A. Grieco, I. Spagnuolo, and F. Dotta, "Viral infections and diabetes," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 771, pp. 252–271, 2012.
- [34] K. Osame, Y. Takahashi, H. Takasawa et al., "Rapid-onset type 1 diabetes associated with cytomegalovirus infection and islet autoantibody synthesis," *Internal Medicine*, vol. 46, no. 12, pp. 873–877, 2007.
- [35] J. F. Bach, "Insulin-dependent diabetes mellitus as an autoimmune disease," *Endocrine Reviews*, vol. 15, no. 4, pp. 516–542, 1994.
- [36] T. Orban and J. T. Kis, "Prevention of type 1 diabetes mellitus using a novel vaccine," *Therapeutic Advances in Endocrinology and Metabolism*, vol. 2, no. 1, pp. 9–16, 2011.
- [37] R. Mallone, V. Brezar, and C. Boitard, "T cell recognition of autoantigens in human type 1 diabetes: clinical perspectives," *Clinical and Developmental Immunology*, vol. 2011, Article ID 513210, 16 pages, 2011.
- [38] B. Rueda, G. Orozco, E. Sánchez, J. Oliver, and J. Martín, "Common genetic factors in autoimmunity," *Reumatología Clínica*, vol. 4, supplement 1, pp. 1–4, 2008.
- [39] P. Hanifi-Moghaddam, N. C. Schloot, S. Kappler, J. Seifler, and H. Kolb, "An association of autoantibody status and serum cytokine levels in type 1 diabetes," *Diabetes*, vol. 52, no. 5, pp. 1137–1142, 2003.
- [40] C. Herder, H. Kolb, W. Koenig et al., "Association of systemic concentrations of macrophage migration inhibitory factor with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes: results from the cooperative health research in the region of Augsburg, survey 4 (KORA S4)," *Diabetes Care*, vol. 29, no. 2, pp. 368–371, 2006.
- [41] C. Pflieger, N. C. Schloot, M. D. Brendel et al., "Circulating cytokines are associated with human islet graft function in type 1 diabetes," *Clinical Immunology*, vol. 138, no. 2, pp. 154–161, 2011.
- [42] Y. Dogan, S. Akarsu, B. Ustundag, E. Yilmaz, and M. K. Gurgoze, "Serum IL-1 β , IL-2, and IL-6 in insulin-dependent diabetic children," *Mediators of Inflammation*, vol. 2006, Article ID 59206, 6 pages, 2006.
- [43] M. Bozza, A. R. Satoskar, G. Lin et al., "Targeted disruption of migration inhibitory factor gene reveals its critical role in sepsis," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 189, no. 2, pp. 341–346, 1999.
- [44] C. Toso, V. Serre-Beinier, J. Emamaullee et al., "The role of macrophage migration inhibitory factor in mouse islet transplantation," *Transplantation*, vol. 86, no. 10, pp. 1361–1369, 2008.
- [45] S. Stosic-Grujicic, I. Stojanovic, D. Maksimovic-Ivanic et al., "Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is necessary for progression of autoimmune diabetes mellitus," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 215, no. 3, pp. 665–675, 2008.
- [46] C. Tong, A. Morrison, X. Yan et al., "Macrophage migration inhibitory factor deficiency augments cardiac dysfunction in type 1 diabetic murine cardiomyocytes," *Journal of Diabetes*, vol. 2, no. 4, pp. 267–274, 2010.
- [47] B. Tchakonté, A. Ndip, P. Aubry, D. Malvy, and J. C. Mbanya, "The diabetic foot in Cameroon," *Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique*, vol. 98, no. 2, pp. 94–98, 2005.

- [48] I. Stojanovic, T. Saksida, I. Nikolic, F. Nicoletti, and S. Stosic-Grujicic, "Macrophage migration inhibitory factor deficiency protects pancreatic islets from cytokine-induced 20 apoptosis in vitro," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 169, no. 2, pp. 156–163, 2012.
- [49] T. Saksida, S. Stosic-Grujicic, G. Timotijevic, S. Sandler, and I. Stojanovic, "Macrophage migration inhibitory factor deficiency protects pancreatic islets from palmitic acid-induced apoptosis," *Immunology and Cell Biology*, vol. 90, no. 7, pp. 688–698, 2012.
- [50] I. Cvetkovic, Y. Al-Abed, D. Miljkovic et al., "Critical role of macrophage migration inhibitory factor activity in experimental autoimmune diabetes," *Endocrinology*, vol. 146, no. 7, pp. 2942–2951, 2005.
- [51] C. A. Terrazas, E. Huitron, A. Vazquez et al., "MIF synergizes with *Trypanosoma cruzi* antigens to promote efficient dendritic cell maturation and IL-12 production via p38 MAPK," *International Journal of Biological Sciences*, vol. 7, no. 9, pp. 1298–1310, 2011.
- [52] C. Toso, J. A. Emamaullee, S. Merani, and A. M. J. Shapiro, "The role of macrophage migration inhibitory factor on glucose metabolism and diabetes," *Diabetologia*, vol. 51, no. 11, pp. 1937–1946, 2008.
- [53] A. Makino, T. Nakamura, M. Hirano et al., "High plasma levels of macrophage migration inhibitory factor are associated with adverse long-term outcome in patients with stable coronary artery disease and impaired glucose tolerance or type 2 diabetes mellitus," *Atherosclerosis*, vol. 213, no. 2, pp. 573–578, 2010.
- [54] X. Y. Yu, H. M. Chen, J. L. Liang et al., "Hyperglycemic myocardial damage is mediated by proinflammatory cytokine: macrophage migration inhibitory factor," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 1, Article ID e16239, 2011.
- [55] Y. Mitamura, S. Takeuchi, A. Matsuda, Y. Tagawa, Y. Mizue, and J. Nishihira, "Macrophage migration inhibitory factor levels in the vitreous of patients with proliferative diabetic retinopathy," *The British Journal of Ophthalmology*, vol. 84, no. 6, pp. 636–639, 2000.
- [56] U. Kamchybekov, H. R. Figulla, N. Gerdes, and C. Jung, "Macrophage migration inhibitory factor is elevated in obese adolescents," *Archives of Physiology and Biochemistry*, vol. 118, no. 4, pp. 204–209, 2012.
- [57] H. Kim, S. Lee, H. J. Kim et al., "Elevated levels of macrophage migration inhibitory factor in women with metabolic syndrome," *Hormone and Metabolic Research*, vol. 43, no. 9, pp. 642–645, 2011.
- [58] T. Watanabe, N. H. Tomioka, M. Doshi, S. Watanabe, M. Tsuchiya, and M. Hosoyamada, "Macrophage migration inhibitory factor is a possible candidate for the induction of microalbuminuria in diabetic db/db mice," *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, vol. 36, no. 5, pp. 741–747, 2013.
- [59] L. Verschuren, T. Kooistra, J. Bernhagen et al., "MIF deficiency reduces chronic inflammation in white adipose tissue and impairs the development of insulin resistance, glucose intolerance, and associated atherosclerotic disease," *Circulation Research*, vol. 105, no. 1, pp. 99–107, 2009.
- [60] Y. Sanchez-Zamora, L. I. Terrazas, A. Vilches-Flores et al., "Macrophage migration inhibitory factor is a therapeutic target in treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus," *FASEB Journal*, vol. 24, no. 7, pp. 2583–2590, 2010.
- [61] I. Stojanovic, T. Saksida, G. Timotijevic, S. Sandler, and S. Stosic-Grujicic, "Macrophage migration inhibitory factor (MIF) enhances palmitic acid-and glucose-induced murine beta cell dysfunction and destruction in vitro," *Growth Factors*, vol. 30, no. 6, pp. 385–393, 2012.
- [62] Y. Al-Abed and S. van Patten, "MIF as a disease target: ISO-1 as a proof-of-concept therapeutic," *Future Medicinal Chemistry*, vol. 3, no. 1, pp. 45–63, 2011.
- [63] C. Maaser, L. Eckmann, G. Paesold, H. S. Kim, and M. F. Kagnoff, "Ubiquitous production of macrophage migration inhibitory factor by human gastric and intestinal epithelium," *Gastroenterology*, vol. 122, no. 3, pp. 667–680, 2002.
- [64] F. Wang, F. Gao, and L. Jing, "Is macrophage migration inhibitory factor (MIF) the "control point" of vascular hyporesponsiveness in septic shock?" *Medical Hypotheses*, vol. 65, no. 6, pp. 1082–1087, 2005.

APÉNDICE 2

Artículo experimental

**ALTERED MACROPHAGE AND DENDRITIC CELL RESPONSE IN *MIF*^{-/-}
MICE REVEALS A ROLE OF MIF FOR INFLAMMATORY-TH1 RESPONSE
IN TYPE 1 DIABETES**

Yuriko Itzel Sánchez-Zamora, Imelda Juárez-Avelar, Alicia Vazquez-Mendoza, Marcia Hiriart, and

Miriam Rodríguez-Sosa

Research Article

Altered Macrophage and Dendritic Cell Response in *Mif*^{-/-} Mice Reveals a Role of Mif for Inflammatory-Th1 Response in Type 1 Diabetes

Yuriko Itzel Sánchez-Zamora,¹ Imelda Juarez-Avelar,¹ Alicia Vazquez-Mendoza,² Marcia Hiriart,³ and Miriam Rodriguez-Sosa¹

¹Unidad de Biomedicina, Facultad de Estudios Superiores (FES) Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), 54090 Tlalnepantla, MEX, Mexico

²Carrera de Optometría, FES-Iztacala, UNAM, 54090 Tlalnepantla, MEX, Mexico

³Departamento de Neurodesarrollo y Fisiología, Instituto de Fisiología Celular, UNAM, 04510 Coyoacán, MEX, Mexico

Correspondence should be addressed to Miriam Rodriguez-Sosa; rodriguezsm@campus.iztacala.unam.mx

Received 31 May 2016; Accepted 10 July 2016

Academic Editor: Jixin Zhong

Copyright © 2016 Yuriko Itzel Sánchez-Zamora et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Macrophage migration inhibitory factor (Mif) is highly expressed in type 1 diabetes mellitus (T1DM). However, there is limited information about how Mif influences the activation of macrophages (M ϕ) and dendritic cells (DC) in T1DM. To address this issue, we induced T1DM by administering multiple low doses of streptozotocin (STZ) to *Mif*^{-/-} or wild-type (Wt) BALB/c mice. We found that *Mif*^{-/-} mice treated with STZ (*Mif*^{-/-}-STZ) developed lower levels of hyperglycemia, inflammatory cytokines, and specific pancreatic islet antigen- (PIAg-) IgG and displayed reduced cellular infiltration into the pancreatic islets compared to Wt mice treated with STZ (WtSTZ). Moreover, M ϕ and DC from *Mif*^{-/-}-STZ displayed lower expression of MHC-II, costimulatory molecules CD80, CD86, and CD40, Toll-like receptor- (TLR-) 2, and TLR-4 than WtSTZ. These changes were associated with a reduced capacity of M ϕ and DC from *Mif*^{-/-}-STZ to induce proliferation in ovalbumin-specific T cells. All the deficiencies observed in *Mif*^{-/-}-STZ were recovered by exogenous administration of recombinant Mif. These findings suggest that Mif plays a role in the molecular mechanisms of M ϕ and DC activation and drives T cell responses involved in the pathology of T1DM. Therefore, Mif is

1. Introduction

T1DM is an autoimmune-mediated disease characterized by selective destruction of insulin-producing pancreatic β -cells, resulting in the need for lifelong administration of exogenous insulin for patient survival [1], and represents 5–10% of all cases of diabetes [2, 3]. The pathological condition begins with an autoimmune inflammatory process known as insulinitis, which leads to leucocyte infiltration into the pancreatic islets of Langerhans, resulting in the autoimmune destruction of pancreatic β -cells [4]. Thus, the onset of T1DM is the result of the recognition of self-antigens due to molecular mimicry against infection with various viruses such as Coxsackie virus, β -cell cytotoxicity, or β -cell cytolysis

[5–7]. Consequently, molecules such as preinsulin, insulin, glutamate decarboxylase-65 (GAD-65), and islet antigen 2 β become recognized as self-antigens [8].

Different types of innate immune cells such as T cells, eosinophils, macrophages (M ϕ), and dendritic cells (DC) as well as proinflammatory cytokines and chemokines are present during insulinitis [4, 9]. The relationship between T1DM and high levels of inflammatory cytokines such as interleukin- (IL-) 1 β [10–14], interferon- (IFN-) γ [15], tumor necrosis factor- (TNF-) α [16], IL-12 [17, 18], and macrophage migration inhibitory factor (Mif) [19–24] has been widely recognized.

Mif is a pleiotropic cytokine produced during the immune response by activated T cells, M ϕ , DC, and a variety

of nonimmune cells and plays a pivotal role in the systemic inflammatory immune response by promoting the production of proinflammatory cytokines including TNF- α and IL-6, which are involved in inflammatory and autoimmune diseases such as septic shock [25], cancer [26], inflammatory bowel disease [27, 28], rheumatoid arthritis [29, 30], obesity [31, 32], and diabetes [33–35]. Moreover, Mif has recently been proposed as a diagnostic biomarker for autoimmune diseases [36] such as arthritis [37, 38], type 2 diabetes [35], and ulcerative colitis [39] in both animals and humans.

The pathogenic contribution of Mif to T1DM was demonstrated by showing that Mif mRNA expression was upregulated in splenic lymphocytes during the development of spontaneously diabetic nonobese diabetic (NOD) mice, as well as cyclophosphamide-treated NOD mice. Diabetes incidence was increased to 86% in NOD mice treated with recombinant Mif (rMif) protein, compared with the 55% incidence observed in untreated control NOD mice [20]. Furthermore, studies performed using *Mif*^{-/-} mice rendered diabetic by administering multiple low doses of streptozotocin (STZ) have shown that the absence of Mif affected several aspects of experimental T1DM, including initial immunopathological events and the production of proinflammatory and cytotoxic mediators, thereby interfering with both inflammation and tissue destruction [22].

All the results described above provide evidence that Mif plays a critical role in the pathogenesis of T1DM. However, the precise mechanism by which Mif promotes insulinitis and the mechanism underlying its proinflammatory role remain unclear. The activities of Mif may reside at the levels of both the inductive and effector phases of the inflammatory response attributed to antigen-presenting cells.

Here, we analyzed the influence of Mif on M ϕ and DC activation using an autoimmune diabetes model in which multiple low doses of STZ were administered to *Mif*^{-/-} and wild-type (Wt) mice (*Mif*^{-/-}-STZ and WtSTZ, resp.) in the BALB/c genetic background. As previously demonstrated *Mif*^{-/-}-STZ developed less severe hyperglycemia, reduced levels of IFN- γ and TNF- α , a smaller amount of pancreatic islet antigen- (PIAg-) specific IgG, and decreased cell infiltration into the pancreatic islets compared to WtSTZ. Interestingly, we found for the first time that M ϕ and DC from *Mif*^{-/-}-STZ displayed decreased expression of costimulatory molecules CD80, CD86, and CD40, as well as Toll-like receptor- (TLR-) 2, TLR-4, and major histocompatibility complex- (MHC-) II. Importantly, we demonstrated that due to diminished upregulation of costimulatory molecules, these cells exhibited a reduced capacity to induce proliferation and cytokine expression in cocultures with allogeneic ovalbumin- (OVA-) specific T cells. All deficiencies observed in *Mif*^{-/-}-STZ were reversed by exogenous rMif protein administration.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Statement. All experiments in this study were performed according to the guidelines in the Mexican Regulations on Animal Care (NOM-062-ZOO-1999, 2001) and

were approved by the local Institutional Animal Care and Use Committee. All efforts were made to minimize animal suffering over the course of these studies.

2.2. Animals. Six- to 8-week-old male BALB/c mice were purchased from Harlan Laboratories (Mexico City, Mex.) and were maintained as a breeding colony in a pathogen-free environment at our animal facilities in accordance with institutional guidelines. *Mif*^{-/-} mice were kindly provided by Dr. Abhay R. Satoskar (The Ohio State University, USA) and were maintained as breeding colonies for more than 10 generations in the BALB/c genetic background on the Transgenic Mouse Core Facility at our institution. Genotyping of *Mif*^{-/-} mice was routinely performed on DNA isolated from tail snips using a PCR procedure [40]. The PCR were performed using the following primers: Mif: forward 5'-AGACCACGTGCTTAGCTGAG-3' and reverse 5'-GCATCGCTACCGGTGGATAA-3'; Neomycin (Neo): forward 5'-ATTGAACAAGATGGATTGCAC-3' and reverse 5'-CGTCCAGATCATCCTGATC-3'. PCR for the amplification of Mif and NEO was performed by adding 100 ng of the extracted DNA to 25 μ L of a reaction mixture that contained 18.4 μ L of distilled water, 2.5 μ L of 10x PCR buffer, 0.4 μ L of dNTPs (10 mM), 1.5 μ L of MgCl₂ (25 mM), 1 μ L of the forward and reverse primers, and 0.2 μ L (2.5 units) of Taq DNA polymerase (Ampliqon, Bioreagents and Molecular Diagnostics). The amplification protocol consisted of 5 min at 95°C, 35 cycles of 95°C for 30 sec, 58°C for 40 sec, and 72°C for 30 sec and a final extension at 72°C for 5 min. All PCR experiments were conducted with positive and negative controls. A PCR fragment of 200 bp, corresponding to Mif, or 500 bp, corresponding to NEO, was visualized to identify Wt or *Mif*^{-/-} mice, respectively. The PCR products were analyzed by electrophoresis on a 1.5% agarose gel and were viewed under UV light (Bio-Rad, USA).

2.3. Induction of T1DM. *Mif*^{-/-} and Wt mice were deprived of food for 8 h before induction of diabetes via intraperitoneal (i.p.) injection of STZ at doses of 40 mg/kg of body weight, daily for five consecutive days (days 0–4) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). STZ was diluted in cold 0.01 M citrate buffer (pH 4.5) and was used within 5 min of preparation, in accordance with a previously reported protocol [41]. Healthy mice from each group received i.p. injections of an equivalent volume of vehicle (citrate buffer) as negative controls.

2.4. Analysis of Blood Glucose, Serum Insulin, and Cytokine Levels. Blood samples were collected by tail snipping from Wt and *Mif*^{-/-} mice that had been fasting for 6 h. Samples were obtained once before STZ injection and 2, 4, and 8 weeks after STZ injection. Blood glucose levels were measured with a portable glucometer (Accu-Chek Sensor glucometer; Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). Mice with a glucose concentration exceeding 300 mg/dL were considered to have T1DM. Blood was collected and centrifuged at 1300 \times g, and the serum levels of Mif (Neobiolab, USA), IL-12, IFN- γ , IL-17, IL-4, IL-13 (PeproTech, Mex), and insulin (Lincoln, St. Charles, MO, USA) were determined via ELISA according to the manufacturer's instructions.

2.5. Pancreatic Islets Antigen (PIAg) Isolation. PIAg islets were obtained from healthy Wt mice as described below. After isolation, the islets were lysed by five freeze-thaw cycles followed by sonication (six 60-Hz cycles for 1 min each) on ice. After centrifugation (10 000 g, 15 min, 4°C), supernatants were collected and filtered through a 0.2 µm membrane (Corning, Cambridge, MA, USA). The protein concentration was determined using the Lowry method [42], and PIAg aliquots were stored at -70°C until use.

2.6. Analysis of IgG Antibody Production. Serum samples were analyzed for the levels of pancreatic islet-specific Th1-associated IgG2a and Th2-associated IgG1 antibodies by ELISA. Briefly, 96-well ELISA plates (Costar) were coated with 100 µL/well soluble PIAg in Tris buffer, pH 7.8. The plates were incubated overnight at 4°C. Then, the wells were washed thoroughly with phosphate-buffered saline (PBS) containing 0.05% Tween-20 (PBS-Tween; Merck, France) and were blocked with PBS supplemented with 1% bovine serum albumin (PBS-BSA; Sigma-Aldrich) for one hour at room temperature (RT). The serum samples were diluted 1:100, followed by serial dilution of each sample (in PBS-BSA) from healthy or STZ-treated Wt or *Mif*^{-/-} mice. The plates were then incubated at 4°C overnight. After extensive washing with PBS-Tween, the samples were incubated for 45 min at RT with isotype-specific peroxidase-labeled goat anti-mouse antibodies (anti-IgG1 and anti-IgG2a at 1/1000 dilutions; Zymed, San Francisco, CA, USA). Then, the plates were washed, and immunoreactivity was detected with ABTS solution (Zymed). The results were expressed as endpoint titers based on optical density.

2.7. Histopathology. Pancreatic tissues from Wt and *Mif*^{-/-} mice healthy or injected with STZ were removed, fixed overnight in 4% formaldehyde, and embedded in paraffin blocks. Afterwards, 5 to 7 µm transverse sections of pancreatic tissue were sliced from the paraffinized tissue blocks, mounted on slides, and subsequently stained with eosin-hematoxylin (E&H; Sigma-Aldrich). For each mouse, one histological containing 1–3 nonsuccessive slices was scored for infiltration as previously described [43] according to the following scale: grade 0 (no insulinitis) = 0% infiltration within the islets; grade 1 (peri-insulinitis) = 1–10% infiltration; grade 2 (moderate insulinitis) = 11–<50% infiltration; grade 3 (severe insulinitis) = >50% infiltration; or grade 4 (complete insulinitis) = extensive infiltration with few or no detectable pancreatic islet cells. Using an Olympus BX51 microscope (Olympus America, Melville, NY, USA) equipped with a digital video camera, 30 islets of Langerhans were evaluated per mouse.

2.8. Cell and Pancreatic Islet Isolation. Spleen and pancreatic islet cells from WtSTZ and *Mif*^{-/-}STZ were collected after 0, 2, 4, and 8 weeks of injection with STZ and stained for flow cytometry analysis. Briefly, the spleen was removed under sterile conditions, and spleen cells were obtained by mincing and filtering the tissue, followed by washing and suspension in DMEM culture medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 units of penicillin/streptomycin, 2 mM glutamine, and 1% nonessential amino acids (all from

GIBCO, BRL, Grand Island, NY, USA). Spleen cells were suspended at 5×10^6 cells/mL in the same medium. The pancreas was also removed under sterile conditions, and pancreatic islets were isolated using the collagenase method as previously described [44]. Briefly, the pancreas was removed and cut into small pieces (approximately 3 mm in size). The tissue was subsequently incubated in collagenase (0.3 mg/mL; Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, IN, USA) for 10 minutes at 37°C in a total of 1 mL of digestion solution under constant shaking and intermittent vortexing. Islets were subsequently washed several times in HBSS containing BSA (5 mg/mL) and were hand-picked under a dissecting microscope. Islets were dispersed into single cells by suspension in trypsin-EDTA (GIBCO, BRL) and passage through a siliconized Pasteur pipette. Then, the cells were incubated at 37°C.

2.9. Flow Cytometry Analysis. Cells from the spleen or pancreas obtained as described above were then used for flow cytometry analysis. In brief, cells were washed in flow cytometry wash solution (Dulbecco's PBS containing 1% FCS and 0.05% sodium azide), followed by incubation with allophycocyanin- (APC-) conjugated anti-F4/80 and anti-CD11c antibodies for differentiation of Mφ and DC, respectively. Then, the selected cells were incubated in 3% BSA-PBS containing a phycoerythrin- (PE-) labeled anti-CD80, anti-CCR5, or anti-TLR-4 antibody or a fluorescein isothiocyanate- (FITC-) labeled anti-CD86, anti-CD40, anti-MHC-II, or anti-TLR-2 antibody (all antibodies from Biolegend, San Diego, CA, USA) at 4°C for 30 min. After incubation, the cells were washed several times in buffer, fixed in 1% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich), and stored at 4°C in the dark, followed by analysis using a FACSCalibur flow cytometer and CellQuest software (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA).

2.10. Coculture of Macrophages with Spleen Cells. Coculture of Mφ with naive spleen cells was performed as follows. Adherent Mφ among peritoneal exudate cells (PECs) from healthy or 8 weeks after STZ-treatment Wt or *Mif*^{-/-} mice were obtained. Briefly, the Mφ density was adjusted to 5×10^6 cells/mL, and the cells were plated (100 µL) in 96-well flat-bottom plates (Costar, Cambridge, MA, USA). Three hours later, the PECs were washed three times with warm sterile PBS to remove nonadherent cells, and 10 µg of OVA (Worthington, USA) in 100 µL of DMEM supplemented media was added. Three hours later, adherent Mφ were washed three times with warm sterile DMEM to remove excess OVA that had not been phagocytosed. Spleen cells from OVA-transgenic mice were obtained as previously described [45], suspended at 1×10^6 cells/mL, and added (100 µL) to PECs at a ratio of 1 Mφ:5 spleen cells. The cocultures were maintained at 37°C in 5% CO₂ for 5 days. Then, [3H]-thymidine (185 GBq/mmol activity, Amersham, UK) was added at 0.5 µCi/well, and the cells were incubated for a further 18 h. The cells were harvested using a 96-well harvester (Tomtec, Toku, Finland) and then counted using a microplate counter (Trilux, Toku, Finland). The values are presented as counts per minute (CPM) from triplicate wells.

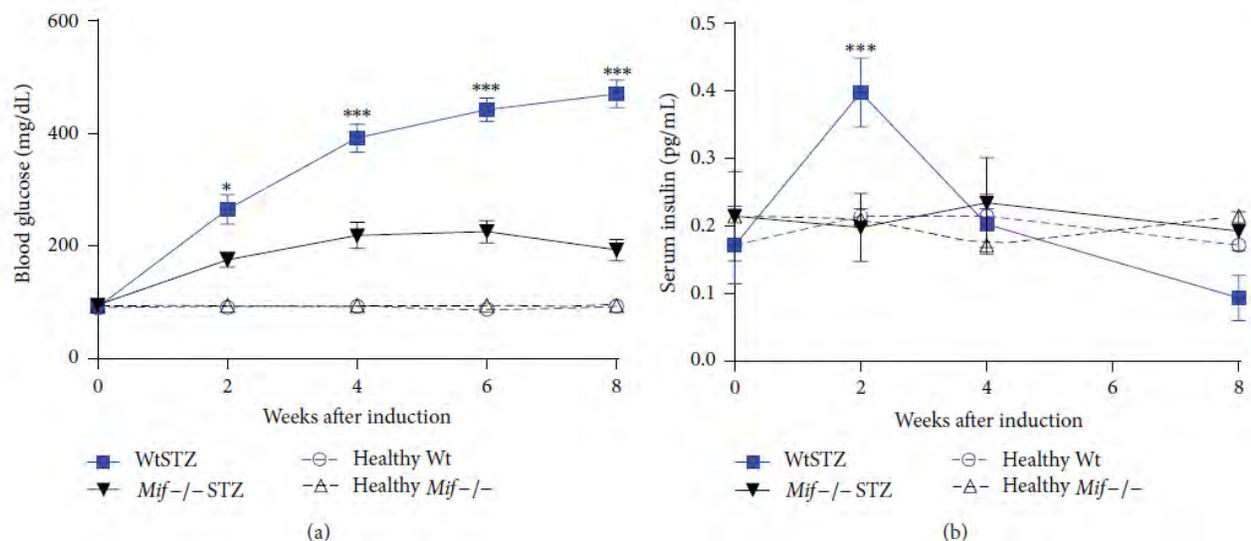


FIGURE 1: *Mif*^{-/-} mice developed less severe hyperglycemia than Wt mice after type 1 diabetes mellitus induction. Blood glucose (every 2 weeks) (a) and serum insulin (0, 2, and 8 weeks) (b) levels were monitored as described in Section 2 in Wt (■) and *Mif*^{-/-} (▼) mice after STZ administration; as controls, healthy Wt (○) or healthy *Mif*^{-/-} (△) mice were plotted as well. All data are representative of three independent experiments and are expressed as the means ± SE ($n =$ at least 5–7 animals per group/time point). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, GraphPad Prism software 6.

2.11. *Mif* Reconstitution. To establish the *Mif* levels under conditions of T1DM, the serum *Mif* levels were determined weekly until 8 weeks after STZ treatment in WtSTZ. *Mif*^{-/-}STZ received similar concentrations of r*Mif* (R&D Systems, USA) to the *Mif* levels observed in WtSTZ. Briefly, *Mif*^{-/-} mice received i.p. injection of STZ together with 500 pg of r*Mif* in 100 μ L of saline solution as a vehicle. Upon STZ treatment, *Mif*^{-/-} mice received an i.p. injection of r*Mif* every three days at the following doses: 850 pg on week 1; 1280 pg on week 2; 1292 pg on week 3; 1305 pg on week 4; 4300 pg on week 5; 7300 pg on week 6; and, finally, 13200 pg on week 7. Other *Mif*^{-/-}STZ mice were injected with an equivalent volume of saline solution (100 μ L) as controls.

2.12. Statistical Analysis. Comparisons between Wt and *Mif*^{-/-} mice that were healthy or treated with STZ were performed using either Student's unpaired *t*-test or ANOVA followed by Turkey's multiple comparisons test for data that displayed a normal distribution. p values less than 0.05 were considered significant and were designated as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, or *** $p < 0.001$. All data were analyzed using GraphPad Prism 6 software (San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. *Mif*^{-/-} Mice Developed Less Severe Hyperglycemia Than Wt Mice after STZ Administration. We first investigated the clinical effects of STZ on *Mif*^{-/-} and Wt mice. Our data demonstrated that Wt mice rapidly developed hyperglycemia after STZ administration. These mice sustained high blood glucose levels from week 2 (281.7 ± 16 mg/dL) until week 8 of STZ administration (470.5 ± 24 mg/dL) (Figure 1(a), WtSTZ: squares). In contrast, hyperglycemia developed gradually in

Mif^{-/-}STZ. The blood glucose level of *Mif*^{-/-}STZ peaked at 219 ± 23 mg/dL on week 4, and the blood glucose level in some mice decreased between weeks 6 and 8 (226 ± 15 and 182 ± 16 mg/dL, resp.) (Figure 1(a), *Mif*^{-/-}STZ: inverted triangles). This observation suggested that a slight recovery of the glucose response may occur in *Mif*^{-/-}STZ at approximately week 8 of STZ treatment.

WtSTZ showed a peak blood insulin level at 2 weeks after STZ treatment, and after the sixth and eighth weeks of treatment, their blood insulin levels were significantly lower than those of healthy Wt mice (Figure 1(b), WtSTZ: squares with solid line; Wt mice: white circles with dotted line). Interestingly, *Mif*^{-/-}STZ showed no significant changes in insulin levels compared to healthy *Mif*^{-/-} or Wt mice over the course of the experiment (Figure 1(b), *Mif*^{-/-}STZ: inverted triangles with solid line; healthy *Mif*^{-/-} mice: white triangles with dotted line).

3.2. *Mif*^{-/-} Mice Produced Lower Proinflammatory Cytokine Levels Than Wt Mice after T1DM Induction. We measured the serum levels of proinflammatory and anti-inflammatory cytokines in Wt and *Mif*^{-/-} mice after STZ administration. As expected, the WtSTZ displayed gradually increasing serum levels of inflammatory cytokines such as *Mif*, IL-12, and IFN- γ (Figures 2(a), 2(b), and 2(c), resp., WtSTZ: squares) between 2 and 8 weeks after T1DM induction. The level of the proinflammatory cytokine IL-17 was significantly increased at 8 weeks after T1DM induction in WtSTZ (Figure 2(d), squares). In contrast, *Mif*^{-/-}STZ displayed significantly lower serum levels of *Mif*, IL-12, IFN- γ , and IL-17 than WtSTZ (Figures 2(a), 2(b), 2(c), and 2(d), resp.; *Mif*^{-/-}STZ: inverted triangles).

The serum levels of the anti-inflammatory cytokine IL-4 were significantly lower in WtSTZ (squares) than in

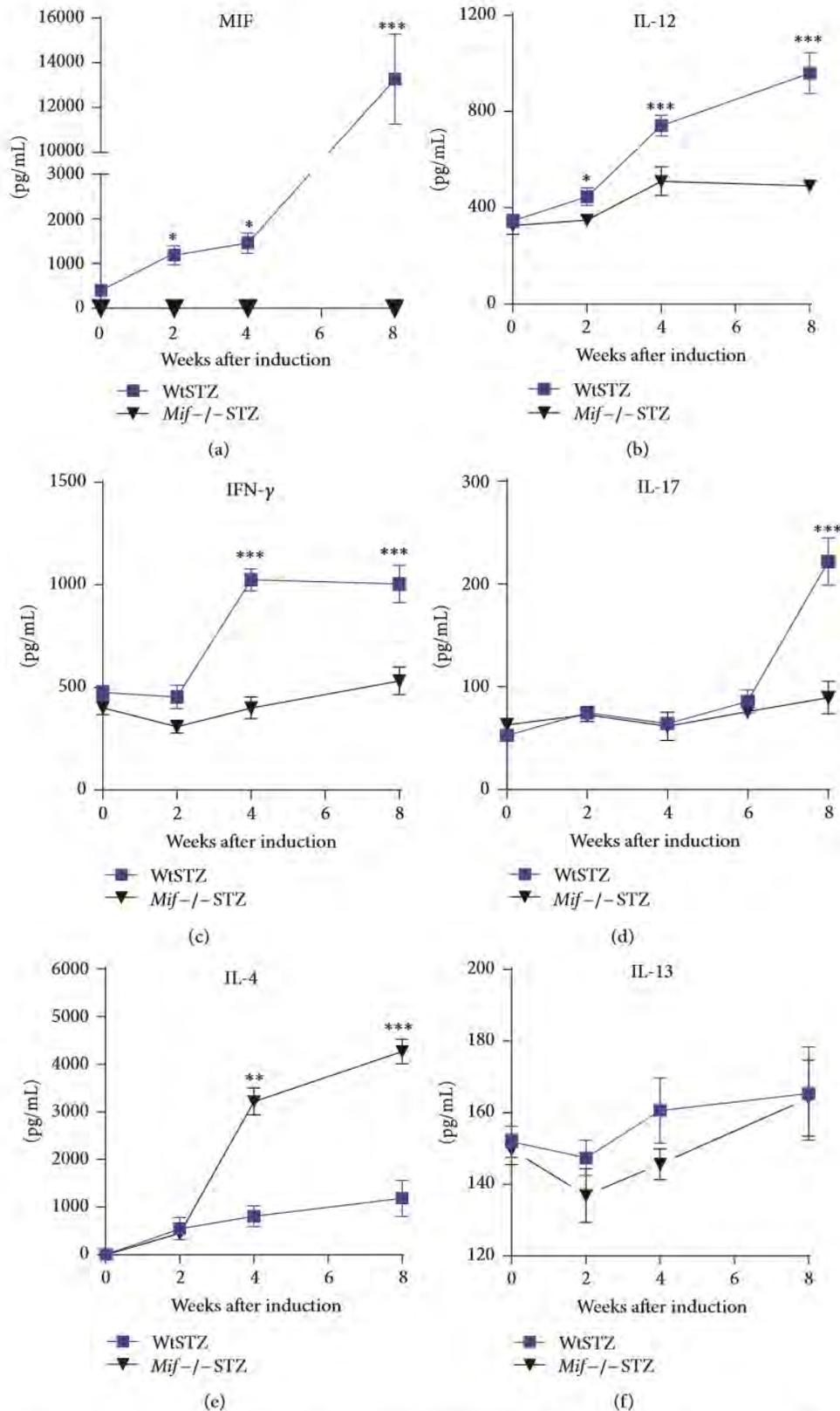


FIGURE 2: *Mif* deficiency prevents the elevation of proinflammatory cytokine production. The levels of Mif (a), IL-12 (b), IFN- γ (c), IL-17 (d), IL-4 (e), and IL-13 (f) in the sera from Wt (■) and *Mif*^{-/-} (▼) mice at 0, 2, 4, and 8 weeks after STZ administration were measured via enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) in triplicate, as indicated in Section 2. Data are expressed as the means \pm SE (n = at least 5–7 mice per group/time point). * p < 0.05, ** p < 0.01, or *** p < 0.001, GraphPad Prism software 6.

TABLE 1: Assessment of the extent of leukocyte infiltration into pancreatic islets of Wt and *Mif*^{-/-} mice at 8 weeks after STZ administration.

Groups	Number of islets	Infiltrated islets	Islets that lost circular morphology
Wt	100	ND	ND
WtSTZ	100	100	65
<i>Mif</i> ^{-/-}	100	ND	ND
<i>Mif</i> ^{-/-} -STZ	100	33	25

ND: none detected; Wt: wild-type.

Mif^{-/-}-STZ (inverted triangles) (Figure 2(e)). No differences in the serum IL-13 levels were found between WtSTZ and *Mif*^{-/-}-STZ (Figure 2(f)).

3.3. *Mif*^{-/-} Mice Showed Reduced Pancreatic Islet Damage and Cellular Infiltration Compared to Wt Mice after T1DM Induction. To confirm that STZ reached its target, Wt and *Mif*^{-/-} mice were treated with a single high dose of STZ (150 mg/kg). The toxic effect of high-dose STZ was similar between Wt and *Mif*^{-/-} mice (Supplementary Figure 1 in Supplementary Material available online at <http://dx.doi.org/10.1155/2016/7053963>). In both experimental groups, the toxic effect of STZ was present, and the high dose of STZ destroys the insulin-producers beta cells, leading to acute nonimmune-mediated diabetes; in contrast the multiple low doses of STZ at 40 mg/Kg, daily for five consecutive days, require participation of immune-inflammatory events for T1DM development [41].

To assess the damage to β cells in a model of T1DM induced by multiple low doses of STZ, we sacrificed the mice at 8 weeks after T1DM induction and removed the pancreas for H&E staining and histological analysis. We assessed the number and size of normal and infiltrated pancreatic islets in each slide for the experimental and healthy mice. Thirty pancreatic islets were quantified per experimental group.

Islets from healthy Wt and *Mif*^{-/-} mice had a round morphology and well-defined borders without cellular infiltration (Figures 3(a) and 3(c)). As expected, the pancreas from WtSTZ showed fewer and smaller islets than those from healthy Wt mice. Additionally, evident cellular infiltration led to the breakdown of islet morphology in the pancreas of WtSTZ (Figure 3(b)). In contrast, partial islet damage (Figure 3(d)) and no significant reduction in islet number or size were observed in *Mif*^{-/-}-STZ compared to WtSTZ.

As shown in Figure 3(e), *Mif*^{-/-} mice at 8 weeks after STZ administration displayed marked reductions in both invasive insulinitis (insulinitis grades 3 and 4) and mild peri-insulinitis (insulinitis grade 2) in pancreatic islets compared to WtSTZ. Thus, pancreatic islets from *Mif*^{-/-}-STZ had reduced damage associated with reduced leukocyte infiltration compared to pancreatic islets from WtSTZ. These results demonstrated that STZ administration triggers β -cell destruction followed by insulin deficiency and hyperglycemia in Wt mice. Although STZ reached the pancreatic islets in *Mif*^{-/-} mice, *Mif*^{-/-}-STZ exhibited minor damage compared to WtSTZ.

3.4. *Mif*^{-/-} Mice Showed Lower Levels of Specific Pancreatic Islet Antibodies Than Wt Mice after T1DM Induction. In T1DM, the immune system targets self-antigens within pancreatic islets and destroys the inhabiting insulin-secreting β -cells. Therefore, autoantibody detection serves as a predictive factor for the onset of diabetes in both humans and mice [46, 47].

To investigate how *Mif* contributes to autoantibody production in T1DM, the serum levels of pancreatic islet-specific IgG2a and IgG1 antibodies were determined in Wt and *Mif*^{-/-} mice after 2, 4, and 8 weeks after STZ administration. WtSTZ produced high levels of IgG2a at all time points analyzed (Figure 4(a)) and IgG1 only at week 8 (Figure 4(b)). Importantly, *Mif*^{-/-}-STZ mice displayed significantly lower levels of both IgG2a and IgG1 than WtSTZ (Figures 4(a) and 4(b), resp.), suggesting suppressed development of an adaptive immune response. These findings suggest that *Mif* modulates the incidence and severity of diabetes by favoring the development of autoantibodies in T1DM.

3.5. Splenic M ϕ and DC from *Mif*^{-/-}-STZ Mice Expressed Lower Levels of Costimulatory Molecules Than Those from WtSTZ Mice. We showed that the reduced severity of T1DM in *Mif*^{-/-}-STZ is associated with decreased pancreatic islet damage and diminished adaptive immune responses. To determine whether this phenotype could be related to the degree of activation of antigen-presenting cells, we characterized the expression of the costimulatory molecules CD80, CD86, and MHC-II and of the receptors TLR-2 and TLR-4 in M ϕ and DC from the spleen and pancreas of *Mif*^{-/-} and Wt mice after 0, 2, 4, and 8 weeks of STZ administration.

In cells isolated from the spleen, the percentages of CD80-, CD86-, MHC-II-, TLR2-, and TLR4-expressing M ϕ (F4/80⁺) were similar between healthy *Mif*^{-/-} and Wt mice (Figures 5(a), 5(b), 5(c), 5(d), and 5(e), resp., at time 0 post-STZ administration, right panel). Interestingly, upon STZ administration, *Mif*^{-/-} mouse M ϕ showed impaired activation, characterized by reduced expression of CD80, CD86, MHC-II, TLR-2, and TLR-4, compared with M ϕ from WtSTZ mice (Figures 5(a), 5(b), 5(c), 5(d), and 5(e), resp.).

Similarly, DCs (CD11c⁺) isolated from the spleen of *Mif*^{-/-}-STZ mice expressed lower levels of CD80, CD86, and MHC-II at 4 through 8 weeks after STZ administration (Figures 6(a), 6(b), and 6(c), resp.), whereas the expression of TLR-2 and TLR-4 in DCs was reduced at 4 weeks in *Mif*^{-/-}-STZ compared to WtSTZ (Figures 6(d) and 6(e), resp.).

3.6. Pancreatic M ϕ and DC from *Mif*^{-/-}-STZ Mice Express Lower Levels of Costimulatory Molecules Than Those from WtSTZ Mice. To investigate the role of *Mif* in the activation of APCs in the pancreas, we determined MHC-II and costimulatory molecule expression in M ϕ and DC in the pancreas of *Mif*^{-/-}-STZ and WtSTZ mice. M ϕ from *Mif*^{-/-}-STZ expressed lower levels of CD80 and CD86 from 4 through 8 weeks after STZ administration (Figures 7(a) and 7(b), resp.). Alternatively, reduced expression of MHC-II, TLR-2, and TLR-4 was detected earlier, from 2 weeks until 8 weeks after STZ treatment (Figures 7(c), 7(d), and 7(e), resp.).

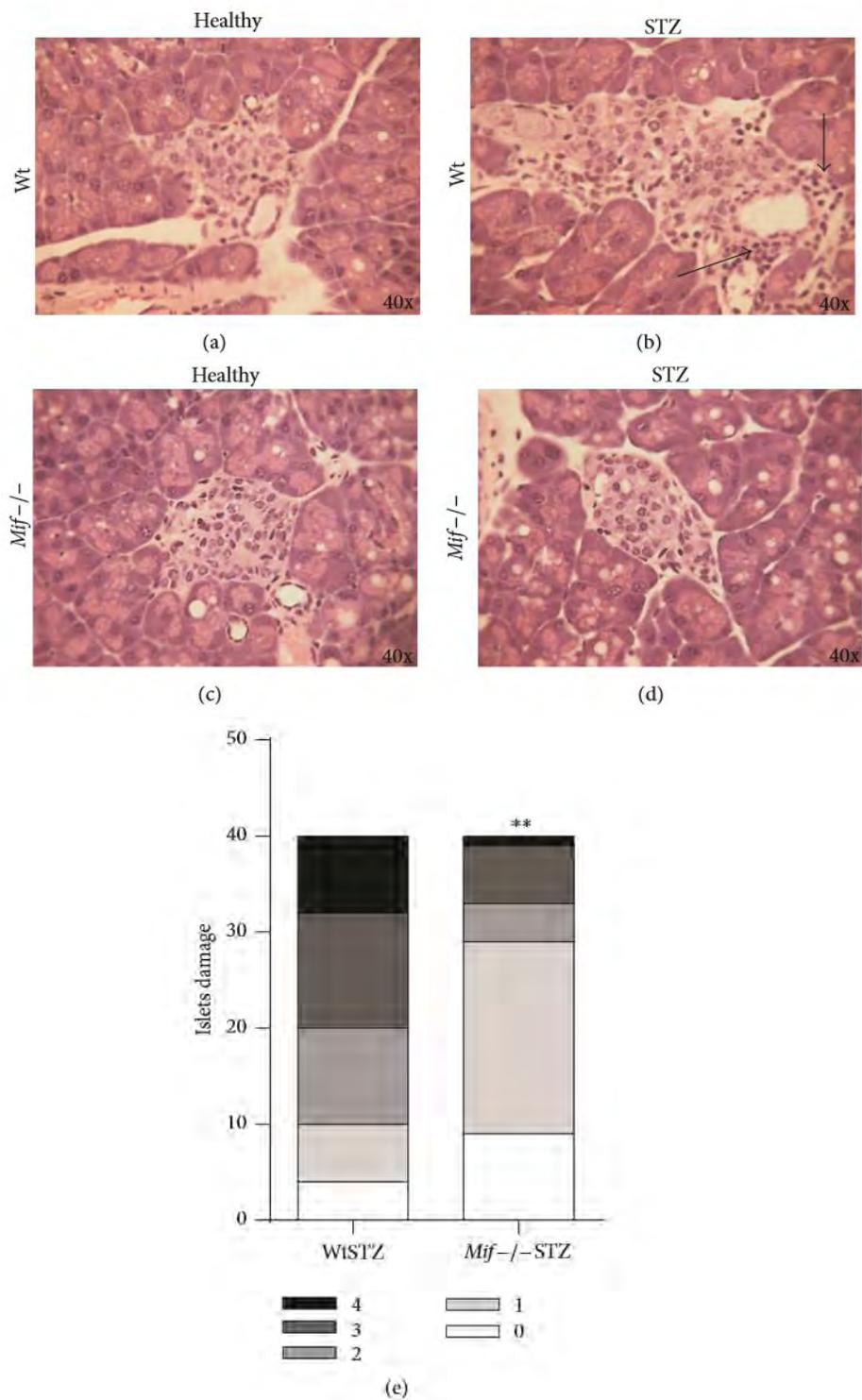


FIGURE 3: *Mif*^{-/-} mice conserve their healthy anatomy and exhibit limited cellular infiltration into pancreatic islets after STZ administration. Pancreases isolated from Wt or *Mif*^{-/-} mice were examined via histological analysis of eosin-hematoxylin (E&H) staining to establish the number of pancreatic islets and to determine lymphocyte infiltration (arrowhead in (b)) at 8 weeks after STZ administration. Pancreatic islets from healthy Wt mice (a); Wt mice treated with STZ, WtSTZ (b); healthy *Mif*^{-/-} mice (c), and *Mif*^{-/-} mice treated with STZ, *Mif*^{-/-}STZ (d). Compilation of infiltration stages in the pancreas of Wt and *Mif*^{-/-} mice after STZ administration (e). Pancreatic islets were scored using the following scale: grade 0 (no insulinitis) = 0% infiltration; grade 1 (peri-insulinitis) = 1–10% infiltration; grade 2 (moderate insulinitis) = 11–<50% infiltration; grade 3 (severe insulinitis) = >50% infiltration; or grade 4 (complete insulinitis) = complete infiltration. We counted 30–40 islets per experiment using six mice per experimental group, depending on the number of islets that were present in the sections. All data are representative of two independent experiments, $n = 12$ from two experiments. ** $p < 0.01$, GraphPad Prism software 6.

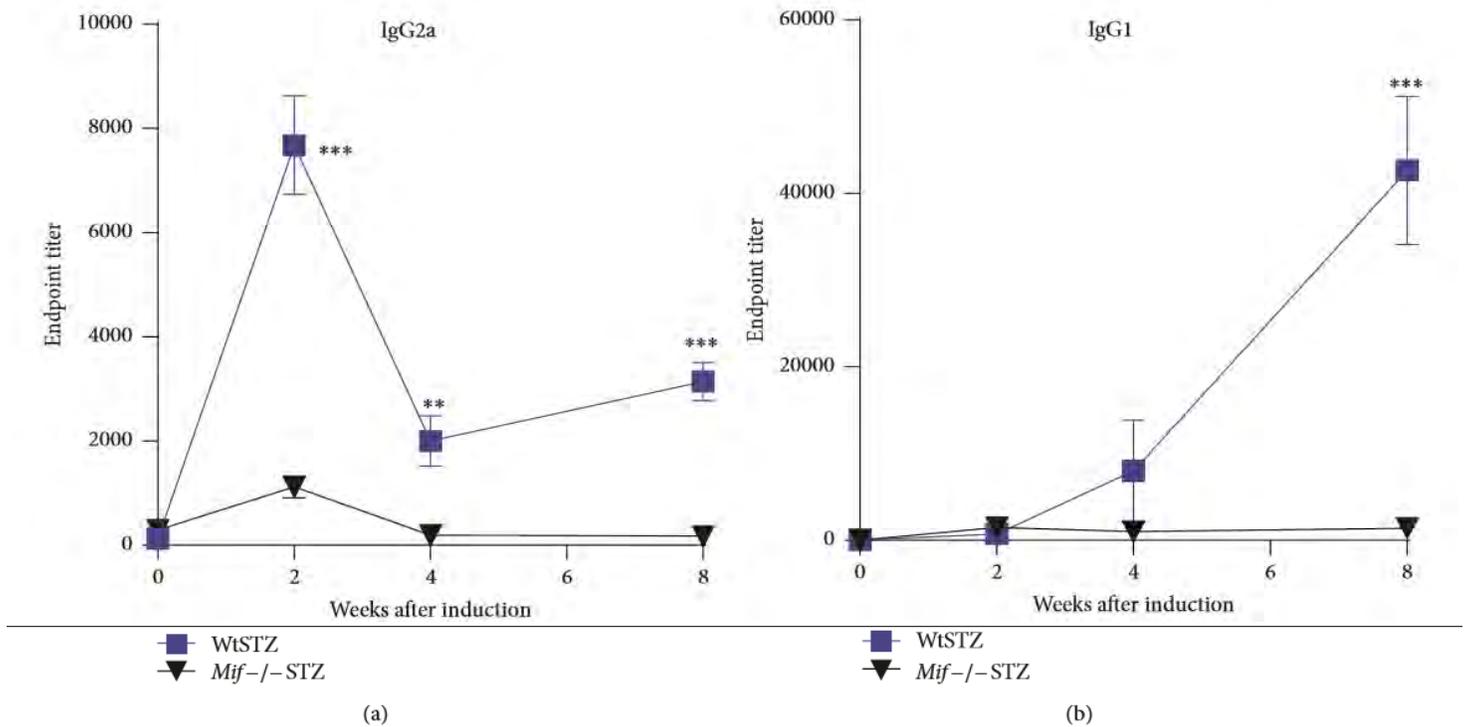


FIGURE 4: Kinetics of antibody responses in type 1 diabetes mellitus models induced by low-dose STZ. Specific production of IgG2a (a) and IgG1 (b) antipancreatic islet antigen antibodies. Sera from Wt (■) and *Mif*^{-/-} mice (▼) at weeks 0, 2, 4, and 8 after STZ administration were processed by ELISA, using pancreatic islets antigen (PIAg) as the source of specific antigen as indicated in Section 2. Data are expressed as the mean reciprocal endpoint titer \pm SEM. Five to six animals were analyzed in each group. The data shown are representative of one out of three identical experiments with similar results. Mann-Whitney *U* test. ***p* < 0.01, ****p* < 0.001, GraphPad Prism software 6.

Moreover, DC from *Mif*^{-/-}STZ mice displayed reduced CD80 at 4 to 8 weeks (Figure 8(a)), CD86 at all time points analyzed (Figure 8(b)), and reduced TLR-2 and TLR-4 expression at 4 weeks and 2 weeks, respectively, compared to DCs from WtSTZ (Figures 8(d) and 8(e), resp.). No significant differences in MHC-II expression were detected (Figure 8(c)).

3.7. F4/80⁺ Macrophages and CD11b⁺ Monocytes Obtained from *Mif*^{-/-}STZ Show Impaired Capacity to Induce Spleen Cell Proliferation. The ability of M ϕ to activate T cells was investigated using OVA-transgenic T cell cocultures. M ϕ were collected from Wt or *Mif*^{-/-} mice treated or untreated for 8 weeks with STZ. As shown in Figure 9(a), after priming the cells with OVA *in vitro*, M ϕ from *Mif*^{-/-}STZ mice induced less T cell proliferation in response to OVA than M ϕ from WtSTZ. A similar trend was observed in cocultures of CD11b⁺ cells from *Mif*^{-/-}STZ and OVA-transgenic T cells (Figure 9(b)). These data suggest a role of Mif in promoting M ϕ activation, which in turn induces specific T cell proliferation, particularly in this experimental T1DM model.

3.8. Mif Reconstitution in STZ-Treated *Mif*^{-/-} Mice Promotes Hyperglycemia and Reestablishes the Production of Proinflammatory Cytokines in This T1DM Model. The systemic levels of Mif were reconstituted in *Mif*^{-/-}STZ mice during the course of T1DM, as described in Section 2. *Mif*^{-/-}STZ that received rMif (*Mif*^{-/-}STZ+rMif) displayed blood glucose

levels similar to those in WtSTZ during the first six weeks after STZ treatment. However, at 8 weeks after STZ treatment, the glucose levels were not increased in *Mif*^{-/-}STZ+rMif compared to WtSTZ (Figure 10(a)).

Comparable serum levels of the cytokines IL-6 and IL-12 were observed between *Mif*^{-/-}STZ+rMif and WtSTZ during the first 6 weeks after STZ treatment. However, the levels of these inflammatory cytokines significantly decreased in *Mif*^{-/-}STZ+rMif mice at 8 weeks after STZ treatment compared to WtSTZ (Figures 10(b) and 10(d)). Interestingly, the serum levels of TNF- α from *Mif*^{-/-}STZ+rMif were higher than those of WtSTZ at all time points analyzed (Figure 10(c)). These results confirm that Mif acts as a powerful inducer of proinflammatory cytokines involved in the development of experimental T1DM.

4. Discussion

Currently, there is no doubt that Mif is a key molecule that promotes proinflammatory immune responses [48]. This proinflammatory property of Mif contributes to developing protective inflammatory-Th1 immune response in different models of parasitic diseases [49]. In contrast the same proinflammatory property of Mif participates in the pathogenesis of many inflammatory diseases [50]. In line with the last one, recently it has been established that high blood levels of Mif are associated with human T1DM, similar to the findings in experimental mouse models of T1DM [20, 21, 24, 51].

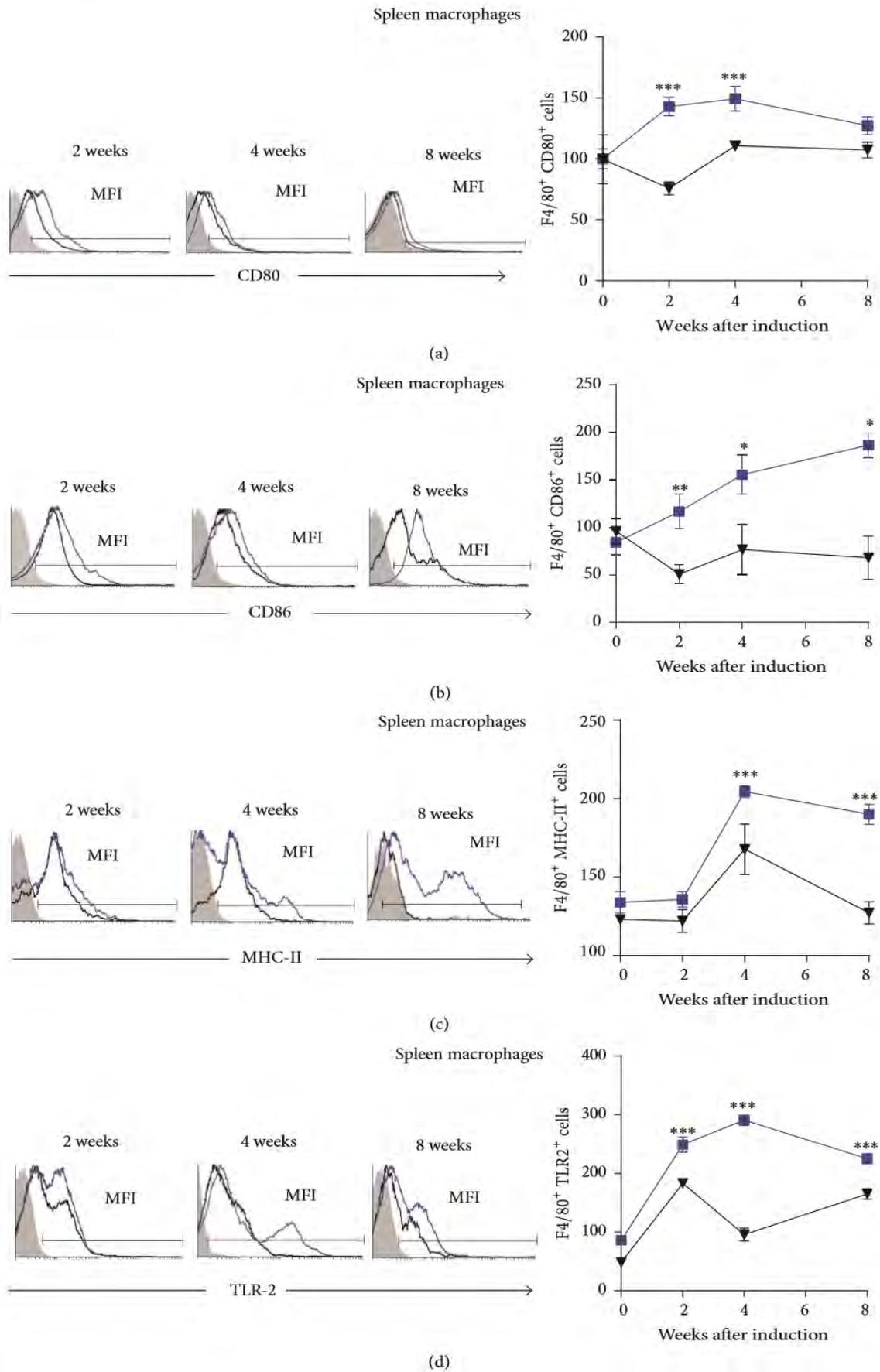


FIGURE 5: Continued.

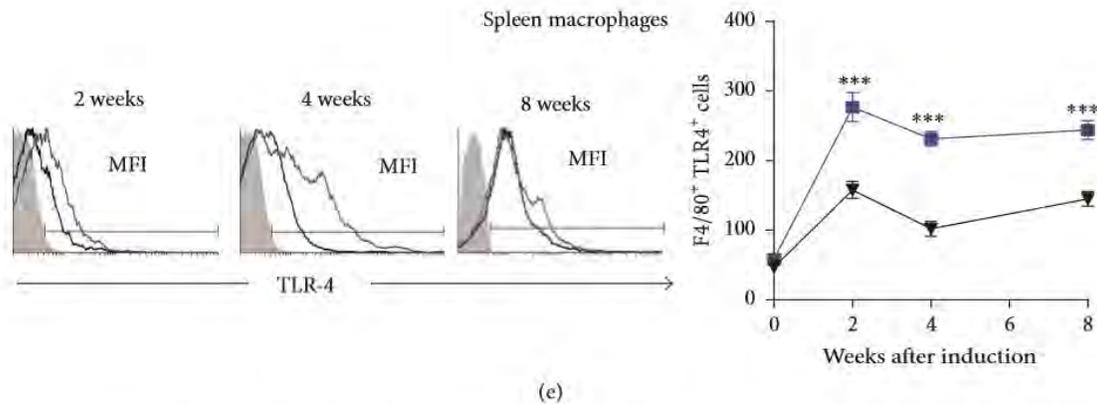


FIGURE 5: *Mif* promotes costimulatory molecule expression on spleen Mφ. The time course of costimulatory molecule: CD80 (a), CD86 (b), MHC-II (c), TLR-2 (d), and TLR-4 (e) expression on spleen F4/80⁺ Mφ. Mφ from spleen of Wt and *Mif*^{-/-} mice were harvested at 0, 2, 4, and 8 weeks after STZ administration and 1×10^7 cells/mL were processed by flow cytometric analysis as indicated in Section 2. Analyses of expression are shown in the right panels: WtSTZ (■); *Mif*^{-/-}STZ (▼). And representative histograms of expression based on fluorescence are shown in the left panels; isotype controls are indicated in gray shadow, the black line represents expression by *Mif*^{-/-}STZ cells, and the blue line shows expression by WtSTZ cells. The data are presented as the mean fluorescence intensities (MFI) from one representative experiment. Each experiment was repeated three times ($n = 3$) and individually analyzed. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, or *** $p < 0.001$, GraphPad Prism software 6.

Studies in NOD mice or mice treated with multiple low doses of STZ (despite the pathogenic differences between these models) have shown that pancreatic β cell destruction results from the toxic effect of free radicals (O_2^- , H_2O_2 , and nitric oxide) and inflammatory cytokines released by activated Mφ and T cells [15, 41, 52]. Therefore, both models have been widely used to dissect the role of *Mif* in the pathogenesis of T1DM using anti-*Mif* monoclonal antibody treatment or using *Mif*^{-/-} mice. In all cases, the lack of *Mif* resulted in diminished manifestation of the disease, decreased glucose blood levels, and reduced production inflammatory cytokines associated with the development of T1DM, including TNF- α , IL-1 β , IFN- γ , IL-12, and IL-23 [21, 22, 24]. Our study validates and extends these findings by demonstrating an important role for *Mif* in promoting costimulatory molecule expression in Mφ and DC during T1DM development. We further demonstrate that, in addition to regulating Mφ and DC activation in T1DM, Mφ isolated from T1DM *Mif*^{-/-} mice exhibit reduced T cell activation.

Here, we observed that Wt mice treated with STZ exhibited high blood glucose levels greater than 400 mg/dL but *Mif*^{-/-}STZ mice developed lower glucose levels of approximately 200 mg/dL, in association with lower serum levels of proinflammatory cytokines. After reconstituting *Mif* using exogenous rMif, *Mif*^{-/-}STZ showed blood glucose levels and IL-6 and IL-12 levels similar to those in WtSTZ from 2 to 6 weeks after STZ treatment. Interestingly, TNF- α serum levels from *Mif*^{-/-}STZ+rMif were higher than those of WtSTZ at all time points analyzed. The reduction levels of blood glucose, IL-6, and IL-12 observed in *Mif*^{-/-}STZ mice, on week 8, probably were because the animals did not receive rMif injections on week 8, as mentioned in Section 2, so the residual effect of rMif from week 1 to week 7 was insufficient to induce IL-6 and IL-12 levels at 8 week similar to that observed in the WtSTZ mice in this point, at least

for these two cytokines. These observations confirm that *Mif* exogenous acts as a powerful inducer of IL-6 and IL-12, but only if it is present in steady high concentration.

In addition, we found that *Mif*^{-/-}STZ did not produce detectable levels of islet autoantibodies, in contrast to WtSTZ, which produced high levels of islet autoantibodies. It is well known that the early presence of islet autoantibodies is decisive in the development of diabetes by NOD mice as well as humans [46, 47, 53]. Our results confirm that *Mif* is essential for the development of hyperglycemia and suggest a role for *Mif* not only in the innate immune response but also in the adaptive immune response in T1DM.

Recently, it has been reported that *Mif* is produced by pancreatic β -cells and that *Mif* is released by insulin granules in an autocrine fashion [54, 55]. The chemical destruction of β -pancreatic islets by STZ in Wt mice damaged β -pancreatic islets; this condition could reduce one major source of *Mif* in this experimental T1DM model. However, we did not observe a reduction in *Mif* levels in this model; in contrast, Wt mice produced high serum levels of *Mif* after STZ administration. In line with this finding, it is known that the pancreatic islets remaining after treatment with STZ produce high levels of *Mif* [21] and that an elevation of *Mif* secretion precedes pancreatic islet death induced by IFN- γ , TNF- α , and IL-1 β [24]. This evidence establishes that STZ did not influence *Mif* production/release by pancreatic islets or other cellular sources, such as T cells, DC, and Mφ infiltrating the pancreas.

The loss of insulin production in T1DM is related to pancreatic β -cell destruction due to insulinitis [56]. We observed that WtSTZ developed high serum levels of *Mif* and low insulin levels compared to *Mif*^{-/-}STZ, which expressed insulin levels comparable to those in healthy mice. The histological analysis of pancreatic islets showed that WtSTZ displayed 100% insulinitis, compared to the 33% insulinitis observed in *Mif*^{-/-}STZ mice. These observations confirm

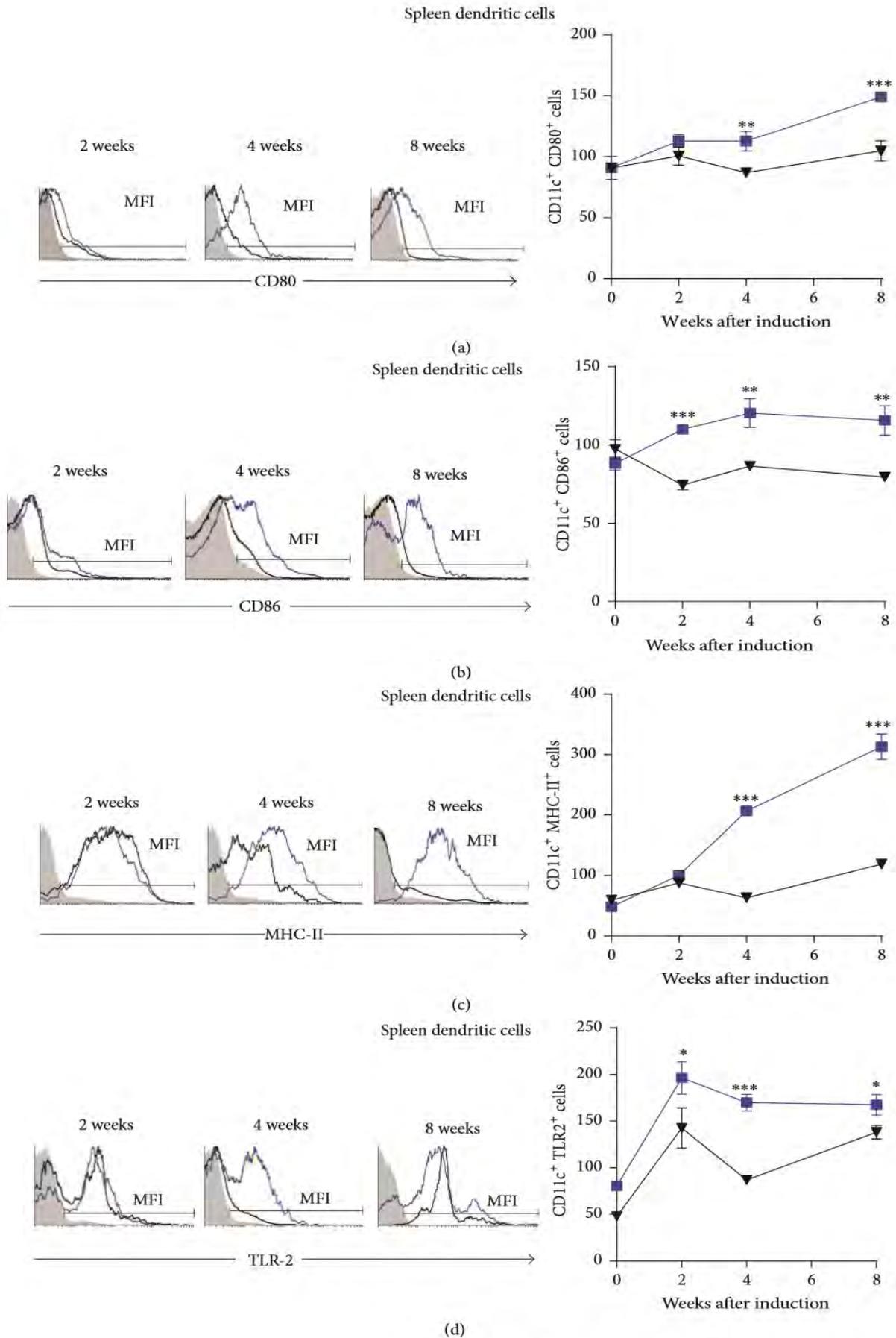
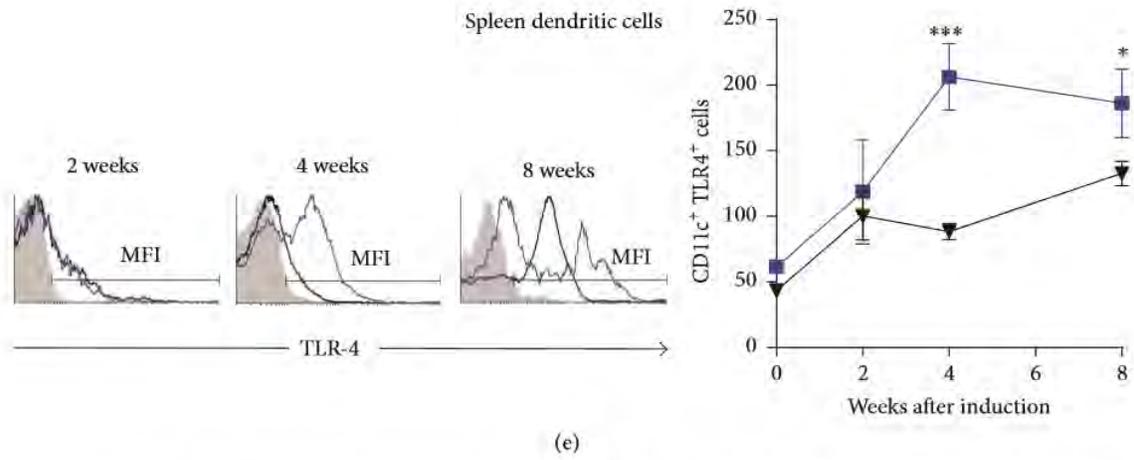
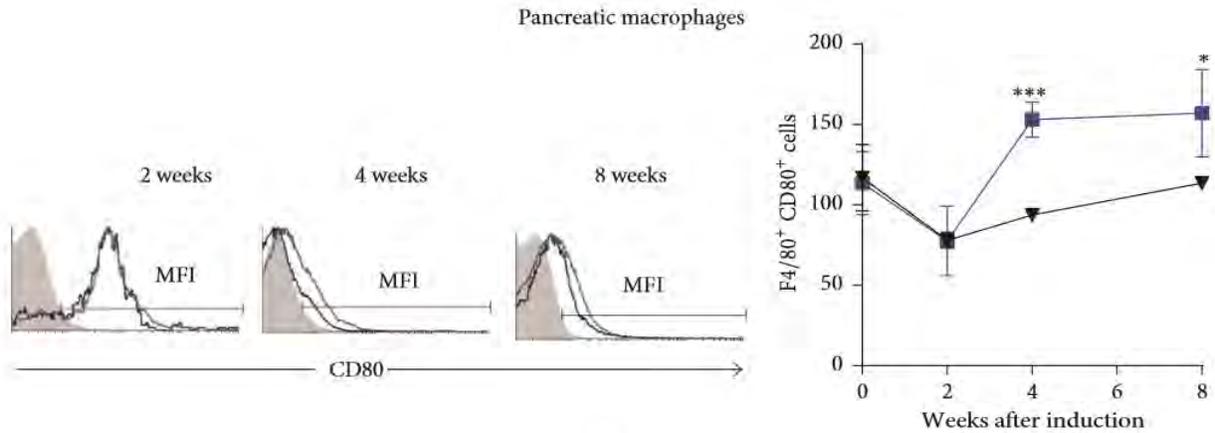


FIGURE 6: Continued.

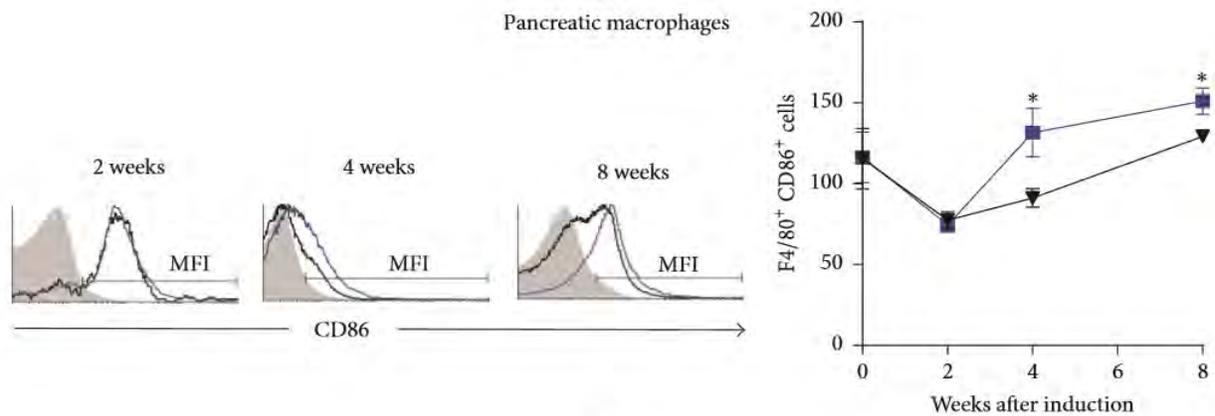


(e)

FIGURE 6: *Mif* promotes costimulatory molecules expression on spleen DC. The time course of costimulatory molecule: CD80 (a), CD86 (b), MHC-II (c), TLR-2 (d), and TLR-4 (e) expression on spleen CD11c⁺ DC. DC from spleen of Wt and *Mif*^{-/-} mice were harvested at 0, 2, 4, and 8 weeks after STZ administration and 1×10^7 cells/mL were processed by flow cytometric analysis as indicated in Section 2. Analyses of expression are shown in the right panels: WtSTZ (■); *Mif*^{-/-}STZ (▼). And representative histograms of expression based on fluorescence are shown in the left panels. Isotype controls are indicated in gray shadow, the black line represents expression by *Mif*^{-/-}STZ cells, and the blue line shows expression by WtSTZ cells. The data are presented as the mean fluorescence intensities (MFI) from one representative experiment. Each experiment was repeated three times ($n = 3$) and individually analyzed. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, or *** $p < 0.001$, GraphPad Prism software 6.



(a)



(b)

FIGURE 7: Continued.

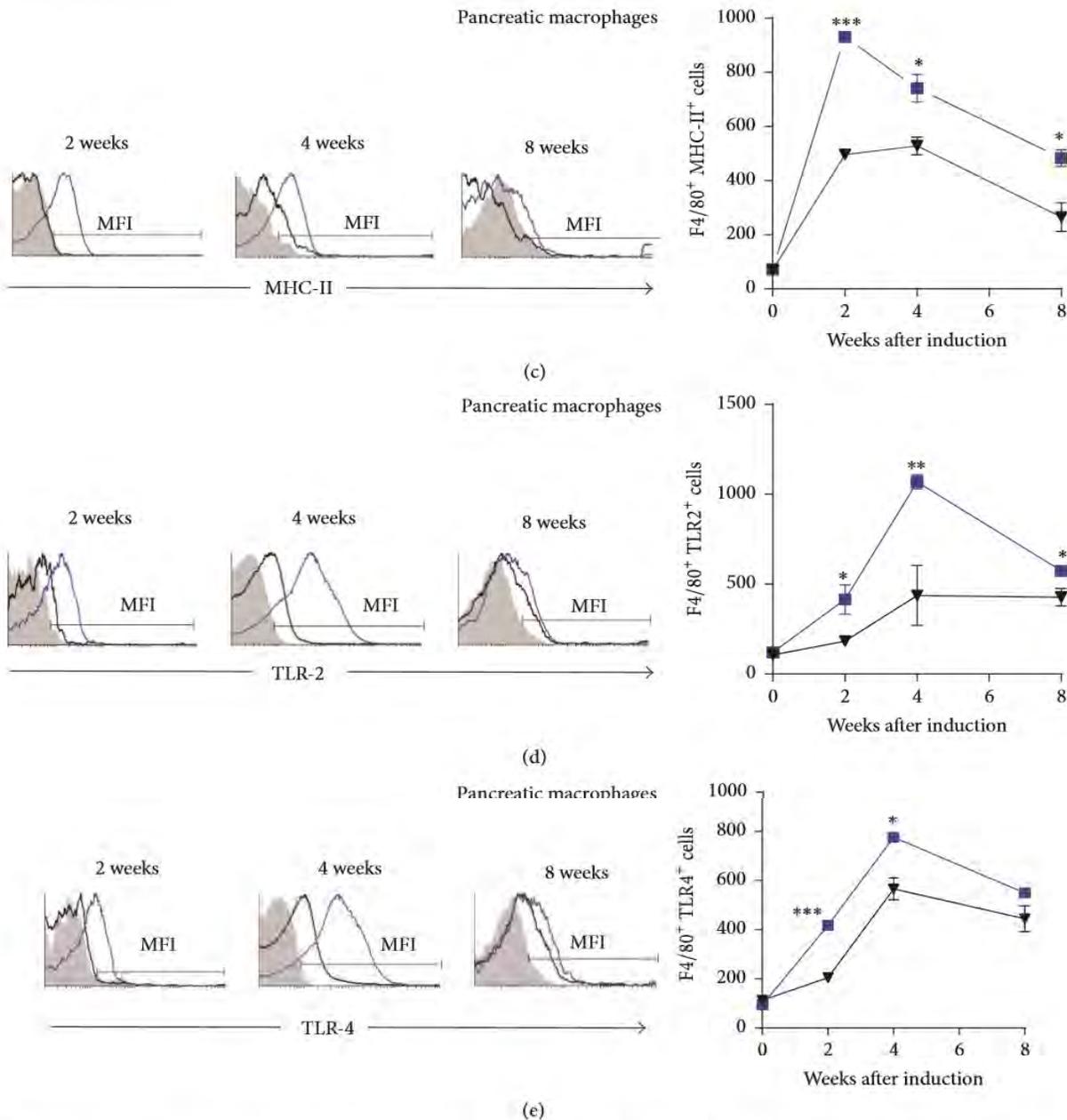


FIGURE 7: *Mif* promotes costimulatory molecule expression on pancreatic *Mφ*. The time course of costimulatory molecule: CD80 (a), CD86 (b), MHC-II (c), TLR-2 (d), and TLR-4 (e) expression on pancreatic F4/80⁺ *Mφ*. *Mφ* from pancreas of Wt and *Mif*^{-/-} mice were harvested at 0, 2, 4, and 8 weeks after STZ administration and 1×10^7 cells/mL were processed by flow cytometric analysis as indicated in Section 2. Analyses of expression are shown in the right panels: WtSTZ (■); *Mif*^{-/-}STZ (▼). And representative histograms of expression based on fluorescence are shown in the left panels. Isotype controls are indicated in gray shadow, the black line represents expression by *Mif*^{-/-}STZ cells, and the blue line shows expression by WtSTZ cells. The data are presented as the mean fluorescence intensities (MFI) from one representative experiment. Each experiment was repeated three times ($n = 3$) and individually analyzed. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, or *** $p < 0.001$, GraphPad Prism software 6.

that *Mif* deficiency resulted in pancreatic islet protection, probably by controlling the functional activity and modulating the secretory capacity of proinflammatory cytokines produced by T cells, DC, and *Mφ* that reach the pancreatic cells.

Mif has been recognized as a molecule that not only promotes proinflammatory cytokine production but also acts

as a chemokine. For example, *Mif* plays a crucial role in leukocyte recruitment and arrest during atherosclerosis development [57]. Therefore, *Mif* could participate in the process of insulinitis to promote the production of proinflammatory cytokines, but *Mif* could also promote leukocyte recruitment to pancreatic β -cells. For this reason, *Mif*^{-/-}STZ exhibited reduced insulinitis.

Pancreatic dendritic cells

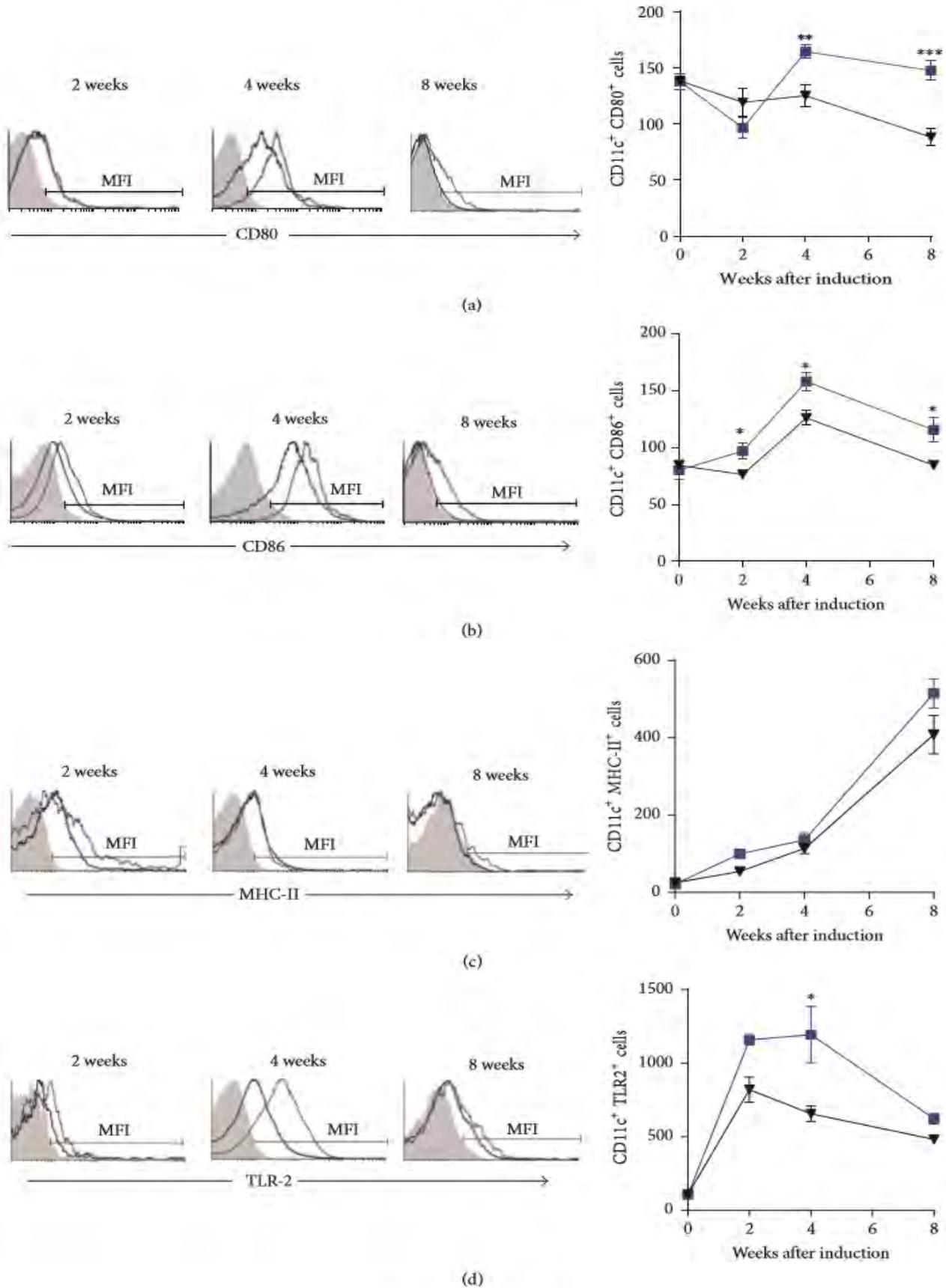


FIGURE 8: Continued.

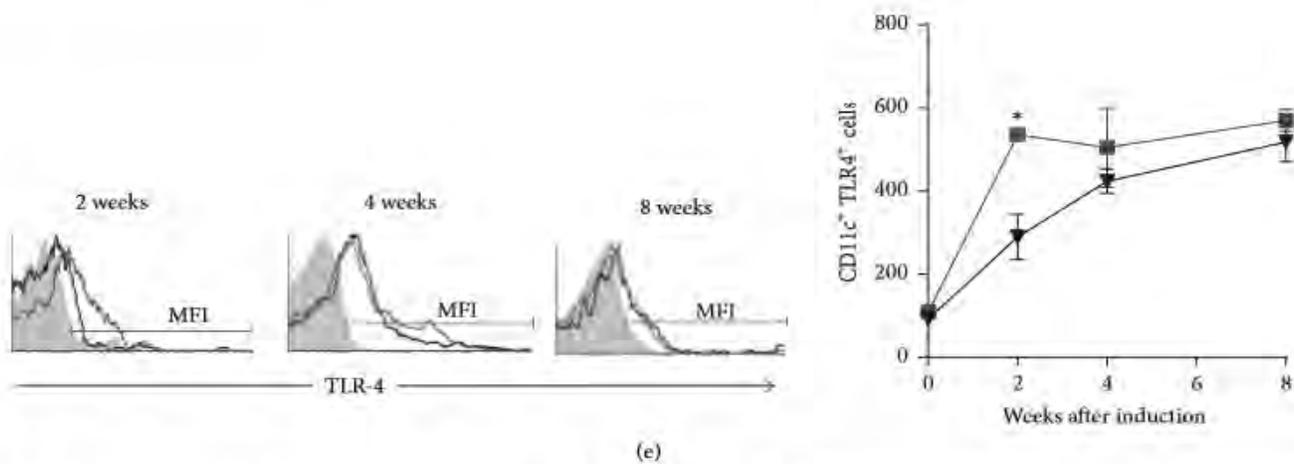


FIGURE 8: *Mif* promotes costimulatory molecules expression on pancreatic DC. The time course of costimulatory molecule: CD80 (a), CD86 (b), MHC-II (c), TLR-2 (d), and TLR-4 (e) expression on pancreatic CD11c DC. DC from pancreas of Wt and *Mif*^{-/-} mice were harvested at 0, 2, 4, and 8 weeks after STZ administration and 1×10^7 cells/mL were processed by flow cytometric analysis as indicated in Section 2. Analyses of expression are shown in the right panels: WtSTZ (■); *Mif*^{-/-}STZ (▼). And representative histograms of expression based on fluorescence are shown in the left panels. Isotype controls are indicated in gray shadow, the black line represents expression by *Mif*^{-/-}STZ cells, and the blue line shows expression by WtSTZ cells. The data are presented as the mean fluorescence intensities (MFI) from one representative experiment. Each experiment was repeated three times ($n = 3$) and individually analyzed. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, or *** $p < 0.001$, GraphPad Prism software 6.

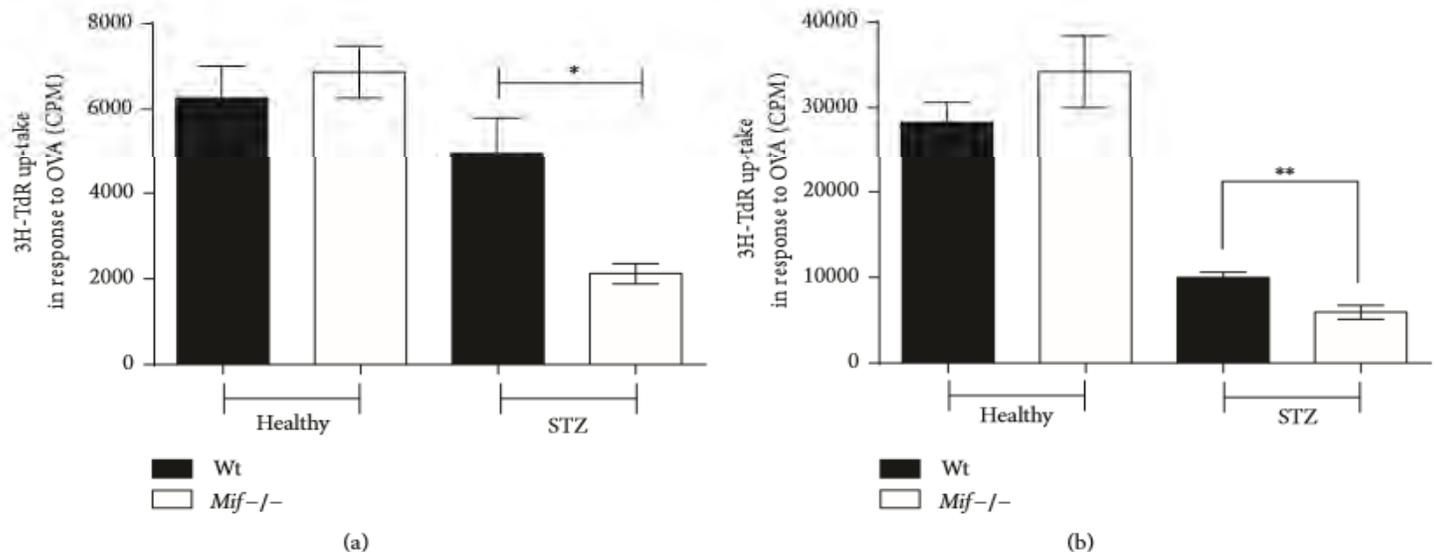


FIGURE 9: Macrophages and monocytes from *Mif*^{-/-} mice have impaired ability to induce lymphocyte proliferation. At 8 weeks after STZ treatment, Wt (■) or *Mif*^{-/-} (□) Mφ (F4/80⁺) and monocytes (CD11b⁺) primed with 10 μg/mL OVA were cocultured with OVA-transgenic T cells for 5 days. Subsequently, [3H]-thymidine was added for 18 h, and [3H]-thymidine incorporation was measured. The values are presented as means ± SEM counts per minute (CPM) from triplicate wells of three independent experiments ($n = 8$). * $p < 0.05$ or ** $p < 0.01$. GraphPad Prism software 6, GraphPad Prism software 6.

Antigen-presenting cells, Mφ and DC, are key mediators of the development of T1DM [4]. Moreover, it has been proposed that DC orchestrate the autoimmune response in T1DM via TLR-2 and TLR-4 [58]. Previous studies by us and others have shown that *Mif* induces the expression of costimulatory molecules on Mφ and DC in some pathological infections [59–61]. Here, we identified the expression of costimulatory molecules and TLR-2 and TLR-4 on Mφ and DC, as well as the ability of Mφ to activate T lymphocytes.

Our results demonstrated that both Mφ and DC from the spleen and pancreas of *Mif*^{-/-}STZ mice expressed lower levels of CD80, CD86, MHC-II, TLR-2, and TLR-4 than those of WtSTZ. These results demonstrate a role of *Mif* in the activation of Mφ and DC to promote costimulatory molecule expression, which might drive pancreas-specific T cell activation and effector Th1 subset differentiation, processes that have been associated with subsequent pancreatic injury in T1DM.

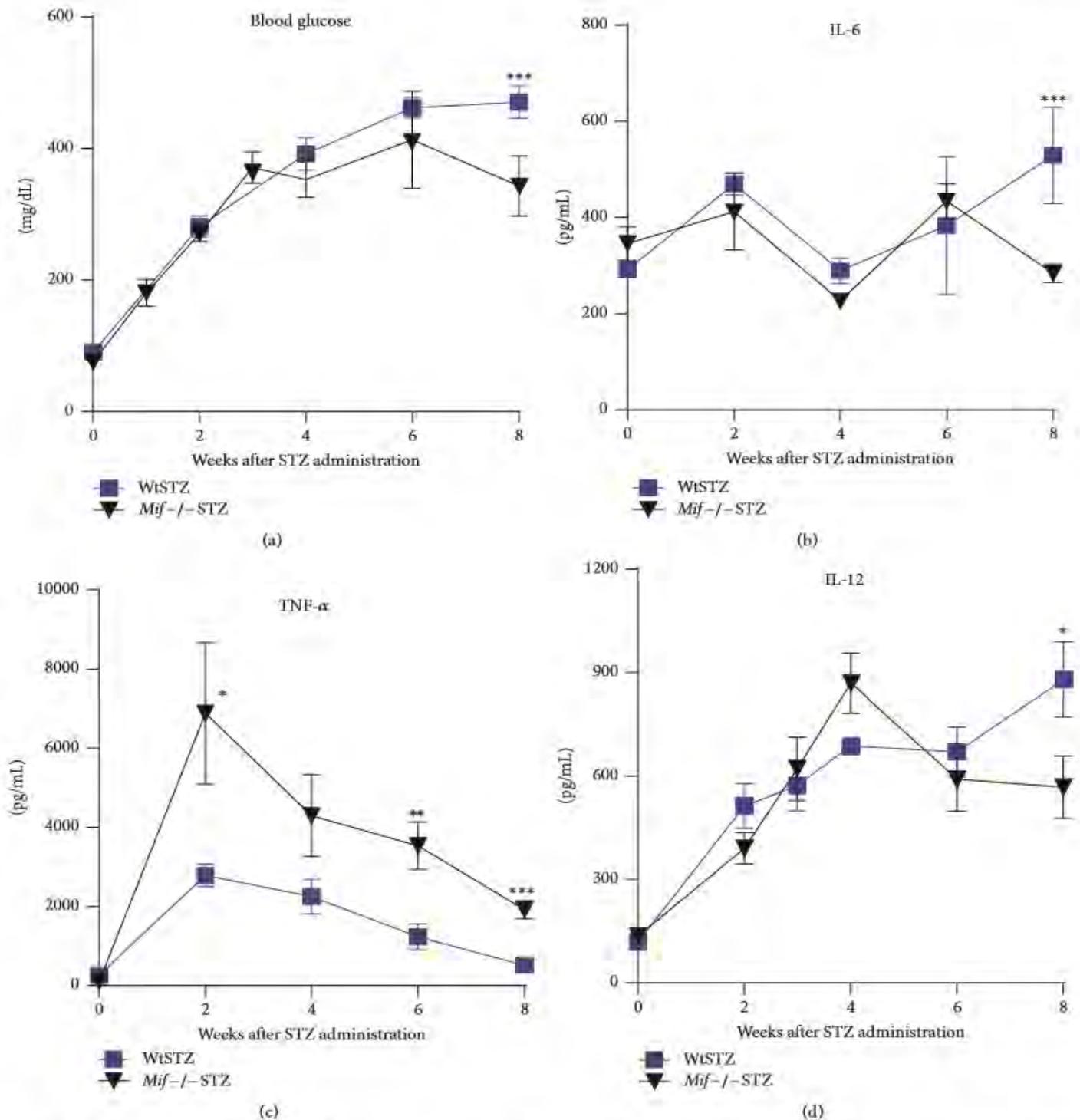


FIGURE 10: After *Mif* reconstitution, proinflammatory cytokine production in *Mif*^{-/-} mice was increased. *Mif* reconstitution was initiated at the same time of STZ administration to Wt (■) or *Mif*^{-/-} mice (▼) until 7 weeks after STZ treatment. The glucose levels (a) and the levels of the inflammatory cytokines IL-6 (b), TNF- α (c), and IL-12 (d) were measured. Control mice receiving vehicle injection did not display significant changes on cytokine production compared to week 0 (data do not shown). The values are expressed as the means \pm SEM of three independent experiments ($n = 8$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, or *** $p < 0.001$, GraphPad Prism software.

In line with the results described above, we observed that both M ϕ (F4/80) and monocytes (CD11b⁺) from WtSTZ were more reactive and had greater ability to induce T lymphocyte-specific proliferation in response to OVA than those from

Mif^{-/-}STZ mice. This finding is consistent with the evidence that proliferation of antigen-specific T cells from TCR-transgenic mice is highly dependent on CD28/CD86 costimulation. Disrupting this interaction dramatically reduces cell

proliferation [62]. This conclusion agrees with the result that blocking CD86 prevents the development of diabetes in NOD mice [63]. Moreover, mutations in the MHC-II molecule lead to development of autoimmune diabetes [64].

By another hand, the differentiation state of M ϕ is an important determinant for T cell response in T1DM. Two major populations have been defined, the classically activated (CA) M ϕ secreting proinflammatory cytokines such as TNF- α , IL-6, and IL-1 β and reactive oxygen species; and alternatively activated (AA) M ϕ which secrete anti-inflammatory factors including TGF- β and IL-10. In T1DM it has been established that CAM ϕ trigger inflammatory responses which initiates insulinitis and pancreatic β cell death, whereas the AAM ϕ decreases hyperglycemia, insulinitis, and inflammation in the pancreas [65].

As Mif is a regulator of many proinflammatory cytokines that are characteristic for the CAM ϕ , Mif has been proposed as CAM ϕ macrophage-polarizing factor [66]. However, there are few and contrary experimental evidences about how Mif might participate in the polarization to AAM ϕ or CAM ϕ . In a mouse model of nonalcoholic fatty liver disease M ϕ in liver from *Mif*^{-/-} mice were skewed toward AAM ϕ [67]. By contrary, in the melanoma mouse model M ϕ -derived Mif participates in AAM ϕ polarization [68]. Moreover, murine Mif and filarial nematode parasite (*Brugia*) Mif protein induced proinflammatory cytokines release. However, Mif also induce upregulation of IL-4 on bone marrow-derived mouse M ϕ , which when treated *in vitro* with Mif and IL-4 induce AAM ϕ [69]. Here, we show that M ϕ from *Mif*^{-/-}STZ mice display reduced proinflammatory cytokine production and exhibit reduced ability to induce T lymphocyte proliferation in response to OVA. It is possible that Mif deficiency influences on AAM ϕ polarization in this model; however, more experiments are necessary to establish this.

5. Conclusions

We show for the first time a role of Mif in promoting costimulatory molecule expression in M ϕ and DC in T1DM. These results reveal Mif as a key regulator of proinflammatory function and M ϕ and DC activation in T1DM. Although more specific experiments are required, there is no doubt that Mif represents a potential target for anti-Mif therapy, which might attenuate the autoimmune process in T1DM.

Competing Interests

The authors have no conflicting financial or commercial interests.

Acknowledgments

This study is part of the work of Yuriko Itzel Sánchez-Zamora to obtain a Ph.D. degree in the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), and she received a Fellowship (no. 349680) from CONACYT. The authors thank Dr. J. de D. Ruiz-Rosado and Nikhil Reddy for critically reading this paper (Nationwide Children's Hospital, OSU, USA). This work

was supported by Grant IN212215 from PAPIIT (DGAPA, UNAM, México) and by Grant 152224 from CONACYT to Miriam Rodríguez-Sosa.

References

- [1] F. S. Malik and C. E. Taplin, "Insulin therapy in children and adolescents with type 1 diabetes," *Pediatric Drugs*, vol. 16, no. 2, pp. 141–150, 2014.
- [2] American Diabetes Association, "Diagnosis and classification of diabetes mellitus," *Diabetes Care*, vol. 37, supplement 1, pp. S81–S90, 2013.
- [3] S. Canivell and R. Gomis, "Diagnosis and classification of autoimmune diabetes mellitus," *Autoimmunity Reviews*, vol. 13, no. 4–5, pp. 403–407, 2014.
- [4] A. Willcox, S. J. Richardson, A. J. Bone, A. K. Foulis, and N. G. Morgan, "Analysis of islet inflammation in human type 1 diabetes," *Clinical & Experimental Immunology*, vol. 155, no. 2, pp. 173–181, 2009.
- [5] M. E. Craig, S. Nair, H. Stein, and W. D. Rawlinson, "Viruses and type 1 diabetes: a new look at an old story," *Pediatric Diabetes*, vol. 14, no. 3, pp. 149–158, 2013.
- [6] A. Salvatoni, A. Baj, G. Bianchi, G. Federico, M. Colombo, and A. Toniolo, "Intrafamilial spread of enterovirus infections at the clinical onset of type 1 diabetes," *Pediatric Diabetes*, vol. 14, no. 6, pp. 407–416, 2013.
- [7] G. Afonso and R. Mallone, "Infectious triggers in type 1 diabetes: is there a case for epitope mimicry?" *Diabetes, Obesity and Metabolism*, vol. 15, supplement 3, pp. 82–88, 2013.
- [8] Å. Lernmark and C.-D. Agardh, "Immunomodulation with human recombinant autoantigens," *Trends in Immunology*, vol. 26, no. 11, pp. 608–612, 2005.
- [9] M. Pearl-Yafe, A. Kaminitz, E. S. Yolcu, I. Yaniv, J. Stein, and N. Askenasy, "Pancreatic islets under attack: cellular and molecular effectors," *Current Pharmaceutical Design*, vol. 13, no. 7, pp. 749–760, 2007.
- [10] Y. Dogan, S. Akarsu, B. Ustundag, E. Yilmaz, and M. K. Gurgoze, "Serum IL-1 β , IL-2, and IL-6 in insulin-dependent diabetic children," *Mediators of Inflammation*, vol. 2006, Article ID 59206, 6 pages, 2006.
- [11] B. Baumann, H. H. Salem, and B. O. Boehm, "Anti-inflammatory therapy in type 1 diabetes," *Current Diabetes Reports*, vol. 12, no. 5, pp. 499–509, 2012.
- [12] C. Y. Westwell-Roper, J. A. Ehses, and C. B. Verchere, "Resident macrophages mediate islet amyloid polypeptide-induced islet IL-1 β production and β -cell dysfunction," *Diabetes*, vol. 63, no. 5, pp. 1698–1711, 2014.
- [13] T. Mandrup-Poulsen, L. Pickersgill, and M. Y. Donath, "Blockade of interleukin 1 in type 1 diabetes mellitus," *Nature Reviews Endocrinology*, vol. 6, no. 3, pp. 158–166, 2010.
- [14] T. Mandrup-Poulsen, "Interleukin-1 antagonists and other cytokine blockade strategies for type 1 diabetes," *Review of Diabetic Studies*, vol. 9, no. 4, pp. 338–347, 2012.
- [15] X.-L. Zou, Z.-Y. Zhao, Y.-Y. Wan, Z.-Q. Su, and M. Xiang, "Diabetogenic T cells induce autoimmune diabetes in BALB/c mice," *Chinese Medical Sciences Journal*, vol. 23, no. 2, pp. 88–94, 2008.
- [16] J. Myśliwska, M. Smardzewski, N. Marek-Trzonkowska, M. Myśliwiec, and K. Raczyńska, "Expansion of CD14⁺CD16⁺ monocytes producing TNF- α in complication-free diabetes type 1 juvenile onset patients," *Cytokine*, vol. 60, no. 1, pp. 309–317, 2012.

- [17] M. Rachmiel, O. Bloch, A. A. Shaul et al., "Young patients with both type 1 diabetes mellitus and asthma have a unique IL-12 and IL-18 secretory pattern," *Pediatric Diabetes*, vol. 12, no. 7, pp. 596–603, 2011.
- [18] A. E. Altinova, D. Engin, E. Akbay et al., "Association of polymorphisms in the IL-18 and IL-12 genes with susceptibility to type 1 diabetes in Turkish patients," *Journal of Endocrinological Investigation*, vol. 33, no. 7, pp. 451–454, 2010.
- [19] P. Hanifi-Moghaddam, N. C. Schloot, S. Kappler, J. Seifler, and H. Kolb, "An association of autoantibody status and serum cytokine levels in type 1 diabetes," *Diabetes*, vol. 52, no. 5, pp. 1137–1142, 2003.
- [20] J. Bojunga, K. Kusterer, M. Bacher, R. Kurek, K.-H. Usadel, and H. Renneberg, "Macrophage migration inhibitory factor and development of type-1 diabetes in non-obese diabetic mice," *Cytokine*, vol. 21, no. 4, pp. 179–186, 2003.
- [21] I. Cvetkovic, Y. Al-Abed, D. Miljkovic et al., "Critical role of macrophage migration inhibitory factor activity in experimental autoimmune diabetes," *Endocrinology*, vol. 146, no. 7, pp. 2942–2951, 2005.
- [22] S. Stosic-Grujicic, I. Stojanovic, D. Maksimovic-Ivanic et al., "Macrophage migration inhibitory factor (MIF) is necessary for progression of autoimmune diabetes mellitus," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 215, no. 3, pp. 665–675, 2008.
- [23] Y. I. Sánchez-Zamora and M. Rodríguez-Sosa, "The role of MIF in type 1 and type 2 diabetes mellitus," *Journal of Diabetes Research*, vol. 2014, Article ID 804519, 6 pages, 2014.
- [24] I. Stojanovic, T. Sakaida, I. Nibolic, E. Nicolatti, and S. Stosic-Grujicic, "Macrophage migration inhibitory factor deficiency protects pancreatic islets from cytokine-induced apoptosis in vitro," *Clinical and Experimental Immunology*, vol. 169, no. 2, pp. 156–163, 2012.
- [25] T. Roger, M. P. Glauser, and T. Calandra, "Macrophage migration inhibitory factor (MIF) modulates innate immune responses induced by endotoxin and Gram-negative bacteria," *Journal of Endotoxin Research*, vol. 7, no. 6, pp. 456–460, 2001.
- [26] S. N. Babu, G. Chetal, and S. Kumar, "Macrophage migration inhibitory factor: a potential marker for cancer diagnosis and therapy," *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, vol. 13, no. 5, pp. 1737–1744, 2012.
- [27] J. Nishihira, "Molecular function of macrophage migration inhibitory factor and a novel therapy for inflammatory bowel disease," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 1271, no. 1, pp. 53–57, 2012.
- [28] J. Nishihira and K. Mitsuyama, "Overview of the role of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in inflammatory bowel disease," *Current Pharmaceutical Design*, vol. 15, no. 18, pp. 2104–2109, 2009.
- [29] L. L. Santos and E. F. Morand, "Macrophage migration inhibitory factor: a key cytokine in RA, SLE and atherosclerosis," *Clinica Chimica Acta*, vol. 399, no. 1-2, pp. 1–7, 2009.
- [30] Z. Szekanecz, T. Besenyi, Á. Szentpétery, and A. E. Koch, "Angiogenesis and vasculogenesis in rheumatoid arthritis," *Current Opinion in Rheumatology*, vol. 22, no. 3, pp. 299–306, 2010.
- [31] O. M. Finucane, C. M. Reynolds, F. C. McGillicuddy, and H. M. Roche, "Insights into the role of macrophage migration inhibitory factor in obesity and insulin resistance," *Proceedings of the Nutrition Society*, vol. 71, no. 4, pp. 622–633, 2012.
- [32] R. Kleemann and R. Bucala, "Macrophage migration inhibitory factor: critical role in obesity, insulin resistance, and associated comorbidities," *Mediators of Inflammation*, vol. 2010, Article ID 610479, 7 pages, 2010.
- [33] C. Toso, J. A. Emamaullee, S. Merani, and A. M. J. Shapiro, "The role of macrophage migration inhibitory factor on glucose metabolism and diabetes," *Diabetologia*, vol. 51, no. 11, pp. 1937–1946, 2008.
- [34] J. Nishihira, "Novel pathophysiological aspects of macrophage migration inhibitory factor (review)," *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 2, no. 1, pp. 17–28, 1998.
- [35] Y. Sanchez-Zamora, L. I. Terrazas, A. Vilches-Flores et al., "Macrophage migration inhibitory factor is a therapeutic target in treatment of non-insulin-dependent diabetes mellitus," *The FASEB Journal*, vol. 24, no. 7, pp. 2583–2590, 2010.
- [36] G. Grieb, M. Merk, J. Bernhagen, and R. Bucala, "Macrophage Migration Inhibitory Factor (MIF): a promising biomarker," *Drug News and Perspectives*, vol. 23, no. 4, pp. 257–264, 2010.
- [37] M. Leech, C. Metz, P. Hall et al., "Macrophage migration inhibitory factor in rheumatoid arthritis: evidence of proinflammatory function and regulation by glucocorticoids," *Arthritis and Rheumatism*, vol. 42, no. 8, pp. 1601–1608, 1999.
- [38] S. Onodera, H. Tanji, K. Suzuki et al., "High expression of macrophage migration inhibitory factor in the synovial tissues of rheumatoid joints," *Cytokine*, vol. 11, no. 2, pp. 163–167, 1999.
- [39] J. Yun, C.-T. Xu, and B.-R. Pan, "Epidemiology and gene markers of ulcerative colitis in the Chinese," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 15, no. 7, pp. 788–803, 2009.
- [40] P. W. Laird, A. Zijderveld, K. Linders, M. A. Rudnicki, R. Jaenisch, and A. Berns, "Simplified mammalian DNA isolation procedure," *Nucleic Acids Research*, vol. 19, no. 15, article 4293, 1991.
- [41] M. L. Lukic, S. Stošic-Grujicic, and A. Shahin, "Effector mechanisms in low-dose streptozotocin-induced diabetes," *Developmental Immunology*, vol. 6, no. 1-2, pp. 119–128, 1998.
- [42] M. A. K. Markwell, S. M. Haas, L. L. Bieber, and N. E. Tolbert, "A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples," *Analytical Biochemistry*, vol. 87, no. 1, pp. 206–210, 1978.
- [43] E. E. Hillhouse, R. Collin, G. Chabot-Roy et al., "Nearby construction impedes the progression to overt autoimmune diabetes in NOD mice," *Journal of Diabetes Research*, vol. 2013, Article ID 620313, 7 pages, 2013.
- [44] D. S. Li, Y. Yuan, H. Tu, Q. Liang, and L. Dai, "A protocol for islet isolation from mouse pancreas," *Nature Protocols*, vol. 4, no. 11, pp. 1649–1652, 2009.
- [45] A. M. Ortiz-Flores, Y. Ledesma-Soto, E. A. Calleja, M. Rodríguez-Sosa, I. Juárez, and L. I. Terrazas, "*Taenia crassiceps* infection does not influence the development of experimental rheumatoid arthritis," *BioMed Research International*, vol. 2013, Article ID 316980, 9 pages, 2013.
- [46] L. Yu, D. T. Robles, N. Abiru et al., "Early expression of anti-insulin autoantibodies of humans and the NOD mouse: evidence for early determination of subsequent diabetes," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 4, pp. 1701–1706, 2000.
- [47] A. K. Steck, K. Johnson, K. J. Barriga et al., "Age of islet autoantibody appearance and mean levels of insulin, but not GAD or IA-2 autoantibodies, predict age of diagnosis of type 1 diabetes: diabetes autoimmunity study in the young," *Diabetes Care*, vol. 34, no. 6, pp. 1397–1399, 2011.
- [48] S. Rex, S. Kraemer, G. Grieb et al., "The role of macrophage migration inhibitory factor in critical illness," *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, vol. 14, no. 14, pp. 1116–1124, 2014.

- [49] J. D. D. Rosado and M. Rodriguez-Sosa, "Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a key player in protozoan infections," *International Journal of Biological Sciences*, vol. 7, no. 9, pp. 1239–1256, 2011.
- [50] K. Kim and H. Kim, "Macrophage migration inhibitory factor: a potential therapeutic target for rheumatoid arthritis," *The Korean Journal of Internal Medicine*, vol. 31, no. 4, pp. 634–642, 2016.
- [51] C. Pflieger, N. C. Schloot, M. D. Brendel et al., "Circulating cytokines are associated with human islet graft function in type 1 diabetes," *Clinical Immunology*, vol. 138, no. 2, pp. 154–161, 2011.
- [52] H. Kolb, "Mouse models of insulin dependent diabetes: low-dose streptozocin-induced diabetes and nonobese diabetic (NOD) mice," *Diabetes/Metabolism Reviews*, vol. 3, no. 3, pp. 751–778, 1987.
- [53] A. K. Steck, K. Vehik, E. Bonifacio et al., "Predictors of progression from the appearance of islet autoantibodies to early childhood diabetes: the Environmental Determinants of Diabetes in the Young (TEDDY)," *Diabetes Care*, vol. 38, no. 5, pp. 808–813, 2015.
- [54] G. Waeber, T. Calandra, R. Roduit et al., "Insulin secretion is regulated by the glucose-dependent production of islet β cell macrophage migration inhibitory factor," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 94, no. 9, pp. 4782–4787, 1997.
- [55] G. Waeber, T. Calandra, C. Bonny, and R. Bucala, "A role for the endocrine and pro-inflammatory mediator MIF in the control of insulin secretion during stress," *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, vol. 15, no. 1, pp. 47–54, 1999.
- [56] N. G. Morgan, P. Leete, A. K. Foulis, and S. J. Richardson, "Islet inflammation in human type 1 diabetes mellitus," *IUBMB Life*, vol. 66, no. 11, pp. 723–734, 2014.
- [57] E. P. C. van der Vorst, Y. Döring, and C. Weber, "Chemokines and their receptors in Atherosclerosis," *Journal of Molecular Medicine*, vol. 93, no. 9, pp. 963–971, 2015.
- [58] D. L. Eizirik, M. L. Colli, and F. Ortis, "The role of inflammation in insulinitis and β -cell loss in type 1 diabetes," *Nature Reviews Endocrinology*, vol. 5, no. 4, pp. 219–226, 2009.
- [59] A. B. Stavitsky and J. Xianli, "In vitro and in vivo regulation by macrophage migration inhibitory factor (MIF) of expression of MHC-II, costimulatory, adhesion, receptor, and cytokine molecules," *Cellular Immunology*, vol. 217, no. 1-2, pp. 95–104, 2002.
- [60] C. A. Terrazas, E. Huitron, A. Vazquez et al., "MIF synergizes with *Trypanosoma cruzi* antigens to promote efficient dendritic cell maturation and IL-12 production via p38 MAPK," *International Journal of Biological Sciences*, vol. 7, no. 9, pp. 1298–1310, 2011.
- [61] J. de Dios Ruiz-Rosado, J. E. Olguín, I. Juárez-Avelar et al., "MIF promotes classical activation and conversion of inflammatory Ly6C^{high} monocytes into tipdcs during murine toxoplasmosis," *Mediators of Inflammation*, vol. 2016, Article ID 9101762, 18 pages, 2016.
- [62] B. Salomon and J. A. Bluestone, "Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation," *Annual Review of Immunology*, vol. 19, pp. 225–252, 2001.
- [63] D. J. Lenschow, S. C. Ho, H. Sattar et al., "Differential effects of anti-B7-1 and anti-B7-2 monoclonal antibody treatment on the development of diabetes in the nonobese diabetic mouse," *Journal of Experimental Medicine*, vol. 181, no. 3, pp. 1145–1155, 1995.
- [64] J. J. Racine, M. Zhang, M. Wang, W. Morales, C. Shen, and D. Zeng, "MHC-mismatched mixed chimerism mediates thymic deletion of cross-reactive autoreactive T cells and prevents insulinitis in nonobese diabetic mice," *The Journal of Immunology*, vol. 194, no. 1, pp. 407–417, 2015.
- [65] A. Espinoza-Jiménez, A. N. Peón, and L. I. Terrazas, "Alternatively activated macrophages in types 1 and 2 diabetes," *Mediators of Inflammation*, vol. 2012, Article ID 815953, 10 pages, 2012.
- [66] B.-S. Kim, N. Pallua, J. Bernhagen, and R. Bucala, "The macrophage migration inhibitory factor protein superfamily in obesity and wound repair," *Experimental and Molecular Medicine*, vol. 47, article e161, 2015.
- [67] D. Heinrichs, M.-L. Berres, M. Coeuru et al., "Protective role of macrophage migration inhibitory factor in nonalcoholic steatohepatitis," *The FASEB Journal*, vol. 28, no. 12, pp. 5136–5147, 2014.
- [68] K. Yaddanapudi, K. Putty, B. E. Rendon et al., "Control of tumor-associated macrophage alternative activation by macrophage migration inhibitory factor," *The Journal of Immunology*, vol. 190, no. 6, pp. 2984–2993, 2013.
- [69] L. Prieto-Lafuente, W. F. Gregory, J. E. Allen, and R. M. Maizels, "MIF homologues from a filarial nematode parasite synergize with IL-4 to induce alternative activation of host macrophages," *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 85, no. 5, pp. 844–854, 2009.

APÉNDICE 3

Soluciones, medios de cultivo, buffers y técnicas complementarias.

Buffer de citratos (10 ml)

Citrato de sodio ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$) al 0.05M

0.147 gr de citrato de sodio

10 ml de S.S. estéril.

Ajustar el pH a 4.5 con ácido cítrico 0.1M

Buffer de FACS

1L de PBS

50 ml de FBS

0.05gr de Azida de sodio (NaN_3 SIGMA)

Gradiente de Ficoll

Preparar un STOCK de Ficoll al 27% (10.8 gr de ficoll en 29.2 ml de solución de Hanks complementado)

Ficoll al 23%. Mezclar 1.6 ml de solución de Hanks complementado con 8.4 ml de ficoll al 27%.

Ficoll al 20%. Mezclar 2.4 ml de solución de Hanks complementado con 7.6 ml de ficoll al 27%.

Ficoll al 11%. Mezclar 6 ml de solución de Hanks complementado con 4 ml de ficoll al 27%.

Gel de agarosa (30ml)

0.45 gr de agarosa

30 ml de TBE

6 µl de Bromuro de Etidio (Sigma-Aldrich Química, S. de R. L. de C.V.)

Medio DMEM complementado al 10%

1L de medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) Gibco ®

5 ml de antibiótico estéril

10 ml de FBS estéril

PBS (1L)

8.00gr Cloruro de sodio (NaCl)

0.20gr Fosfato de sodio monobásico (KH₂PO₄)

1.15gr Fosfato de disodio (Na₂HPO₄)

0.20gr Cloruro de potasio (KCl)

Aforar a 1L con ddH₂O

PBS-BSA al 1 %

1 gr de BSA en 100 ml de PBS

PBS-Tween 20 (0.5%)

0.5 ml de tween 20 en 1L de PBS

Solución hemolizante (100 ml)

Solución A) Cloruro de amonio (CINH_4 , $\text{PM} = 53.49 \text{ g/mol}$) al 0.16M

1. 0.87gr de cloruro de amonio
2. 100 ml de agua destilada

Solución B) Tris base ($(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$ $\text{PM} = 121.14\text{g/mol}$) al 0.17M

1. 2.05 gr de tris base
2. 100 ml de agua destilada

Tomar 8 partes de solución A más 2 partes de solución B y ajustar el pH a 7.4

Solución de Hanks GIBCO ® (500 ml)

500 μL de antibiótico

12.5 ml de albúmina

Solución de digestión de páncreas

0.3 mg de colagenasa (SIGMA- ALDRICH) por ml de medio DMEM al 10% (1 ml de solución de digestión por cada páncreas extraído).

Solución de dispersión de islotes pancreáticos

0.3 mg de tripsina (SIGMA- ALDRICH) en 1 ml de medio DMEM

TBE (1L)

10.8 gr de tris base (HOCH₂)₃CNH₂.

5.5 gr de ácido bórico (H₃BO₃).

4 ml de EDTA (C₁₀H₁₆N₂O₈) al 0.5M

Aforar a 1L con ddH₂O

Buffer de citratos para recuperación antigénica

Solución A. Ácido cítrico 0.1M ----- 19.21gr en un litro de dH₂O.

Solución B. Citrato de sodio ----- 25.81 gr en un litro de dH₂O

Mezclar 9.5 ml de solución A con 41.5 ml de solución y aforar a 100 ml con dH₂O.

Solución bloqueadora de glicina

Glicina al 0.1M (0.75 gr de glicina en 100 ml de PBS).

Inmunohistoquímica para insulina, glucagón y GLUT-2

1. Desparafinar el tejido a 60°C durante 20 minutos.
2. Lavar la laminilla con agua corriente directamente del chorro.
3. Hidratar el tejido con el método siguiente:
 - Xilol 100% --- 10 minutos
 - Alcohol 96% --- 5 minutos
 - Alcohol 70% --- 5 minutos
 - Alcohol 50% --- 5 minutos
 - H₂O dd con 0.1% de H₂O₂ --- 15 minutos
4. Lavar con PBS 1X
5. Lavar con TBS 1X
6. Solución perforante bloqueadora 1hr
 - SNC 2%
 - Tritón 0.3%
 - TBS 1X
7. Lavar con TBS 1X
8. Incubar con el anticuerpo α insulina/ glucagón/ GLUT-2 a T° ambiente durante 4 hrs en cámara húmeda o a 4°C toda la noche en cámara húmeda (1:2000).
9. Lavar con TBS 1X
10. Incubar con Ac α cobayo conjugado con biotina 1:100 en TBS 1X, SNC 1% durante 1 hr 30 min a T° ambiente en cámara húmeda.

11. Preparar el complejo Avidina-biotina enzima estatina (ABC kit elite, Vector Laboratory)
12. Lavar con TBS 1X
13. Incubar con el complejo avidina-biotina durante 1 hr a temperatura ambiente en cámara húmeda
14. Lavar con TBS1X
15. Agregar DAB (10ml TBS 1X, 100 μ l de H₂O₂ y una tableta de DAB) hasta obtener la coloración deseada.

Cuantificación de proteínas por el método de Lowry

Se preparan en el omento las siguientes soluciones:

A: Carbonato de sodio al 2% en NaOH 0.1 M

B: Sulfato cúprico al 1%

C: Tartrato sódico-potásico al 2%

D: Albúmina (1mg/ ml)

En el momento de su uso se mezclan 50ml de A con 0.5 ml de B y 0.5 ml de C.

Se debe contar con Reactivo de fenoles de Folin-Ciocalteau en el momento y diluirlo en una proporción de 1:2 con agua destilada.

Preparación de la curva de calibración

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
Albúmina (ml)	0.0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
Agua (ml)	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0.0
Reactivo de Lowry	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0

Añadir 400 μ l de reactivo FOLIN a cada tubo incluyendo los tubos problema y dejar reposar alrededor de 15 minutos hasta obtener una coloración azul.

Posteriormente, leer las muestras en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 260/ 280nm.

Inmunofluorescencia directa (utilizando anticuerpos de superficie para citometría de flujo)

1. Extraer el tejido y fijarlo toda la noche en paraformaldehído al 4%.
2. Sacar el tejido y enjuagar con agua corriente por dos horas u ponerlo en un crioprotector.
3. Colocar el tejido en:
sacarosa al 10% durante dos horas
Sacarosa al 20% durante dos horas
Sacarosa al 30% durante dos horas
4. Incluir el tejido en Tissu-tek y congelarlos en nitrógeno líquido o acetona con hielo seco.
5. Hacer cortes en el criostato de 3-5 micras y colocar los cortes sobre porta objetos tratados con Poly- L- lisina.
6. Lavar con PBS hasta que se quite por completo el Tissu-Tek.
7. Hacer recuperación antigénica con buffer de citratos en olla de presión (un minuto, máximo 5 a temperatura máxima).
8. Enfriar en hielo.
9. Lavar con PBS.
10. Poner una hora en solución bloqueadora de glicina.
11. Poner el Ac en una dilución 1:100
12. Dejar en cámara húmeda toda la noche.
13. Lavar con PBS.
14. Montar.