



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**INMUNOTERAPIA BASADA EN MACRÓFAGOS M2 PARA EL TRATAMIENTO DE LA
INTOLERANCIA A LA GLUCOSA EN UN MODELO MURINO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MED. CIR. VEGA GALAVIZ DIANA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

DR. EUSTACIO GALILEO ESCOBEDO GONZÁLEZ
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO "DR. EDUARDO LICEAGA"

COMITÉ TUTOR:

DR. JOSÉ MANUEL FRAGOSO LONA
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA-IGNACIO CHÁVEZ
DR. RAFAEL VILLALOBOS MOLINA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

CD. MX., ENERO, 2019



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA

**INMUNOTERAPIA BASADA EN MACRÓFAGOS M2 PARA EL TRATAMIENTO DE LA
INTOLERANCIA A LA GLUCOSA EN UN MODELO MURINO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MED. CIR. VEGA GALAVIZ DIANA

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS:

DR. EUSTACIO GALILEO ESCOBEDO GONZÁLEZ
HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO "DR. EDUARDO LICEAGA"

COMITÉ TUTOR:

DR. JOSÉ MANUEL FRAGOSO LONA
INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA-IGNACIO CHÁVEZ
DR. RAFAEL VILLALOBOS MOLINA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

MÉXICO, CD. MX., ENERO, 2019



OFICIO CPCB/1175/2018

Asunto: Oficio de Jurado para Examen de Grado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Evolutiva y Sistemática del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 26 de noviembre de 2018, aprobó el siguiente jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **VEGA GALAVIZ DIANA** con número de cuenta **102001130**, con la tesis titulada **"INMUNOTERAPIA BASADA EN MACRÓFAGOS M2 PARA EL TRATAMIENTO DE LA INTOLERANCIA A LA GLUCOSA EN UN MODELO MURINO"**, realizada bajo la dirección del **DR. EUSTACIO GALILEO ESCOBEDO GONZÁLEZ**:

Presidente: DR. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDÉS
Vocal: DRA. GLORIA EUGENIA QUEIPO GARCÍA
Secretario: DR. RAFAEL VILLALOBOS MOLINA
Suplente: DRA. SONIA ANDREA LEÓN CABRERA
Suplente: DR. JULIO CÉSAR CARRERO SÁNCHEZ

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

"RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd, Mx., a 05 de diciembre de 2018


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA
COORDINADOR DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por formarme como Maestra en Ciencias. Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo recibido mediante el otorgamiento de la beca número 696944. Además doy las gracias a los estimados miembros de mi comité tutorial, Dr. Galileo Escobedo, Dr. José Manuel Fragoso Lona y al Dr. Rafael Villalobos Molina por su paciencia, su comprensión, su apoyo y sus valiosos consejos durante una de las etapas más formativas y emocionantes de mi vida académica.

AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL

Quiero agradecer enorme e infinitamente al Dr. Ortiz Freyre por acompañarme en mi camino, por enseñarme a elegir mis batallas y porque cada visita con usted se convierte en una lección de vida.

A la Dra. Alejandra Guerrero porque cuando veía un futuro incierto no se dio por vencida y buscó una solución a los males que en ese entonces padecía.

A Erika, a mi madrina Abelina, mi tía Rafaela y mi tía Beatriz porque sé que estarán con nosotros aún en los malos momentos.

A Azul Fernanda por enseñarme lo hermoso que es ser tía, por cierto Fer, ¡yo te quiero más!

A mis queridas amigas Alba, Fany, Gina, Marce, Nat por crecer conmigo en esto de la medicina.

A Diana Liz, Adra y Dafne por ser partícipes del proyecto de mi maestría, se volvieron en unas de las personas más importantes de mi vida.

A todos mis compañeros de laboratorio. A ti Israel por enseñarme todo lo que sé hasta ahora del laboratorio, a Yunuel por cuidar de mis ratoncitos como si fueran tuyos y finalmente a Camilo por invitarme a realizar el servicio social en la Unidad de Medicina Experimental.

A mis hermanos Pedro y Sarahí por ser mi conciencia, sé que a veces me gusta romper las reglas pero siempre están para recordarme que no puedo hacer lo que se me venga en gana.

A ti mi mamá, por apoyarme siempre en las más locas y a veces insensatas decisiones que tomé y sobre todo por permitirme ir a la estancia, tu apoyo económico fue el que me ayudo a lanzarme a la aventura. Mamita gracias por ser el ejemplo de lucha por nuestros ideales y por las lecciones que nos das, no sólo de discurso sino de acción. Por último, es increíble tener a alguien con quien discutir el libro que leí y que gracias a ti lo leí y sobre todo por enseñarme que la literatura es de lo más bello que puedo disfrutar día tras día.

A mi papá, tú además de apoyarme en las más locas, insensatas y a veces inalcanzables ideas me acompañas en cada paso para realizarlas, sé papá que quieres ser mi apoyo por siempre y lo aprecio muchísimo porque eso me ha ayudado no temer en ponerme objetivos cada vez más altos. Y lo que más te agradezco es tu pasión por la ciencia e inculcarnos el interés desde pequeños, fue esencial para que creciera cuestionándome todo lo que vivía. Sabes que en realidad este grado es tuyo y lo hice para ti.

DEDICATORIA

Para mi amada familia y
mi Nabuko, te extrañaré por siempre

Del mito

...Alguien me habló todos los días de mi vida

al oído, despacio, lentamente.

Me dijo: ¡vive, vive, vive!

Era la muerte.

Jaime Sabines.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|--|-----------|
| 1. RESUMEN | 1 |
| 2. ABSTRACT | 3 |
| 3 .INTRODUCCIÓN | 5 |
| 3.1 La intolerancia a la glucosa como problema de salud pública | 6 |
| 3.1.2 Fisiopatología de la intolerancia a la glucosa | 8 |
| 3.2 La diversificación fenotípica de los macrófagos y su función en los procesos inflamatorios..... | 11 |
| 3.3 Los macrófagos como agentes promotores de la inflamación en la intolerancia a la glucosa..... | 17 |
| 3.3.1 El desbalance de macrófagos M1 y M2 en la obesidad asociada a la intolerancia a la glucosa | 20 |
| 3.3.2 La administración de macrófagos M2 en procesos inflamatorios | 26 |
| 3.4 La respuesta inflamatoria como factor promotor de la resistencia a la insulina en la intolerancia a la glucosa | 27 |
| 3.4.1 Vía de señalización de la insulina IRS-1/PKC/Akt | 31 |
| 3.5 La estreptozotocina como agente inductor de intolerancia a la glucosa | 32 |
| 4. HIPÓTESIS | 34 |
| 5. OBJETIVO GENERAL..... | 35 |
| 6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 36 |
| 7. ANTECEDENTES Y PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA..... | 37 |
| 8. METODOLOGÍA | 39 |
| 8.1 Generación de un modelo murino con intolerancia a la glucosa. | 39 |

| | |
|---|-----------|
| 8.2 Cultivo y diferenciación de monocitos a macrófagos | 40 |
| 8.3 Evaluación de marcadores fenotípicos de macrófagos murinos | 41 |
| 8.4 Administración de macrófagos anti-inflamatorios M2 en los ratones con intolerancia a la glucosa..... | 42 |
| 9. RESULTADOS..... | 43 |
| 9.1 Características corporales y metabólicas de los ratones obesos con intolerancia a la glucosa..... | 43 |
| 9.2 Cambios morfológicos en la diferenciación de macrófagos murinos | 47 |
| 9.3 Marcadores inmunofenotípicos de macrófagos murinos..... | 48 |
| 9.4 Características corporales y metabólicas en los ratones obesos con intolerancia a la glucosa tratados con macrófagos M2. | 52 |
| 10. DISCUSIÓN | 56 |
| 11. CONCLUSIONES | 62 |
| 12. PERSPECTIVAS..... | 63 |
| 13. LITERATURA CITADA | 64 |
| 14. APÉNDICE A. Capítulo de Libro..... | 70 |
| | 71 |
| 15. APÉNDICE B. Congresos..... | 72 |
| 16. APÉNDICE C. Estancia de investigación..... | 73 |
| 17. APÉNDICE D. Distinciones no CONACYT..... | 82 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Mecanismos que Promueven la Resistencia a la Insulina..... | 10 |
| Figura 2. La Diferenciación de Monocitos a Macrófagos..... | 13 |
| Figura 3. Factores que Promueven la Polarización de Macrófagos y la resistencia a la insulina en el tejido adiposo..... | 15 |
| Figura 4. La Activación de Macrófagos pro-Inflamatorios Contribuye a la Inflamación del Tejido Adiposo y a la Resistencia a la Insulina..... | 20 |
| Figura 5. Regulación de la Sensibilidad a la Insulina. | 23 |
| Figura 6. Modelo Transcripcional de la Activación de Macrófagos anti-Inflamatorios..... | 25 |
| Figura 7. Vía de Señalización Inflamatoria Relacionada en el Desarrollo de la Resistencia a la Insulina..... | 30 |
| Figura 8. Efecto de la Administración de Estreptozotocina (STZ) en la Glucosa Basal de Ratones Alimentados con una HFD. | 44 |
| Figura 9. Curva de Tolerancia a la Glucosa (GTT) Después de 4 Semanas con STZ. | 45 |
| Figura 10. GTT del Modelo Murino de Obesidad con Intolerancia a la Glucosa (IGT)..... | 47 |
| Figura 11. Micrografía de Células Hematopoyéticas en Cultivo in vitro. Estimuladas con Citocinas para la Diferenciación y Activación de Macrófagos. ... | 48 |
| Figura 12. Gráficas de puntos representativos de las poblaciones celulares obtenidas de la médula ósea de ratón. | 49 |
| Figura 13. Gráficos representativos de los análisis realizados en macrófagos F4/80 ⁺ derivados de médula ósea de ratón. | 50 |

| | |
|---|----|
| Figura 14. Gráficos representativos de los análisis realizados en macrófagos CD206 ⁺ derivados de médula ósea de ratón. | 51 |
| Figura 15. Administración de Macrófagos anti-Inflamatorios M2 en Ratones Obesos con IGT como Tratamiento de la Intolerancia a la Glucosa. | 53 |
| Figura 16. Efecto de la Administración de Macrófagos anti-Inflamatorios M2 Sobre el Peso Corporal de Ratones con Intolerancia a la Glucosa.. | 55 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- ADA.** Asociación Americana de Diabetes.
- Akt.** Proteína cinasa B.
- AP-1.** Proteína activadora 1
- aPKC.** Proteínas cinasa C.
- Arg1.** Arginasa 1.
- ATMs.** Adipose tissue macrophages (siglas en inglés).
- ATP.** Adenosín trifosfato.
- CD206.** Cluster of differentiation 206 (siglas en inglés).
- CLSs.** Crown-like structures (siglas en inglés).
- CSF1.** Colony stimulating factor 1 (siglas en inglés).
- CSF1R.** Colony stimulating factor 1 receptor (siglas en inglés).
- CVD.** Cardiovascular disease (siglas en inglés).
- DAMPs.** Endogenous damage-associated molecular patterns (siglas en inglés).
- DM1.** Diabetes Mellitus 1.
- DM2.** Diabetes Mellitus 2.
- EPA.** Eicosapentanoic acid (siglas en inglés).
- EPOC.** Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica
- FFA.** Free fatty acid (siglas en inglés).
- FSC.** Foward Scatter (siglas en inglés).
- GLUT2.** Transportador de glucosa 2.
- GLUT4.** Transportador de glucosa 4.
- GM-CSF.** Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor (siglas en inglés).
- GTT.** Glucose tolerance test (siglas en inglés).
- HbA1c.** Hemoglobina glucosilada.
- HFD.** High fat diet (siglas en inglés).
- HIF.** Hipoxia-inducible factor (siglas en inglés).
- HIF1.** Hipoxia-inducible factor 1 (siglas en inglés).
- HIF2.** Hipoxia-inducible factor 2 (siglas en inglés).
- IFG.** Impaired fasting glucose (siglas en inglés).
- IGT.** Impaired glucose tolerance (siglas en inglés).
- IKK.** Complejo IKK.
- IL-10.** Interleucina 10.
- IL-12.** Interleucina 12.
- IL-13.** Interleucina 13.
- IL-1 β .** Interleucina 1 beta.
- IL-3.** Interleucina 3.
- IL-4.** Interleucina 4.
- IL-6.** Interleucina 6.

IL-8. Interleucina 8.
IMC. Índice de Masa Corporal.
INF- γ . Interferón γ .
IR. Insuline receptor (siglas en inglés).
IRA. Insuficiencia Renal Aguda.
IRA. Insuficiencia Renal Aguda.
IRS, Insulin Receptos Substrate (siglas en inglés).
IRS-1. Insulin Receptor Substrate 1 (siglas en inglés).
IRS-3. Insulin Receptor Substrate 3 (siglas en inglés).
I κ B. Inhibidor de κ B.
JNK. Cinasa c-Jun N-terminal.
LPS. Lipopolisacárido.
M-CSF. Macrophage colony-stimulating factor (siglas en inglés).
Multi-CSF. Multipotential colony-stimulating factor (siglas en inglés).
NF- κ B. Nuclear Factor kappa B (siglas en inglés).
NOS2. Nitric oxide synthase.
OGTT. Oral glucose tolerance test (siglas en inglés).
PAMPs. Pathogen-associated molecular patterns (siglas en inglés).
PDK1. Serina/treonina dependientes de PIK3.
PG. Prostaglandina.
PGC1 β . PPAR γ coactivator 1 β (siglas en inglés).
PI3K. Fosfatidilinositol 3-quinasa.
PIP₂. Fosfatidilinositol 4,5-bifosfato.
PIP₃. Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato.
PPAR γ . Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma (siglas en inglés).
PPAR δ . Peroxisome Proliferator Activated Receptor delta (siglas en inglés).
PRRs. Pattern recognition receptors (siglas en inglés).
PUFAs. Polyunsaturated fatty acids (siglas en inglés).
RI. Resistencia a la insulina.
SSC. Side Scatter (siglas en inglés).
STAT6. Signal transducer and activator of transcription 6 (siglas en inglés).
STZ. Streptozotocin (siglas en inglés).
TGF- β . Transforming growth factor beta (siglas en inglés).
TLR2. Toll-Like Receptor 2 (siglas en inglés).
TLR4. Toll-Like Receptor 4 (siglas en inglés).
TLRs. Toll-like receptors (siglas en inglés).
TNF- α . Tumor Necrosis Factor alfa (siglas en inglés).

1. RESUMEN

La intolerancia a la glucosa (IGT) es un estado intermedio de hiperglucemia que se caracteriza por un aumento en el número de macrófagos pro-inflamatorios M1 en el tejido adiposo de ratones obesos y humanos, disminuyendo además la proporción de macrófagos anti-inflamatorios M2. Los macrófagos M1 producen abundantemente TNF- α que contribuyen a generar resistencia a la insulina, a la hiperglucemia, apoptosis de las células β pancreáticas y finalmente promueve la intolerancia a la glucosa. En el tejido adiposo de ratones de peso normal, los macrófagos M2 secretan IL-10 y con ello aumenta la sensibilidad a la insulina. El objetivo de este estudio fue administrar macrófagos M2 en ratones obesos como tratamiento para la intolerancia a la glucosa. Para generar un modelo de ratón obeso que simula la IGT humana, utilizamos una combinación de dieta alta en grasas (HFD) y estreptozotocina en dosis bajas (STZ). Los macrófagos M2 administrados se obtuvieron de monocitos derivados de la médula ósea y se cultivaron *in vitro* con IL-4 / IL-13. El fenotipo M2 se verificó con CD206 mediante ensayos de citometría de flujo. Los macrófagos M2 (densidad de 7×10^6) se administraron cada tercer día en los ratones por una semana. Los efectos de los macrófagos M2 en la IGT se examinaron con una prueba de tolerancia a la glucosa (GTT). La alimentación con HFD aumentó 50% el peso corporal y las dosis bajas de STZ produjeron una hiperglucemia importante en comparación con los controles. En este modelo de ratón que imita la IGT se administró los macrófagos M2. Los macrófagos cultivados y activados hacia el fenotipo M2 fueron CD206⁺. Los niveles de glucosa medidos con GTT se redujeron en 89% después de la administración de macrófagos M2 CD206⁺, en comparación con los

controles. Estos resultados sugieren que los macrófagos M2 disminuyeron la intolerancia a la glucosa. Además, los ratones obesos no modificaron su peso corporal incluso con el tratamiento de los macrófagos M2. Teniendo en cuenta toda esta información, la proporción de macrófagos M1 y M2 parece tener un desequilibrio en el tejido adiposo que está asociado con mayor secreción de TNF- α y menor de IL-10, lo que aumenta la resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa. Este estudio mostró que la administración de macrófagos M2 en el tejido adiposo disminuyó la IGT en un modelo de ratones obesos que simulaban la IGT. Estos hallazgos pueden abrir nuevas opciones terapéuticas contra el deterioro de la tolerancia a la glucosa mediante el uso de macrófagos anti-inflamatorios M2.

Palabras clave: Intolerancia a la glucosa, Inflamación, Macrófagos M1, Macrófagos M2, Terapia

2. ABSTRACT

Impaired glucose tolerance (IGT) is an intermediate hyperglycemia state characterized by the increased number of pro-inflammatory M1 macrophages in adipose tissue of obese mice and humans, while the number of anti-inflammatory M2 macrophages is reduced. The M1 macrophages overproduce TNF- α and contribute to insulin resistance as well as hyperglycemia, apoptosis of pancreatic β cells and promote IGT. In adipose tissue of lean mice M2 macrophages secrete IL-10 and increase the insulin sensitivity. The aim of this study was to administer M2 macrophages in obese mice as treatment of the IGT. To generate an obese mice model mimicking human IGT, we used a combination of high-fat diet (HFD) and low-dose streptozotocin (STZ). The M2 macrophages administered were obtained from monocytes bone marrow-derived and cultured *in vitro* with IL-4/IL-13. The M2 phenotype was verified with CD206 by flow cytometry. Every other day M2 macrophages (density of 7×10^6) were administered in the mice per a week. The effects of M2 macrophages on IGT were examined with a glucose tolerance test (GTT). HFD feeding increased 50 % of body weight and subsequent low-dose STZ led a substantial hyperglycemia compared with controls. In this mouse model mimicking IGT has been administered M2 macrophages. The macrophages cultured and activated towards M2 phenotype were CD206⁺. The glucose levels measured with GTT reduced 89% after the administration of M2 macrophages CD206⁺ compared with controls. These results suggest that M2 macrophages decreased the IGT. In addition the obese mice was not modified their body weight even with M2 macrophages treatment. Taking all this information into account, macrophage M1 and M2 ratio seems to have an unbalance in adipose tissue which

is associated with secretion of TNF- α and lower IL-10 thus increased of insulin resistance and IGT. The current study demonstrated that M2 macrophages administration in adipose tissue decreased IGT in a mice obese model mimicking IGT. This study may open new therapeutic options against impaired glucose tolerance by using anti-inflammatory M2 macrophages.

Keywords: Impaired glucose tolerance, Inflammation, M1 macrophages, M2 macrophages, Therapy

3 .INTRODUCCIÓN

La prediabetes es un estado intermedio de hiperglucemia con los niveles elevados de glucosa plasmática en ayuno (impaired fasting glucose, IFG por sus siglas en inglés) o glucosa plasmática elevada posprandial (impaired glucose tolerance, IGT por sus siglas en inglés)[1, 2].

La IGT o intolerancia a la glucosa es un estado de transición de normoglucemia a Diabetes Mellitus 2 (DM2), los pacientes con IGT son asintomáticos y sólo son diagnosticados tras realizarse una prueba de tolerancia oral a la glucosa (oral glucose tolerance test, OGTT por sus siglas en inglés)[3]. En un estudio longitudinal se observó que 48% de los sujetos con normoglucemia progresaron a IGT[4], esto sugiere que la IGT es el principal estado de hiperglicemia en que se presenta la prediabetes. Según el Instituto Nacional de Salud Pública, 17.1% de la población mexicana padece prediabetes, lo que eventualmente aumenta el riesgo de padecer DM2 y enfermedades cardiovasculares (cardiovascular disease, CVD por sus siglas en inglés)[5]. La hiperglucemia en la IGT es el resultado de la resistencia a la insulina (RI) y la disfunción de las células β del páncreas, estos son dos efectos fisiopatológicos que también se encuentran en la DM2 pero en mayor severidad[1]. La DM2 se caracteriza por la RI, hiperglucemia crónica, hiperinsulinemia y la disfunción de las células β del páncreas. Hasta 70% de los pacientes que padecen prediabetes eventualmente desarrollarán diabetes, por lo tanto la detección y tratamiento temprano de la IGT es muy importante para evitar la evolución hacia DM2[6].

3.1 La intolerancia a la glucosa como problema de salud pública

La intolerancia a la glucosa o prediabetes es una enfermedad metabólica caracterizada por la elevación de los niveles de glucosa sanguínea en ayuno, sin llegar a los observados en la DM2 (glucosa \geq 126 mg/dl)[7]. En 2015 la Federación Internacional de la Diabetes estimó una prevalencia mundial de 318 millones y se espera que llegue a los 482 millones de personas en el 2040[8]. El Centro para el Control de Enfermedades en los Estados Unidos estimó en 2012 que cerca de 86 millones de personas, o uno de cada tres adultos tenían prediabetes[9]. Sin embargo, el 90% de estos sujetos desconocen su diagnóstico y el tiempo que la han padecido[10].

Recientemente Park y colaboradores encontraron que tras realizar la prueba oral de glucosa a las 2 horas para diagnosticar IGT, los niveles de glucosa entre 180-199mg/dl eran un predictor para desarrollar DM2[11]. Se ha observado que 70% de las personas con IGT desarrollarán DM2, esto sugiere que la hiperglucemia crónica debida a la IGT podría favorecer la progresión a DM2[6]. Por esta razón la Asociación Americana de Diabetes (ADA) recomienda la detección temprana de la prediabetes a través de la realización de una OGTT.

La prueba oral de tolerancia a la glucosa es el método más utilizado y certero para diagnosticar IGT, con una sensibilidad del 81%, consiste en medir la glucosa en ayuno, posteriormente administrar 75gr de glucosa y hacer una segunda medición de glucosa a las 2 horas, si la glucemia es 140-199 mg/dl dan la certeza del diagnóstico de IGT[10]. Otro método diagnóstico utilizado es la cuantificación de la hemoglobina glucosilada (HbA1c), ésta se forma cuando la

glucosa se une al grupo amino-terminal de la subunidad β de la hemoglobina y refleja la hiperglucemia crónica. Se ha observado que el diagnóstico de IGT a través de la cuantificación de los niveles de HbA1c (entre 5.7–6.4%) solo tiene 35% de sensibilidad, lo que sugiere que no es un buen marcador para realizar el diagnóstico de IGT. Interesantemente, los niveles de HbA1c $\geq 6.5\%$ están directamente relacionados con complicaciones cardiovasculares, por lo que podría ser utilizada como predictor de CVD [5, 10]. A pesar de observar en la IGT niveles de glucosa intermedios, parece ser que estos niveles son los suficientemente dañinos para promover el desarrollo de CVD como infarto agudo al miocardio y enfermedad vascular cerebral[12].

La IGT, además de predisponer al desarrollo de DM2, también parece ser un factor promotor de CVD[13], estas dos patologías son la principal causa de muerte en nuestro país. Evidencia reciente muestra que la mortalidad es mayor en las personas con IGT[6], por lo que se recomienda hacer pruebas en sujetos que tengan factores de riesgo para intolerancia a la glucosa, como: un Índice de Masa Corporal (IMC) $\geq 35 \text{ kg/m}^2$, la edad >60 años, familiares de primer grado con DM2, hipertrigliceridemia, colesterol HDL disminuido e hipertensión[14].

En 2015 un estudio mostró los factores que se asociaban con el desarrollo de la prediabetes, en el estudio se encontró una fuerte asociación entre la obesidad y el desarrollo de la intolerancia a la glucosa[14]. Parece ser que la obesidad es el principal factor de riesgo para desarrollar intolerancia a la glucosa es la obesidad[15]. Actualmente la obesidad es un estado de inflamación sistémica que, a través de procesos pro-inflamatorios, altera la vía de

señalización de la insulina y como resultado aumenta la resistencia a la insulina, una de las alteraciones en la historia natural de la intolerancia a la glucosa, como veremos a continuación[16-18].

3.1.2 Fisiopatología de la intolerancia a la glucosa

La intolerancia a la glucosa es un estado de hiperglucemia y se caracteriza por resistencia a la insulina y disfunción de las células β del páncreas secundarios al desarrollo de la obesidad[2, 15]. La hiperglucemia perjudica la secreción de insulina e induce apoptosis de las células β del páncreas. La hiperglucemia de la IGT, a pesar de no ser tan elevada como en la DM2, parece ser lo suficientemente tóxica para inducir la muerte de las células β [19, 20]. Este mecanismo, conocido como glucotoxicidad, además de resultar en muerte celular promueve la resistencia a la insulina, en estados de hiperglicemia crónica[21]. En sujetos normoglucémicos la insulina favorece la captación y almacenamiento de los ácidos grasos en forma de triglicéridos e inhibe la lipólisis de los triglicéridos almacenados en el tejido adiposo[19]. En sujetos obesos con intolerancia a la glucosa un mecanismo conocido como lipotoxicidad disminuye la captación de glucosa en músculo y aumenta la de ácidos grasos, en hígado aumenta la producción de glucosa y en tejido adiposo aumenta la liberación de ácidos grasos(Fig. 1) [19, 22-24]. Similar a la glucosa, los ácidos grasos libres plasmáticos (FFA, Free fatty acid) aumentan la resistencia a la insulina, alteran la función secretora de las células β inducen la apoptosis de esta células[21]. Por lo tanto, la combinación de hiperglucemia y FFA, a través de mecanismos de glucotoxicidad y lipotoxicidad, disminuyen la función de las células β del páncreas. Además, la liberación de los

ácidos grasos del tejido adiposo de sujetos obesos induce una respuesta inflamatoria, activando a macrófagos pro-inflamatorios a través del receptor tipo Toll 4 (Toll-Like Receptor 4, TLR4 por sus siglas en inglés)[21]. La obesidad incrementa aún más la inflamación, ya que actualmente se considera un estado de inflamación sistémica que comprende la elevación de niveles circulantes de Factor de necrosis tumoral alfa (Tumor Necrosis Factor alfa, TNF- α por sus siglas en inglés.), así como disminución en los niveles séricos de interleucina 10 (IL-10)[25]. Esta alteración en los niveles sistémicos de citocinas pro y anti-inflamatorias favorece la activación de macrófagos inflamatorios (M1), con capacidad de infiltrar tejidos periféricos como el adiposo, el hepático y el músculo esquelético, disminuyendo, además, la proporción de macrófagos anti-inflamatorios (M2) en estos mismos tejidos (Fig.1) [26]. En tejido insulino dependiente, el TNF- α sintetizado por los macrófagos M1 tiene un papel importante en la generación de la resistencia a la insulina, que conlleva a la intolerancia a la glucosa, y posteriormente hiperglucemia crónica, hiperinsulinemia, apoptosis de células β pancreáticas y finalmente DM2[17, 27]. En el tejido adiposo de ratones con peso normal se ha observado predominio de macrófagos M2 secretores de IL-10, lo cual contribuye a la disminución de los niveles locales de TNF- α y, por lo tanto, el aumento de la sensibilidad a la insulina en los adipocitos[28]. Por lo tanto, el desbalance de macrófagos M1 y M2 en tejido insulino dependiente de ratones obesos, con la concomitante elevación de TNF- α y disminución de IL-10, parece ser uno de los principales factores que contribuyen a la generación de resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa (Fig. 1)[29]. Estos datos parecen mostrar

que los macrófagos tienen un papel muy importante en el desarrollo de resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa.

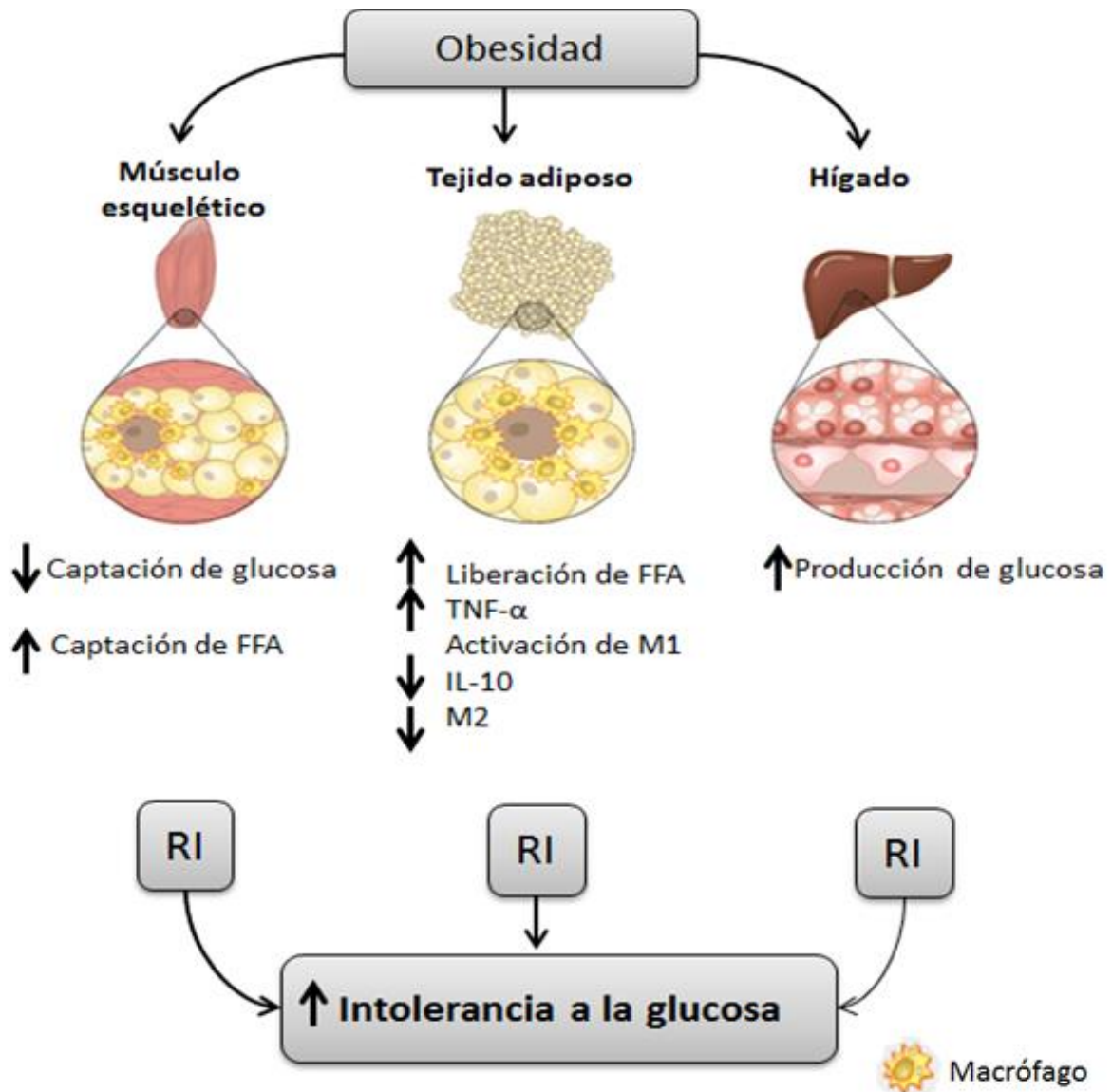


Figura 1. Mecanismos que Promueven la Resistencia a la Insulina. La obesidad a través de la lipotoxicidad induce alteraciones en músculo esquelético, tejido adiposo e hígado que resulta en aumento de la inflamación sistémica y resistencia a la insulina (RI) en estos tejidos, y finalmente intolerancia a la glucosa. Abreviaturas: FFA, ácidos grasos libres; TNF- α , Factor de necrosis tumoral alfa; M1, macrófagos pro-inflamatorios M1; IL-10, Interleucina 10; M2, macrófagos anti-inflamatorios M2. Modificado de Olefsky, 2010.

3.2 La diversificación fenotípica de los macrófagos y su función en los procesos inflamatorios

Los macrófagos son las células más plásticas del sistema hematopoyético mieloide, están involucradas en procesos de salud y de enfermedad y se encuentran en todo los tejidos[30]. Su mayor función es responder a patógenos y modular la respuesta inmune adaptativa a través del proceso y presentación de antígenos, otras funciones se centran en la generación y resolución de procesos inflamatorios, además de la reparación de tejidos[31]. Los monocitos son las células precursoras de los macrófagos, se encuentran en la médula ósea, pueden extravasar la pared vascular y entrar al torrente sanguíneo. Después de tres días estas células se diferenciarán a macrófagos y células dendríticas (Fig. 2)[30]. Durante la diferenciación, los monocitos esféricos, flotantes y libres en el torrente sanguíneo migran a tejidos periféricos y se transforman en células adherentes de forma irregular, llamadas macrófagos[32]. Por lo tanto, la diferenciación de monocitos a macrófagos es el resultado de cambios morfológicos y de la expresión génica, a través de la exposición a factores de crecimiento locales, citocinas pro-inflamatorias y compuestos microbianos[30, 32]. El receptor estimulador de colonias 1 (colony stimulating factor 1 receptor, CSF1R) es un regulador de la diferenciación de monocitos a macrófagos[33]. CSF1R es un receptor transmembrana tirosina cinasa clase III, que se expresa en la mayoría de las células fagocíticas mononucleares[34]. El Factor estimulante de colonias 1 (colony stimulating factor 1, CSF1 por sus siglas en inglés) es el principal ligando para CSF1R (Fig. 2)[34]. Diversos estudios han mostrado que la ablación de CSFR1 en ratones causa una severa depleción de macrófagos en los tejidos,

además tras la ablación de CSFR1 la proliferación y reclutamiento de monocitos a través de CSF1 se inhibe[35]. Estos hallazgos demostraron que CSFR1 es uno de los principales reguladores de la diferenciación y es el único receptor para CSF1 también conocido como Factor estimulante de colonias de macrófagos (Macrophage colony-stimulating factor, M-CSF, por sus siglas en inglés)[30, 34, 35].

A pesar de la importancia de CSF1R en la proliferación de macrófagos, otros autores han mostrado que a pesar de la depleción de este receptor, algunos tejidos como el bazo siguen teniendo macrófagos, esto indica la existencia de otros factores de crecimiento de macrófagos[30]. El Factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor, GM-CSF por sus siglas en inglés) y la interleucina 3 (IL-3) son los potenciales candidatos que promueven la proliferación de macrófagos en ausencia de CSFR1(Fig. 2)[34].

La IL-3 es una citosina que estimula la proliferación de células hematopoyéticas pluripotentes y células progenitoras de la línea mieloide, por lo que se considera un factor estimulante de colonias multipotencial (multipotential colony-stimulating factor, multi-CSF por sus siglas en inglés)[36]. La estimulación con IL-3 *ex vivo* en células derivadas de la médula ósea de ratones estimuló la generación de macrófagos[37]. Estos datos sugieren que IL-3, además de promover la proliferación de células pluripotentes, también es un factor de crecimiento de macrófagos. El GM-CSF es otro de los factores que participa en la proliferación de macrófagos, la mayoría de los estudios han demostrado un papel proaterógeno de GM-CSF, que se cree está relacionado con la proliferación de

macrófagos pro-inflamatorios en las lesiones aterogénicas, esto podría mostrar que el GM-CSF participa en la proliferación de macrófagos con un fenotipo pro-inflamatorio[38].

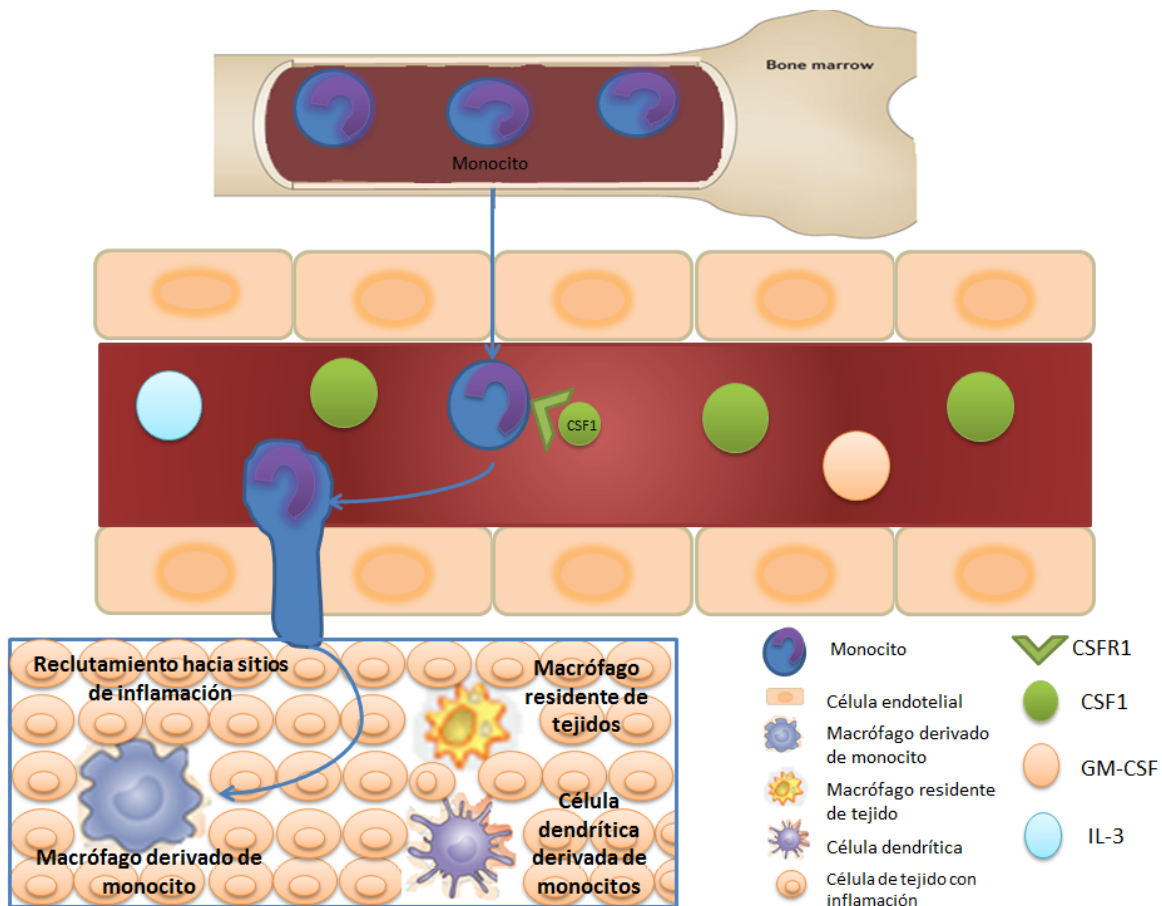


Figura 2. La Diferenciación de Monocitos a Macrófagos. Los monocitos son continuamente generados en la médula ósea, llegan al torrente sanguíneo y se diferencian a macrófagos a través de CSF1, GM-CSF e IL-3. Finalmente los macrófagos derivados de monocitos son reclutados a sitios de inflamación donde terminarán de diferenciarse hacia macrófagos residentes de tejido o células dendríticas. Modificado de Ginhoux, 2014.

Tanto el GM-CSF como el M-CSF están involucrados en la diferenciación de monocito a macrófago e intervienen en la polarización de los macrófagos[33], es importante mencionar que el término diferenciación es distinto al de polarización. La polarización se refiere a la capacidad de un macrófago plenamente diferenciado de responder a estímulos externos mediante el cambio

de sus características fenotípicas y funcionales[32]. El GM-CSF puede polarizar monocitos hacia un subtipo de macrófagos M1 con un perfil de citocinas pro-inflamatorias[39]; mientras que M-CSF produce un perfil anti-inflamatorio de macrófagos M2[40]. Este perfil pro-inflamatorio M1 o anti-inflamatorio M2 genera una clasificación de macrófagos binaria, en clásicos o alternos, respectivamente. En respuesta a citocinas como el Interferón γ (INF- γ) o productos bacterianos como el Lipopolisacárido (LPS), los macrófagos se polarizan a un perfil clásico o pro-inflamatorio M1[33]. Los macrófagos M1 producirán grandes cantidades de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12, y expresarán receptor tipo Toll 2 (Toll-Like Receptor 2, TLR2 por sus siglas en inglés), TLR4 y la enzima óxido nítrico sintasa (Nitric oxide synthase, NOS2 por sus siglas en inglés) (Fig. 3)[16, 39, 41]. Contrariamente, las citocinas anti-inflamatorias como IL-4/IL-13 promueven la polarización hacia macrófagos alternos o M2[40, 42]. Los macrófagos M2 se dividirán en tres subtipos, a, b y c, la diferencia entre éstos dependerá de la citocina que se utilizó para polarizar y de los productos que exprese cada subtipo de macrófago M2. Tanto IL4 como IL-13 polarizarán los macrófagos hacia M2a, en respuesta a inmunocomplejos hacia M2b, o por la acción de IL-10, del Factor de crecimiento transformante β (Transforming growth factor beta, TGF- β por sus siglas en inglés) o glucocorticoides hacia M2c[32, 40, 43]. Los macrófagos M2 expresarán citocinas anti-inflamatorias como IL-10, además del receptor de manosa (CD206) y Arginasa 1 (Arg1) (Fig. 3) [28, 43].

Macrófagos pro-inflamatorios

Macrófagos anti-inflamatorios

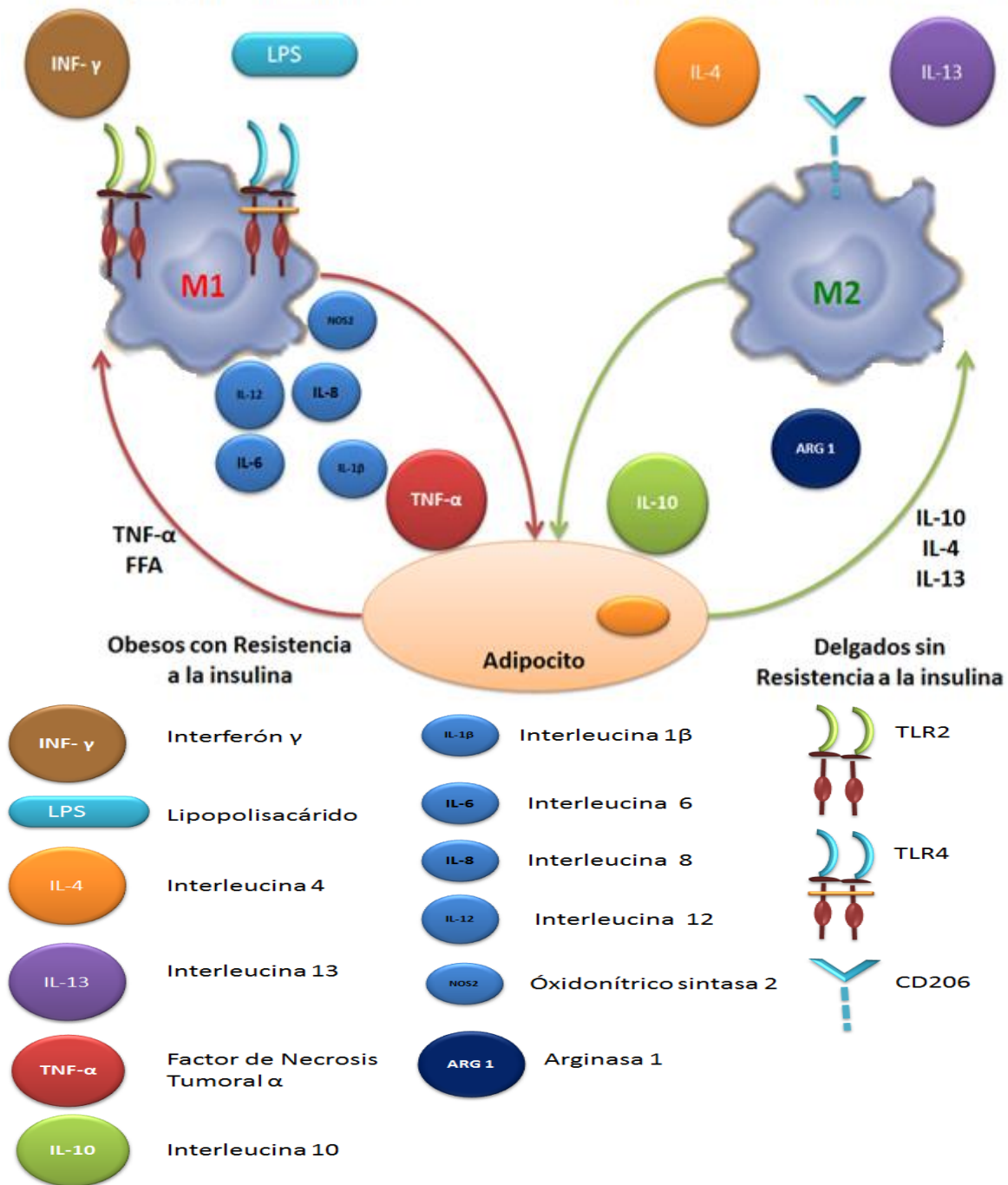


Figura 3. Factores que Promueven la Polarización de Macrófagos y la resistencia a la insulina en el tejido adiposo. Los adipocitos de sujetos delgados secretan interleucinas como IL-4 que promueven la polarización de macrófagos anti-inflamatorios. Los macrófagos M2 secretan citocinas anti-inflamatorias como la IL-10, un factor relacionado con el aumento de la sensibilidad a la insulina. La obesidad induce cambios en el metabolismo del adipocito y en la expresión génica, como resultado a través de la lipólisis hay liberación de FFA (ácidos grasos libres) y TNF- α , los cuales polarizan los macrófagos hacia un fenotipo pro-inflamatorio. Los macrófagos M1 producen grandes cantidades de citocina pro-inflamatorias como TNF- α que promueve el aumento de la

resistencia a la insulina en los adipocitos. Esto establece una retroalimentación positiva que amplifica la inflamación y la resistencia a la insulina. Modificado de Olefsky, 2010.

Los macrófagos forman parte del estroma del hígado, el páncreas y el tejido adiposo, en estos tejidos los macrófagos mantienen la homeostasis metabólica. El mantenimiento de la homeostasis por parte de los macrófagos dependerá del medio en que se encuentren y a la ingesta de nutrientes. Durante una infección bacteriana, la activación innata de los macrófagos produce la secreción de citocinas pro-inflamatorias como TNF α , IL1 β , IL-6, que promueven la resistencia a la insulina para disminuir el almacenamiento de nutrientes. Esto resulta en una adaptación metabólica necesaria para tener una defensa eficaz contra los patógenos bacterianos y virus, porque casi todas las células inmunes activadas utilizan preferentemente la glucólisis para alimentar sus funciones en la defensa del huésped. La resistencia a la insulina, una adaptación metabólica favorecedora en infecciones, resulta contraproducente en la obesidad. Los macrófagos residentes del tejido adiposo en la obesidad promueven un ambiente inflamatorio que genera un estado de inflamación crónica de bajo grado, en el cual la resistencia a la insulina generada por estas células promueve intolerancia a la glucosa (Fig. 3).

En las siguientes secciones, se proporciona un marco general para comprender las funciones pleiotrópicas realizadas por los macrófagos para inducir intolerancia a la glucosa.

3.3 Los macrófagos como agentes promotores de la inflamación en la intolerancia a la glucosa

Los macrófagos son células que se pueden polarizar hacia un fenotipo anti-inflamatorio o pro-inflamatorio, bajo la influencia de señales derivadas del microambiente fisiológico o patológico[44]. En ambientes patológicos como la intolerancia a la glucosa secundaria a obesidad, los niveles circulantes de citocinas sistémicas pro-inflamatorias como TNF- α reclutan monocitos en el tejido adiposo, donde se activan a macrófagos del tejido adiposo (Adipose tissue macrophages, ATMs por sus siglas en inglés)[17], Posteriormente los ATMs se polarizan hacia un perfil clásico o pro-inflamatorio, a través de la exposición de TNF- α y FFA liberados por los adipocitos hipertrofiados (Fig. 4) [45, 46]. En los sujetos con intolerancia a la glucosa y obesidad, el tejido adiposo se conforma de adipocitos hipertrofiados y ATMs[17]. Durante la hipertrofia de los adipocitos, existen mecanismos compensatorios como la angiogénesis que proveen de nutrientes y oxígeno, para evitar la isquemia y la muerte celular[21]. La angiogénesis se induce mediante la producción de factores pro-angiogénicos con el propósito de restaurar los niveles requeridos de oxígeno[21]. En sujetos obesos con intolerancia a la glucosa se forman áreas con baja presión de oxígeno, cuando el suministro de sangre local es incapaz de seguir el ritmo de crecimiento[47]. Por lo tanto, la angiogénesis resulta insuficiente en este tejido, para mantener los niveles necesarios de oxígeno y como resultado produce hipoxia. En tejidos hipóxicos e isquémicos, los macrófagos se acumulan en grandes cantidades y responden a la hipoxia con la activación de factores de transcripción. Entre los más destacados están los factores inducibles de hipoxia 1 y 2 (hipoxia-inducible

factor, HIF por sus siglas en inglés)[47]. HIF1 y HIF2 inducen una respuesta inflamatoria mediante el reclutamiento y la polarización de macrófagos hacia un fenotipo pro-inflamatorio[44]. Cramer et al. (2003), mostraron que la ablación de HIF1 en macrófagos imposibilita la migración hacia tejido hipóxico e isquémico, inhibiendo las funciones inflamatorias de los macrófagos M1 en estos sitios[48]. Cuando la hipoxia es severa y el daño es irreversible, se produce un proceso isquémico en el tejido adiposo[21]. Los adipocitos en muerte celular son rodeados por macrófagos M1 formando estructuras similares a corona (Crown-like structures, CLSs por sus siglas en inglés) (Fig. 4) [49, 50].

Durante la hipoxia o la isquemia los macrófagos pro-inflamatorios M1, tienen una función regulatoria extrínseca mediante la secreción de citocinas pro-inflamatorias y una intrínseca que contribuye a su activación pro-inflamatoria[44]. El reclutamiento de los macrófagos pro-inflamatorios M1 en el tejido adiposo podría tener un papel importante resolviendo la hipoxia, posiblemente en un esfuerzo de reparar el tejido dañado o durante la isquemia para remover restos celulares[21]. A pesar de que la activación de macrófagos M1 parece tener un rol importante en la reparación del tejido adiposo con hipoxia y/o isquemia, interesantemente la inflamación producida por los macrófagos M1 también parece promover resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa en el tejido adiposo[44]. Los adipocitos hipertrofiados de sujetos obesos con intolerancia a la glucosa además de sufrir hipoxia, también liberarán FFA y secretarán factores pro-inflamatorios como TNF- α (Fig. 4)[17].

Los FFA secretados por los adipocitos activan a receptores de reconocimiento de patrón (pattern recognition receptors, PRRs por sus siglas en inglés), como los receptores tipo Toll[16]. Los TLRs reconocen patógenos asociados a patrones moleculares (pathogen-associated molecular patterns, PAMPs por sus siglas en inglés), como LPS, peptidoglucano, y ADN bacteriano[51]. Los patrones moleculares endógenos asociados a daño (endogenous damage-associated molecular patterns, DAMPs por sus siglas en inglés), como la adenosín trifosfato (ATP), proteínas de choque térmico y los FFA también actúan sobre los TLRs[51]. Los TLR4/TLR2 son activados a través de FFA y polarizan macrófagos hacia el fenotipo M1(Fig. 4) [45]. Se ha observado que la depleción de TLR4 tiene un efecto protector contra la resistencia a la insulina en las células de los ratones con dieta alta en grasa, esto sugiere que TLR4 tiene un papel importante en el desarrollo de la resistencia a la insulina[52].

Por lo tanto, en los sujetos obesos con intolerancia a la glucosa, el aumento de los niveles circulantes de TNF- α produce un estado de inflamación sistémica de bajo grado. A la vez TNF- α y los factores inducibles de hipoxia promueven la activación de macrófagos pro-inflamatorios M1 en el tejido adiposo. Esto genera un desbalance en la proporción de macrófagos M1 y M2 en este tejido.

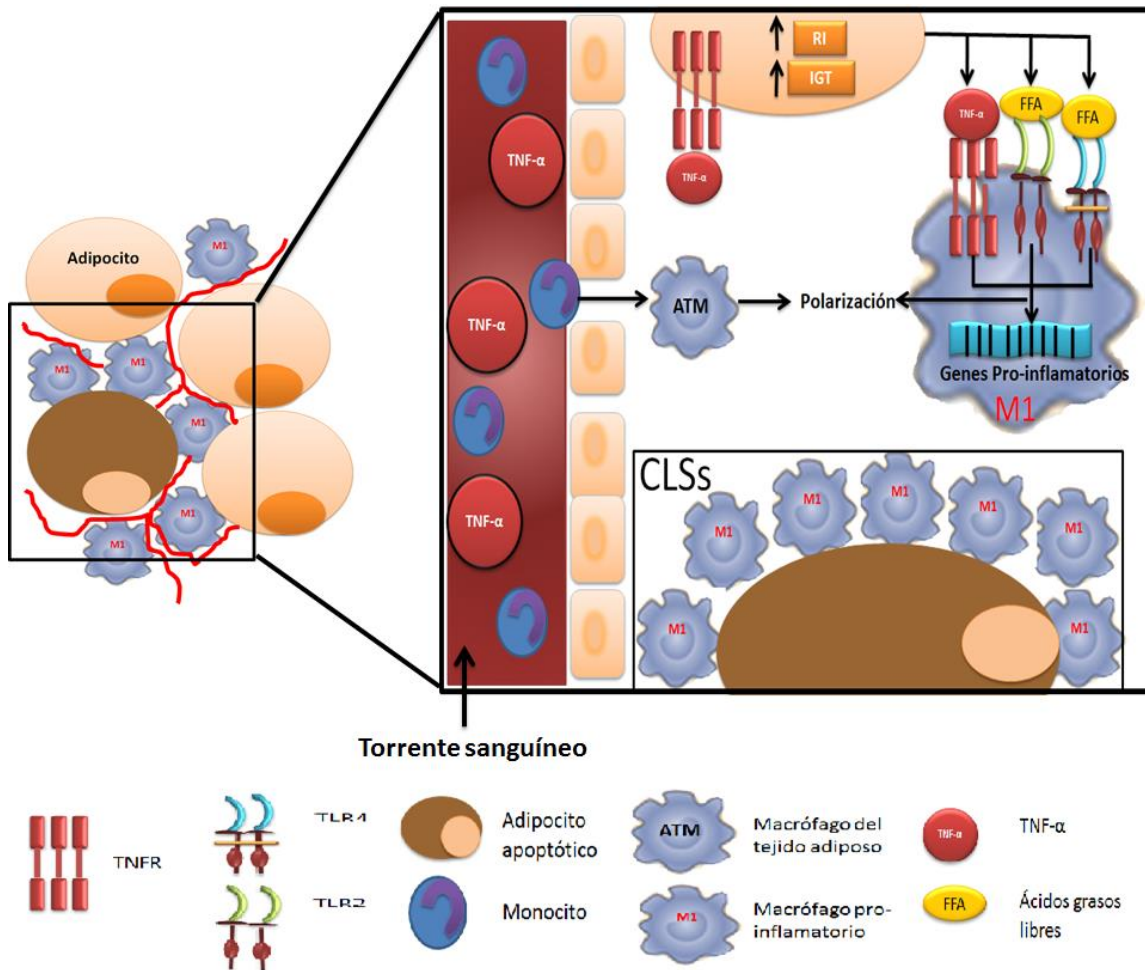


Figura 4. La Activación de Macrófagos pro-Inflamatorios Contribuye a la Inflamación del Tejido Adiposo y a la Resistencia a la Insulina. En respuesta a TNF- α los monocitos migran de la circulación sanguínea al tejido adiposo, donde se diferencian a ATMs. Los ATMs también se activan a través de la exposición a FFA por medio de los TLR2 y TLR4, promoviendo la activación de vías de señalización inflamatorias. Estas vías inducen la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α . El TNF- α aumenta la resistencia a la insulina y la intolerancia a la glucosa en los adipocitos. Además tanto TNF- α como FFA inducen la polarización de macrófagos M1. Los adipocitos hipertrofiados sufren hipoxia y comienzan un proceso de apoptosis, la hipoxia produce la expresión de factores pro-inflamatorios en los macrófagos. Finalmente los macrófagos M1 rodearán al adipocito apoptótico y formarán las CLSs (estructuras similares a corona). Modificado de Lackey, 2016.

3.3.1 El desbalance de macrófagos M1 y M2 en la obesidad asociada a la intolerancia a la glucosa

Weisberg y colaboradores (2003) observaron en el tejido adiposo de ratones con peso normal, el marcador para macrófagos F4/80⁺ se expresaba solamente en el 10-15% de las células inmunes, mientras que en el tejido adiposo de animales obesos los macrófagos eran numéricamente dominantes, del 45-60% de las

células expresaron F4/80⁺ (Fig. 4)[53]. Esto indicaría que la obesidad aumenta la proporción de macrófagos F4/80⁺ en el tejido adiposo.

En un estudio ratones alimentados con HFD les produjo obesidad y se evaluó la polarización de los ATMs. Los investigadores encontraron en el tejido adiposo de los ratones obesos que los macrófagos polarizaban hacia un fenotipo pro-inflamatorios M1; además, la expresión génica de TNF- α y NOS2, marcadores característicos de la activación clásica en ratones obesos era mayor, en comparación de los ratones con peso normal, los macrófagos expresaban genes característicos de una activación alternativa M2, como arginasa 1 e IL-10[54]. Otro estudio demostró que el número de macrófagos M1 CD206⁻ era 65 veces mayor que el de macrófagos M2 CD206⁺ en el tejido adiposo de ratones con obesidad inducida por HFD. Por otra parte, cuando buscaron la presencia de CLSs formadas por macrófagos M1, observaron que éstas no se encontraban en ratones con peso normal[28]. Fujisaka et al. (2009) encontraron que la proporción de macrófagos pro-inflamatorios M1 era mayor que la de macrófagos anti-inflamatorios M2[28]. Además, un análisis de la proporción de macrófagos M1 y M2 en pacientes con prediabetes valoró el estado de polarización de los monocitos-macrófagos. Se demostró el aumento de monocitos-macrófagos pro-inflamatorios M1 en sangre periférica de los pacientes prediabéticos[55]. Esto datos sugieren que los monocitos-macrófagos M1, podrían ser reclutados hacia el tejido adiposo y aumentar la resistencia a la insulina a través de TNF- α .

Por otro lado, se observó en los ratones con peso normal una mayor proporción de macrófagos anti-inflamatorios M2[54]. La citocina anti-inflamatoria

IL-10 se sobreexpresa en los macrófagos M2 de los ratones con peso normal (Fig. 5)[28]. Los macrófagos M2 tienen un papel crucial en la sensibilidad a la insulina mediante la secreción de IL-10, regulando la vía de señalización de insulina en los adipocitos[45]. Citocinas como IL-4 e IL-13 polarizan a los ATMs hacia un fenotipo anti-inflamatorio en sujetos delgados[46]. El tejido adiposo de sujetos delgados libera en grandes cantidades IL-4 e IL-13 que promueven el reclutamiento, diferenciación y/o supervivencia de las poblaciones de macrófagos M2 (Fig. 5)[16, 17, 46]. Otros estudios sugieren, que IL-10 también podría actuar en la polarización de los ATMs hacia el fenotipo M2 en el tejido adiposo y aumentar la sensibilidad a la insulina en adipocitos de sujetos con obesidad en estadios tempranos[28].

La activación de los macrófagos anti-inflamatorios M2 mediada por IL-4 e IL-13, se induce a través de la expresión del Receptor Gamma Activado por el Factor Proliferador de Peroxisomas (Peroxisome Proliferator Activated Receptor gamma, PPAR γ por sus siglas en inglés) y del Factor Proliferador de Peroxisomas (Peroxisome Proliferator Activated Receptor delta, PPAR δ por sus siglas en inglés) (Fig. 6)[16].

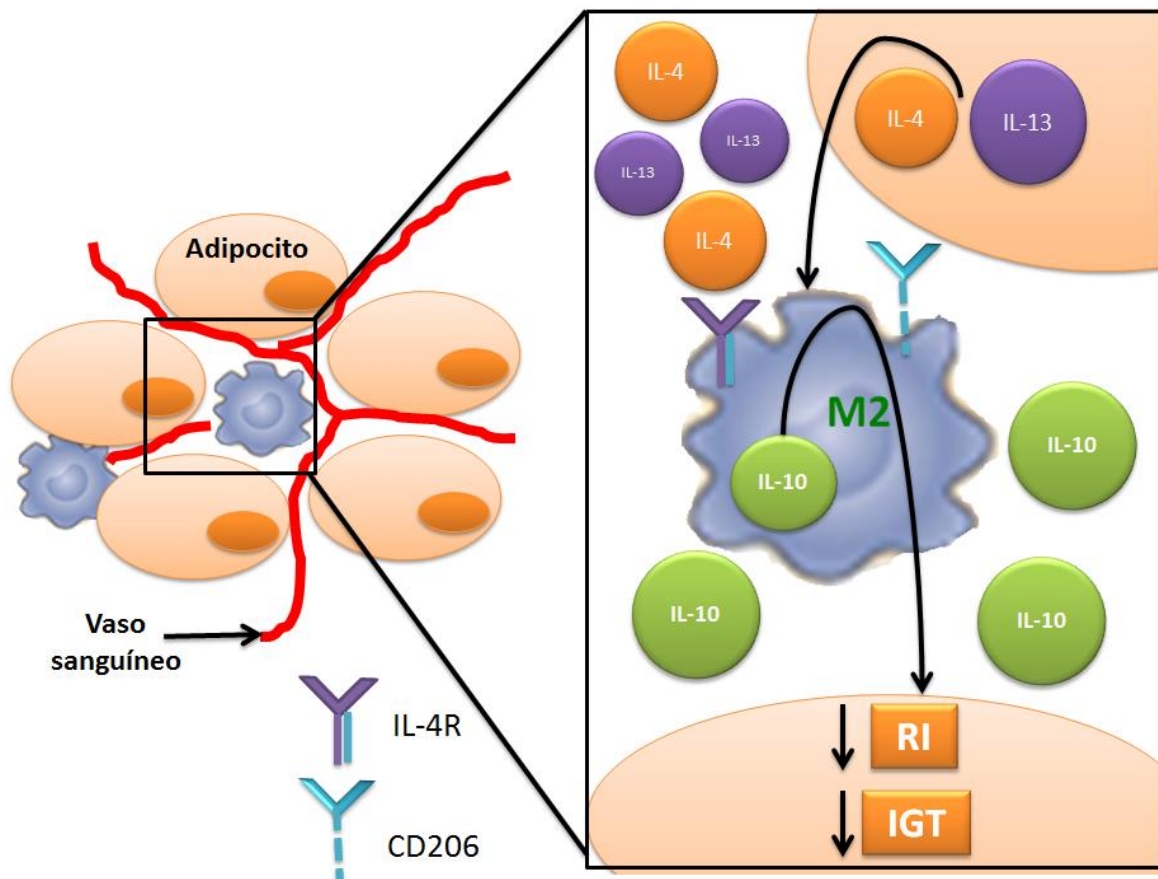


Figura 5. Regulación de la Sensibilidad a la Insulina. Los adipocitos de sujetos delgados secretan IL-4/IL-13, a través de esta citocina los ATMs polarizan hacia macrófagos anti-inflamatorios M2. La IL-10 secretada por los macrófagos M2 promueve la sensibilidad a la insulina y disminución de la intolerancia a la glucosa en adipocitos[56]. Modificada de Dey et al. (2015).

PPAR γ y PPAR δ son los dos principales reguladores de la transcripción que promueven el fenotipo anti-inflamatorio de los macrófagos. A través de IL-4 e IL-13, el activador de la transcripción y transductor de señal 6 (Signal transducer and activator of transcription 6, STAT6 por sus siglas en inglés) se fosforila y dimeriza (Fig. 6)[57]. STAT6 se transloca al núcleo donde aumenta la expresión de PPAR γ y PPAR δ , mientras disminuye la expresión de genes pro-inflamatorios en macrófagos (Fig. 6). A su vez, STAT6 regula un programa de expresión génica distinto y antagónico a la activación M1. Por ejemplo, IL-4 e IL-13 inducen la expresión de arginasa, el cual desvía el precursor clave utilizado por NOS2 para

generar óxido nítrico. Además, estas citocinas inducen la expresión del receptor de manosa, también conocido como CD206[17].

Los PPARs y STAT6 comparten el coactivador 1β de PPAR γ (PPAR γ coactivador 1β , PGC1 β por sus siglas en inglés). PGC1 β también induce en respuesta a la activación de macrófagos M2[17]. Para demostrar el papel que tienen PPAR γ en la polarización de macrófagos M2, se observó en células mieloides de ratones obesos, deletadas para PPAR γ , que los macrófagos no polarizaban hacia M2 a pesar de la presencia de IL-4[58]. Estos datos sugieren que PPAR γ es un importante factor que induce la polarización de macrófagos hacia un fenotipo anti-inflamatorio.

Los PPARs, además de ser regulados por citocinas, también lo son por ácidos grasos monoinsaturados. En sujetos delgados, Odegaard y colaboradores (2008), encontraron que los ácidos grasos monoinsaturados anti-inflamatorios, como el ácido oleico, predominaban en el tejido adiposo[16]. El ácido oleico sinergiza con IL-4/IL-13 para activar a PPAR γ y PPAR δ , como resultado activan macrófagos M2 y suprimen macrófagos M1, a través de la producción de IL-10[16, 17].

Toda esta evidencia sugiere que PPAR γ y PPAR δ regulan la activación anti-inflamatoria de macrófagos en el tejido adiposo, y como resultado disminuye la resistencia a la insulina de sujetos obesos con intolerancia a la glucosa[16].

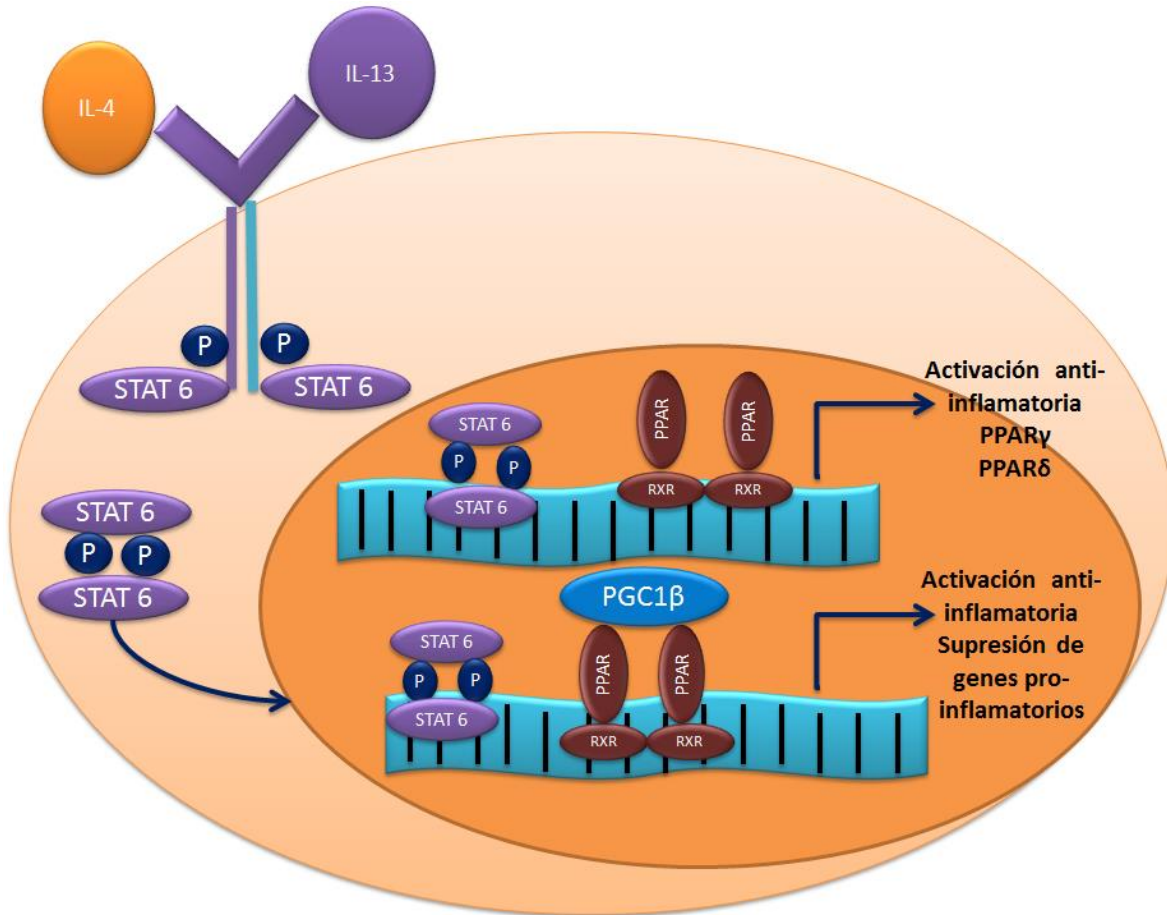


Figura 6. Modelo Transcripcional de la Activación de Macrófagos anti-Inflamatorios. La estimulación de macrófagos con IL-4/IL-13 resulta en la fosforilación de STAT6, vía IL-4R. La proteína STAT6 fosforilada se dimeriza y transloca al núcleo para activar la transcripción de PPAR. Para inducir la expresión de genes anti-inflamatorios, STAT6 induce la expresión de reguladores transcripcionales, PPAR δ y PPAR γ , y del coactivador de la proteína PGC-1 β , que sinergiza con STAT6 para amplificar y estabilizar la activación de macrófagos anti-inflamatorios. Abreviaturas: STAT, transductor de señal y activador de la transcripción; PPAR, Receptor Activado por el Factor Proliferador de Peroxisomas; RXR, receptor retinoide X; PGC-1 β , Receptor Activado por el Factor Proliferador de Peroxisomas 1 β . Modificado de Odegaard, 2008.

Estos datos muestran que la inflamación, específicamente a través de los macrófagos, tiene un papel muy importante en la patogénesis de la resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa. Lo cual lleva a plantearnos el desarrollo de terapias que disminuyan la inflamación y también restablezcan la proporción de macrófagos anti-inflamatorios, para crear un estado más parecido al fisiológico donde los sujetos delgados tiene una mayor cantidad de macrófagos M2 y menor de citocinas pro-inflamatorias.

3.3.2 La administración de macrófagos M2 en procesos inflamatorios

Estudios recientes han mostrado que la administración de macrófagos M2 disminuye la inflamación en modelos de Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC) y de Insuficiencia Renal Aguda (IRA), enfermedades relacionadas con un proceso inflamatorio.

En el modelo de EPOC, la inflamación fue inducida en ratones a través de la administración intrapulmonar de LPS. A las 48 hrs del reto con LPS, se les administró intrapulmonar, 1×10^6 macrófagos de la médula ósea M1 o M2, previamente polarizados *ex vivo*. Mediante estudios de resonancia magnética se dio seguimiento a los ratones con EPOC tratados con macrófagos y se observó que el grupo con macrófagos M2, a los siete días, no presentaban datos de inflamación. Histológicamente se observó a las 72 hrs de la administración de macrófagos M2, la disminución de la inflamación pulmonar. Por lo que los autores concluyen que la administración de macrófagos M2 polarizados *ex vivo*, tiene gran potencial en la disminución de la inflamación en este modelo de EPOC[59]. La IRA secundaria a rhabdomiolisis fue otro modelo que evaluó el tratamiento con macrófagos M2. La rhabdomiolisis en ratones fue inducida tras la administración intramuscular de glicerol, a continuación se les administró 1×10^7 macrófagos previamente polarizados a M1 o M2. A la 72 hrs los ratones tratados con macrófagos M2 mejoraron tras la lesión renal inducida por rhabdomiolisis, mediante histología se observó que el daño tubular en riñón era menos severo en los ratones con macrófagos M2. Además, los marcadores de daño renal como: la

creatinina y la urea/nitrógeno sanguíneo disminuyeron en los ratones tratados con las mismas células anti-inflamatorias. Geng y colaboradores concluyeron que su hallazgo sugieren que los macrófagos anti-inflamatorios M2 pueden disminuir la IRA inducida por rabiomiolisis[60].

Esto sugiere que los macrófagos M2 podrían ser utilizados como inmunoterapia en enfermedades relacionadas con la inflamación, como la intolerancia a la glucosa. El desbalance de macrófagos M1 y M2 en tejido adiposo de obesos, con la concomitante elevación de TNF- α y disminución de IL-10, parece ser uno de los principales factores que contribuyen a la generación de resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa. Probablemente, a través de la administración de macrófagos M2, se podría restablecer la proporción de macrófagos M1 y M2, además de aumentar los niveles de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 en la intolerancia a la glucosa.

3.4 La respuesta inflamatoria como factor promotor de la resistencia a la insulina en la intolerancia a la glucosa

La respuesta inflamatoria en sujetos obesos intolerantes a la glucosa parece estar aumentada por el desbalance de macrófagos M1 y M2, con la concomitante elevación de TNF- α y disminución de IL-10 en el tejido adiposo.

El TNF- α y FFA, ligandos de TNFR y TLRs, respectivamente, estimulan la vía de señalización del factor nuclear kappa B (Nuclear Factor kappa B, NF- κ B por sus siglas en inglés)-I κ B (IKK) para promover respuestas pro-inflamatorias[61].

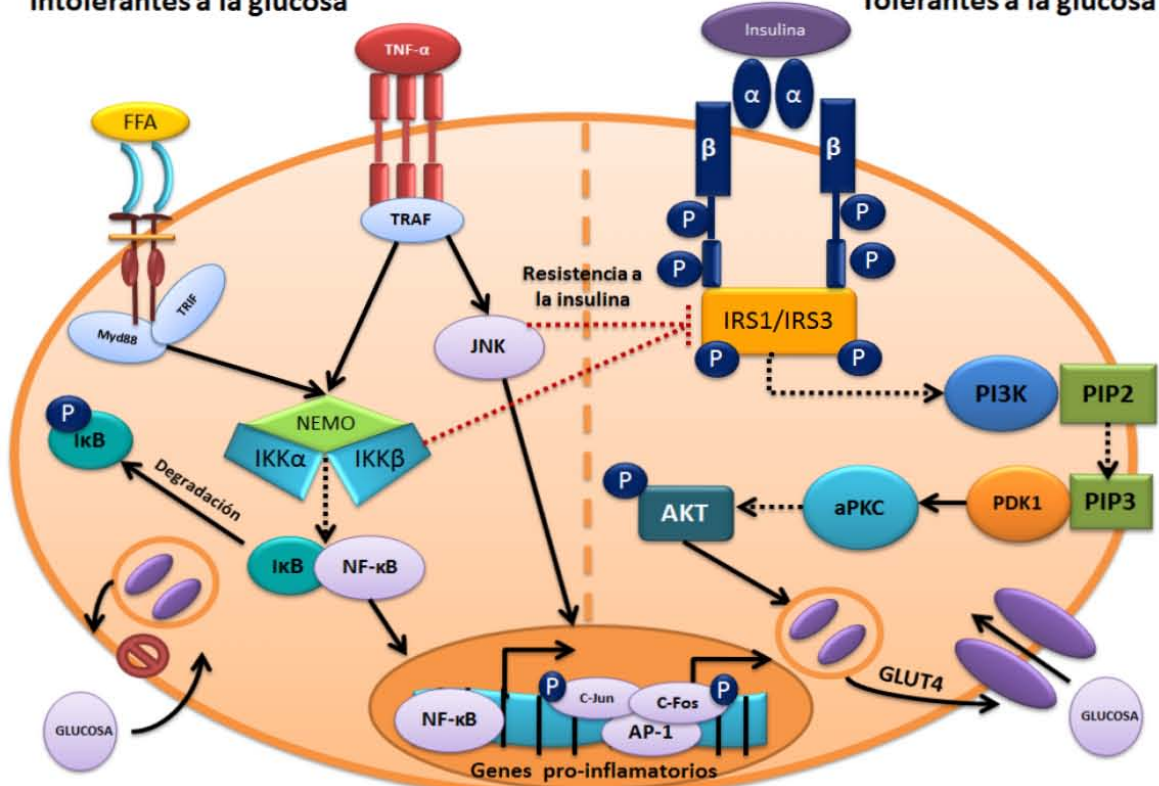
En el citoplasma NF- κ B es secuestrado por el inhibidor de κ B (I κ B) para prevenir la translocación hacia el núcleo. La activación de IKK permite la fosforilación de I κ B y la liberación de NF- κ B hacia el núcleo, donde se une a genes promotores de la inflamación e inicia la transcripción[62]. Las subunidades catalíticas IKK α y IKK β junto con la subunidad reguladora NEMO, comprometen el complejo IKK (Fig. 7)[63]. Otra de las vías inflamatorias es la cinasa c-Jun N-terminal (JNK)-proteína activadora 1 (AP-1). La activación y fosforilación de JNK permite la fosforilación de la región N-terminal del homodímero c-Jun para formar el heterodímero c-Jun-c-Fos, éste se une a las secuencias promotoras que inician la transcripción de genes pro-inflamatorios (Fig. 7)[46]. La actividad de JNK es incrementada en respuesta a la insulina en los tejidos de ratones obesos[64]. Finalmente, IKK β y JNK inhiben directamente la vía de señalización de la insulina al fosforilar los residuos de serina del receptor del substrato de insulina (Insulin receptor substrate 1, IRS-1 por sus siglas en inglés)[65]. A su vez inhibe la fosforilación de los residuos de tirosina de IRS1 y la posterior señalización de insulina, además de señalarlo para la degradación mediada por proteosoma (Fig. 7)[66].

En contraste, los sujetos delgados regulan la pro-inflamación con los ácidos grasos de los macrófagos. En estados basales tienen un papel importante en la resolución de la inflamación, uno de ellos es la prostaglandina (PG), generada de la prostaglandina G2, particularmente la 15deoxy- Δ^{12-14} (15d-PGJ2). Estas PGs actúan como ligando para PPAR e inhiben directamente a NF- κ B[67]. Los ácidos grasos poliinsaturados (polyunsaturated fatty acids, PUFAs por sus siglas en

inglés), como el omega-3 (n-3), reducen la incidencia de enfermedad coronaria, una patología estrechamente relacionada con el aumento de macrófagos M1[68]. Los PUFAs derivados del n-3, como el ácido eicosapentanoico (Eicosapentanoic acid, EPA por sus siglas en inglés) en un estudio incrementó la expresión de IL-10 en las células del sistema monocito-macrófago[69]. Por lo tanto, ligandos como PGs y los PUFAs podrían regular la activación de macrófagos M2 a través de PPAR y disminuir la respuesta pro-inflamatoria inhibiendo a NF- κ B y aumentando la expresión de IL-10 en macrófagos. Diversos estudios han mostrado que IL-10 secretada por macrófagos M2 inhibe la producción de TNF- α [70, 71], al inhibir la transcripción de NF- κ B, un factor de transcripción que induce la producción de citocinas pro-inflamatorias como TNF- α [72]. Smallie y colaboradores (2010) encontraron que IL-10 inhibe la transcripción de TNF- α en macrófagos, a través de un nuevo mecanismo que inhibe la elongación[73]. En sujetos delgados la mayor proporción de macrófagos M2 secretan IL-10 que promueve un buen funcionamiento de la vía de señalización a la insulina y por lo tanto estos sujetos son tolerantes a la glucosa.

Intolerantes a la glucosa

Tolerantes a la glucosa



- | | | | | | |
|--|--|--|---|--|---------------------------------------|
| | Ácidos grasos libres | | Factor asociada al receptor TNF | | Factor nuclear-κB |
| | TNF-α | | Sustrato del receptor de la insulina | | Proteína de activación 1 |
| | Insulina | | Complejo IKK | | Vesículas transportadoras de GLUT4 |
| | TNFR | | Cinasa c-Jun N-terminal | | Fosfatidilinositol 3-quinasa |
| | TLR4 | | Proteínas que al combinarse forman AP-1 | | Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato |
| | Receptor de insulina | | NF-κB inactivo | | Fosfatidilinositol 3, 4,5-trisfosfato |
| | Adaptador de la diferenciación mieloide respuesta primaria | | Inhibidor de NF-κB | | Serina/treonina dependientes de PI3K |
| | Adaptador que contiene el dominio TIR inductor de INF-β | | | | Proteína cinasa C |
| | | | | | Proteína cinasa B fosforilada |

Figura 7. Vía de Señalización Inflamatoria Relacionada en el Desarrollo de la Resistencia a la Insulina. Los ligandos se unen a TNFR, TLR2/TLR4 activando al complejo IKK, permitiendo la degradación de IκB y la translocación de NF-κB hacia el núcleo del adipocito; la vía de JNK también se activa y permite la unión de AP-1 a regiones que promueven la transcripción de genes pro-inflamatorios. IKKβ y JNK fosforilan los residuos de serina de los IRS inhibiendo la vía de

señalización de la insulina e impidiendo la translocación de GLUT4 hacia la membrana así como la entrada de glucosa intracelularmente. La insulina cuando se une a su receptor permite la fosforilación de los residuos de tirosina de IRS1/IRS3 que activa a PI3K. PI3K fosforila a AKT permitiendo la translocación de GLUT4, así como la entrada de glucosa al adipocito. Modificado de McNelis, 2014.

3.4.1 Vía de señalización de la insulina IRS-1/PKC/Akt

El receptor de la insulina (Insulin receptor, IR por sus siglas en inglés) es una proteína heterotetramérica, tiene dos subunidades extracelulares y dos subunidades β transmembranales[74]. La unión la insulina a la subunidades extracelulares del IR estimula la actividad tirosina cinasa de las subunidades β , éstas están yuxtapuestas y permiten la autofosforilación de los residuos de tirosina, la activación y los cambios conformacionales del IR (Fig. 7). Se estimula la actividad tirosina cinasa intrínseca y se desencadena la transfosforilación de los sustratos del receptor de insulina (Insulin Receptor Substrate, IRS por sus siglas en inglés)[75]. Los cuatro tipos de IRS se encuentran distribuidos en tejidos dependientes a la insulina, en el tejido adiposo se estudió la participación de IRS-1 mediante ratones IRS-1-knockout y se observó que presentaban intolerancia a la glucosa e hiperplasia de las células β del páncreas[76]. En otro estudio, los investigadores demostraron que IRS-3 es expresado específicamente en este tejido, además mediante la deficiencia de IRS1/IRS3 los ratones presentaron hiperglucemia, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina[77]. Esto sugiere que la fosforilisación en adipocitos es predominantemente por IRS-1/IRS-3, que a su vez activa a fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K). El PI3K aumenta la conversión de fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP_2) hacia fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP_3), estas serina/treonina dependientes de PI3K (PDK1) junto con la proteínas cinasa C (α PKC) fosforilan a la proteína cinasa B (Akt) permitiendo la traslocación del

transportador de glucosa 4 (GLUT4) hacia la membrana plasmática (Fig. 7)[78, 79]. La mayor función de la insulina es incrementar la captación de glucosa y almacenarla en tejido adiposo, el 90% de las vesículas de GLUT4 son intracelulares y deben mobilizarse hacia la superficie celular[80]. La mala función de la vía de señalización de la insulina consecuentemente impedirá la traslocación de GLUT4, resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa.

En modelos animales de hiperglucemia, el desarrollo de la resistencia a la insulina está relacionado con la mala regulación del sistema de transporte de glucosa, GLUT. La toxicidad de la glucosa es una entidad bien establecida que contribuye al desarrollo de resistencia a la insulina y en el deterioro de la secreción de insulina en modelos murinos[81]. La administración de agentes citotóxicos como la estreptozotocina (streptozotocin, STZ por sus siglas en inglés), simula el aumento de resistencia a la insulina en animales, hiperglicemia y disfunción de las células beta del páncreas y deterioro de la secreción de insulina[82]. Por esta razón, la STZ se ha utilizado para establecer modelos murinos de intolerancia a la glucosa.

3.5 La estreptozotocina como agente inductor de intolerancia a la glucosa

La estreptozotocina es un citotóxico análogo a la glucosa, con afinidad por el GLUT2, mediante el cual entra la STZ, se acumula intracelularmente [83] y finalmente produce necrosis específica de las células β del páncreas[82]. La muerte celular se produce por la fragmentación del ADN, a través de la nitrosourea compuesto que forma parte de la STZ (N-metil-N-nitrosourea)[84]. La

administración de STZ en animales induce citotoxicidad en las células del páncreas y, por lo tanto, hiperglicemia en ratones entre 120 y 200/300mg/dL[82, 83]. Ventura y colaboradores (2011) reportaron que la administración de tres dosis bajas de STZ generaban hiperglicemia intermedia (250-450 mg/dL)[85]; mientras que un esquema de dosis altas de STZ (40-55mg/kg) con una HFD se asemejaba más a Diabetes Mellitus 1 (DM1)[84].

Los ratones con dieta alta en grasas (High fat diet, HFD por sus siglas en inglés) desarrollan obesidad y resistencia a la insulina. Interesantemente, la administración conjunta de STZ en dosis bajas produce la disfunción inicial de las células β y consecuentemente un estado prediabético[84, 86].

Por lo tanto, en los ratones obesos alimentados con HFD aumenta la proporción de macrófagos M1, TNF- α y resistencia a la insulina; mientras que la administración de estreptozotocina produce la disfunción de las células β del páncreas. Estos datos sugieren que los ratones alimentados con HFD y dosis bajas de STZ en ratones podría considerarse un buen modelo murino de resistencia a la insulina e hiperglucemia, en el cual podríamos estudiar el efecto de la administración de macrófagos M2 como tratamiento de la intolerancia a la glucosa

4. HIPÓTESIS

La administración de macrófagos M2 productores de IL-10 en ratones obesos reducirá la intolerancia a la glucosa sin modificar la cantidad de tejido adiposo.

5. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un esquema de inmunoterapia basado en la administración de macrófagos M2 en ratones obesos, como posible tratamiento para el control de la intolerancia a la glucosa.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer un modelo murino de obesidad con desarrollo de intolerancia a la glucosa.
2. Activar macrófagos murinos hacia el fenotipo M2 en condiciones de cultivo *in vitro*.
3. Administrar macrófagos murinos M2 en ratones obesos con intolerancia a la glucosa.

7. ANTECEDENTES Y PLANTAMIENTO DEL PROBLEMA

La intolerancia a la glucosa es un estado de regulación anormal de la glucosa previo al desarrollo de DM2 en sujetos obesos. Alrededor de 70% de los pacientes con IG desarrollarán DM2 y 25% de ellos presentarán enfermedades cardiovasculares. Estas dos enfermedades son las principales causas de muerte en nuestro país.

La intolerancia a la glucosa se ha asociado a un estado de inflamación sistémica de bajo grado en sujetos obesos, con niveles circulantes elevados de TNF- α y niveles disminuidos de IL-10, esta alteración sistémica de los niveles de citocinas pro y anti-inflamatorias favorece la activación de macrófagos inflamatorios M1 en tejido dependientes de la insulina como el adiposo, además disminuye la proporción de macrófagos anti-inflamatorios M2 en este mismo tejido. El TNF- α secretado por los macrófagos M1 tiene un papel importante en la generación de la resistencia a la insulina pues inhibe la fosforilación del IRS-1, impidiendo la activación de la vía de señalización PKC/Akt y la traslocación del transportador de glucosa GLUT4 hacia la membrana de los adipocitos. La alteración de la vía de señalización de la insulina por TNF- α conlleva a resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa, y posteriormente hiperglucemia crónica, hiperinsulinemia, apoptosis de células β pancreáticas y finalmente DM2. Contrariamente, en el tejido adiposo de ratones con peso normal se observa predominio de macrófagos M2 secretores de IL-10, lo cual contribuye a la disminución de los niveles locales de TNF- α y el aumento de la sensibilidad a la insulina en los adipocitos. Por lo tanto, el desbalance de macrófagos M1 y M2 en

tejido insulino dependiente, con la concomitante elevación de TNF- α y disminución de IL-10, parece ser uno de los principales factores que contribuyen a la generación de resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa.

La intolerancia a la glucosa parece ser el producto de un desbalance entre macrófagos M1 y M2, el cual se asocia con mayor secreción local de TNF- α y menor de IL-10 en el tejido adiposo, y consecuentemente aumento de la inflamación, generación de resistencia a la insulina en este tejido y posteriormente intolerancia a la glucosa. En un modelo inflamatorio de insuficiencia renal aguda en ratones, se observó que los marcadores de daño renal, como la creatinina y la urea/nitrógeno sanguíneo, disminuyeron tras a la administración de macrófagos M2[60]. Esta evidencia sugiere que la administración de macrófagos anti-inflamatorios M2 en modelos inflamatorios tiene un papel importante en el restablecimiento de la proporción de los macrófagos M1 y M2, la disminución de la inflamación, de la resistencia a la insulina y finalmente de la intolerancia a la glucosa. Por esta razón consideramos importante restablecer la proporción de macrófagos anti-inflamatorios M2 en el tejido adiposo resistente a la insulina en la intolerancia a la glucosa. Por lo tanto, proponemos que el restablecimiento de la proporción de macrófagos M2, al administrar estas células en ratones obesos podría: aumentar el porcentaje de macrófagos M2 en tejido adiposo, aumentar los niveles de IL-10 en tejido adiposo, disminuir la resistencia a la insulina, y disminuir la intolerancia a la glucosa de manera independiente de la obesidad.

8. METODOLOGÍA

8.1 Generación de un modelo murino con intolerancia a la glucosa.

Los animales fueron provistos amablemente por el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. Se conformaron cuatro grupos de ratones: control (C), obeso (Ob), obeso con dosis bajas de estreptozotocina (Ob+DB), obeso con dosis altas de estreptozina (Ob+DA). Se trabajó con ratones de 4 semanas de edad la cepa C57BL/6, los animales fueron colocados en un cuarto con temperatura constante de 25°C en un ciclo de 12 horas de luz y oscuridad., se les permitió acceso al agua y el alimento *ad libitum*. Por 12 semanas el grupo C se alimentó con dieta normal y los grupos Ob, Ob+DB, Ob+DA con dieta hipercalórica estandarizada basada en 60% de grasa. En la semana 13 se aplicó un esquema bajo y alto de STZ (STZ, MP BIOMEDICALS, Santa Ana, California, USA) en 1 mol/l de buffer de citratos (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), para inducir la deficiencia parcial de las células β del páncreas. Se administraron una dosis cada tercer día de 20 mg/kg y de 40 mg/kg para el esquema bajo y alto, respectivamente. Después de 30 días de la aplicación de STZ se les realizó a todos los grupos una curva GTT. La curva consistió en administrarles 2 mg/g por peso de D-glucosa (Sigma-Aldrich) vía intraperitoneal. Se cuantificó la glucosa a los 0, 30, 60 y 120 minutos con un glucómetro portátil (OneTouch, Johnson & Johnson Medical Devices, Latino América). Se procedió al cultivo de macrófagos para ser inoculados.

8.2 Cultivo y diferenciación de monocitos a macrófagos

Los monocitos se aislaron de la médula ósea de ratones hembras de cuatro semanas de edad, los animales se anestesiaron con pentobarbital y posteriormente se realizó la dislocación cervical. Se procedió a la disección comenzando por la región abdominal, fascia, pared abdominal y cavidad abdominal, se desarticularon los huesos largos como fémur, tibia y peroné, además de la cresta iliaca. Durante la disección también se obtuvieron el húmero, y esternón. A cada hueso se le removió la piel y músculo completamente y se mantuvieron en medio de cultivo (RPMI, hiSFB, 50µg/ml gentamicina, 5.5mM de D-glucosa). Cuidadosamente se les hizo un corte proximal y distal con unas tijeras finas para obtener acceso a los ejes de los huesos. Se sostuvo cada hueso con unas pinzas finas y con una aguja estéril de 28 G de 1ml, que contenía medio estéril se enjuagaron los huesos, se utilizó 3-5ml de medio por hueso. Finalmente cuando el hueso se observaba semitranslúcido se hizo un raspado ligero a lo largo del hueso. El medio obtenido de cada hueso se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos, en cada tubo eppendorf había un concentrado de células, se retiró el sobrenadante, concentrándose todos en uno solo. Se procedió al conteo celular y viabilidad mediante ensayos de incorporación de azul de tripano en cámara de Neubauer

Las células fueron cultivadas en medio RPMI suplementado con suero fetal bovino inactivado por calor (hiSFB) al 10% (Gibco, Thermo Scientific, Hemel Hempstead, UK), 50µg/ml de gentamicina y 5.5mM de D-glucosa (Sigma-Aldrich), en una placa de 6 pozos con una densidad de 3×10^6 y estimuladas con una concentración de

10ng/mL de M-CSF/IL-3 (PeproTech, México) en 37°C, 5% CO₂ para diferenciar macrófagos derivado de monocitos por 72 hrs. Al tercer día se estimularon las células con 10ng/ml IL-4/IL-13 (PeproTech) para activar los macrófagos hacia un fenotipo anti-inflamatorio por 72hrs. El estado de polarización fue verificado a través de ensayos de citometría de flujo.

8.3 Evaluación de marcadores fenotípicos de macrófagos murinos

Los monocitos derivados de médula ósea estuvieron con estímulo de M-CSF/IL-3 para diferenciarlos a macrófagos. Una vez diferenciados, los macrófagos estuvieron con el estímulo de IL-4/IL-13 y polarizaron hacia macrófagos M2. Para verificar el fenotipo de macrófagos así como el anti-inflamatorio M2 se procedió a la inmunodetección por citometría de flujo. Las células adherentes a la placa de cultivo se tomaron como los macrófagos, se colectaron con un cosechador manual de células y se colocaron 50 µL de la suspensión celular conteniendo 1×10^6 células en un tubo eppendorf. Se adiciono 3µl del marcador F4/80 y CD206 unido al Anti-F4/80 Alexa Fluor®647 (BioLegend, San Diego, CA, USA) y Anti-CD206 PE-Cy™7 (BioLegend), se incubaron por 15 minutos a 4°C en oscuridad. Posteriormente, las células se centrifugaron a 2500 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se retiró, el concentrado de células se suspendió en 400µl de PBS1X. Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo (BD FACSCANTO II), se consideraron 10 mil eventos para la población de macrófagos Los resultados se analizaron y expresaron como porcentajes mediante el software Flowjo v10 de FlowJo LLC, Ashland, Oregon, USA.

8.4 Administración de macrófagos anti-inflamatorios M2 en los ratones con intolerancia a la glucosa

Después de 11 semanas de haberles inyectado STZ a los ratones, aquellos con intolerancia a la glucosa se les administraron macrófagos anti-inflamatorios M2. Los macrófagos M2 se colectaron con un cosechador manual de células en un tubo falcon con 25 ml de medio. Se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos y se observó una pastilla en el fondo del tubo falcon, en la campana de extracción se procedió a retirar los sobrenadantes y a evaluar la viabilidad de los macrófagos por exclusión de azul de tripano en cámara de Neubauer. Se administraron 7×10^6 macrófagos M2 en 500 μ l de medio, durante una semana cada tercer día. Después de 7 días de haber administrado los macrófagos, se repitió la GTT en todos los grupos y los ratones fueron eutanizados bajo anestesia y dislocación cervical. El tejido adiposo fue recolectado en tubos eppendorf con TRIzol[®]

9. RESULTADOS

9.1 Características corporales y metabólicas de los ratones obesos con intolerancia a la glucosa

Para determinar si los ratones desarrollaron obesidad, se cuantificó el peso corporal de los ratones alimentados con HFD y tratados con STZ, después de 13 semanas con dieta. Los grupos Ob, Ob+STZ DB, Ob+STZ DA aumentaron el peso corporal en 42%, 50%, y 43%, respectivamente, comparándolo con el grupo control (Fig. 8A). Una vez administrada la STZ, se midió la glucemia en ayuno durante las siguientes tres semanas, no se observó incremento significativo de la glucosa plasmática en ayuno (IFG) (Fig. 8B). Esto podría deberse a que la prediabetes es un estado conformado por dos entidades diferentes, la glucosa alterada en ayuno (IFG) y la intolerancia a la glucosa (IGT), en el cual la alteración de la IFG o la IGT, o ambas, confirma el diagnóstico. La euglucemia de la IFG no descarta la presencia de IGT, por lo tanto, se realizó una GTT para confirmar la intolerancia a la glucosa en los ratones (Fig.9).

La figura 9 muestra la glucemia medida con GTT, en el grupo control se observó aumento considerable de la glucosa en el minuto 30, desde el minuto 60 y hasta el final de la GTT hubo normoglucemia (Fig. 9A). La glucosa aumentó 38% en los 30 y 60 minutos del grupo con obesidad (Ob); interesantemente, a partir de los 90 minutos y hasta el final de la GTT los niveles disminuyeron significativamente (Fig. 9B).

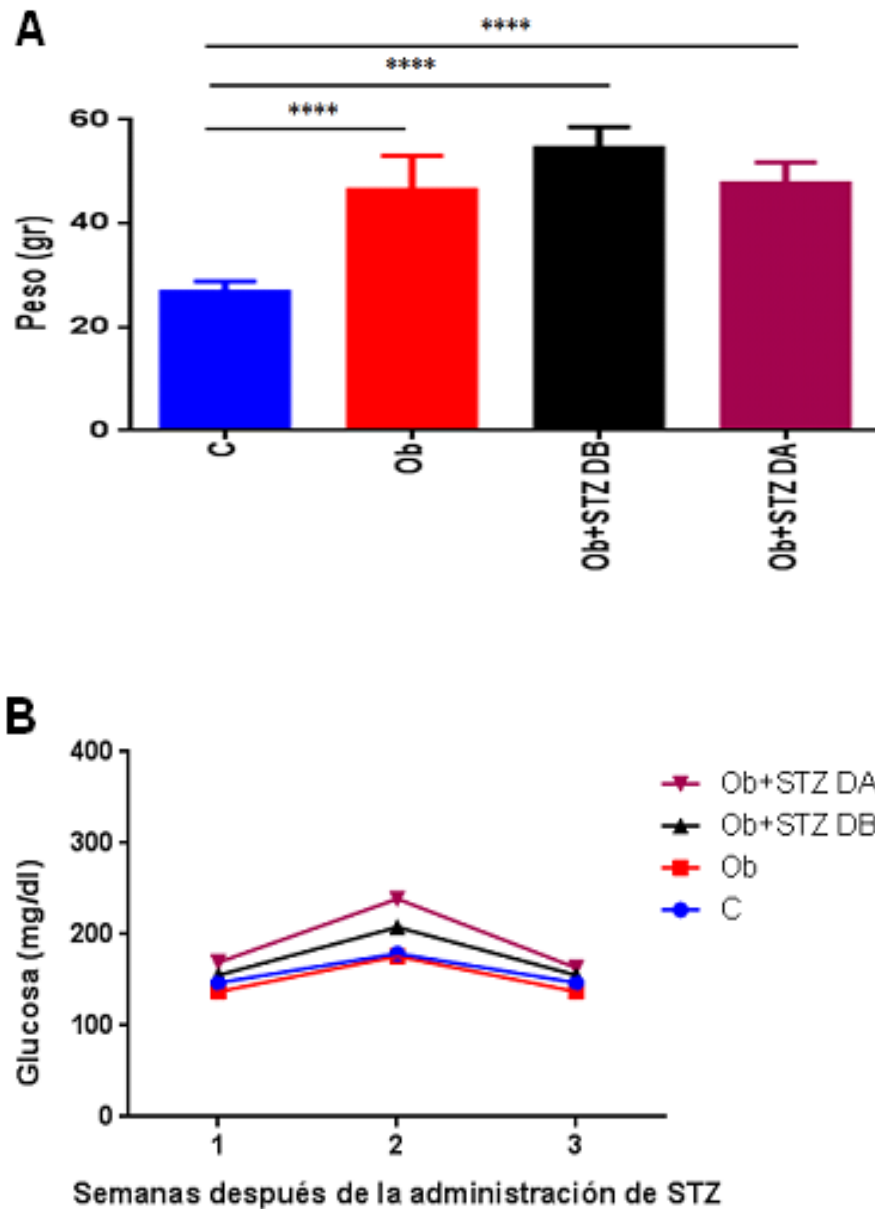


Figura 8. Efecto de la Administración de Estreptozotocina (STZ) en la Glucosa Basal de Ratones Alimentados con una HFD. Los ratones C57BL/6 fueron alimentados con dieta normal o HFD por 12 semanas, la administración de STZ se realizó en la semana 13 de dieta. (A) El Peso corporal 4 semanas después de la aplicación de STZ aumento entre 40-50% en los grupos Ob y Ob+STZ. (n=4-5 ratones/grupo). **** $P < 0.0001$. (B) Glucosa en ayuno posterior a la administración de STZ. (n=4-5 ratones/grupo). $P > 0.05$.

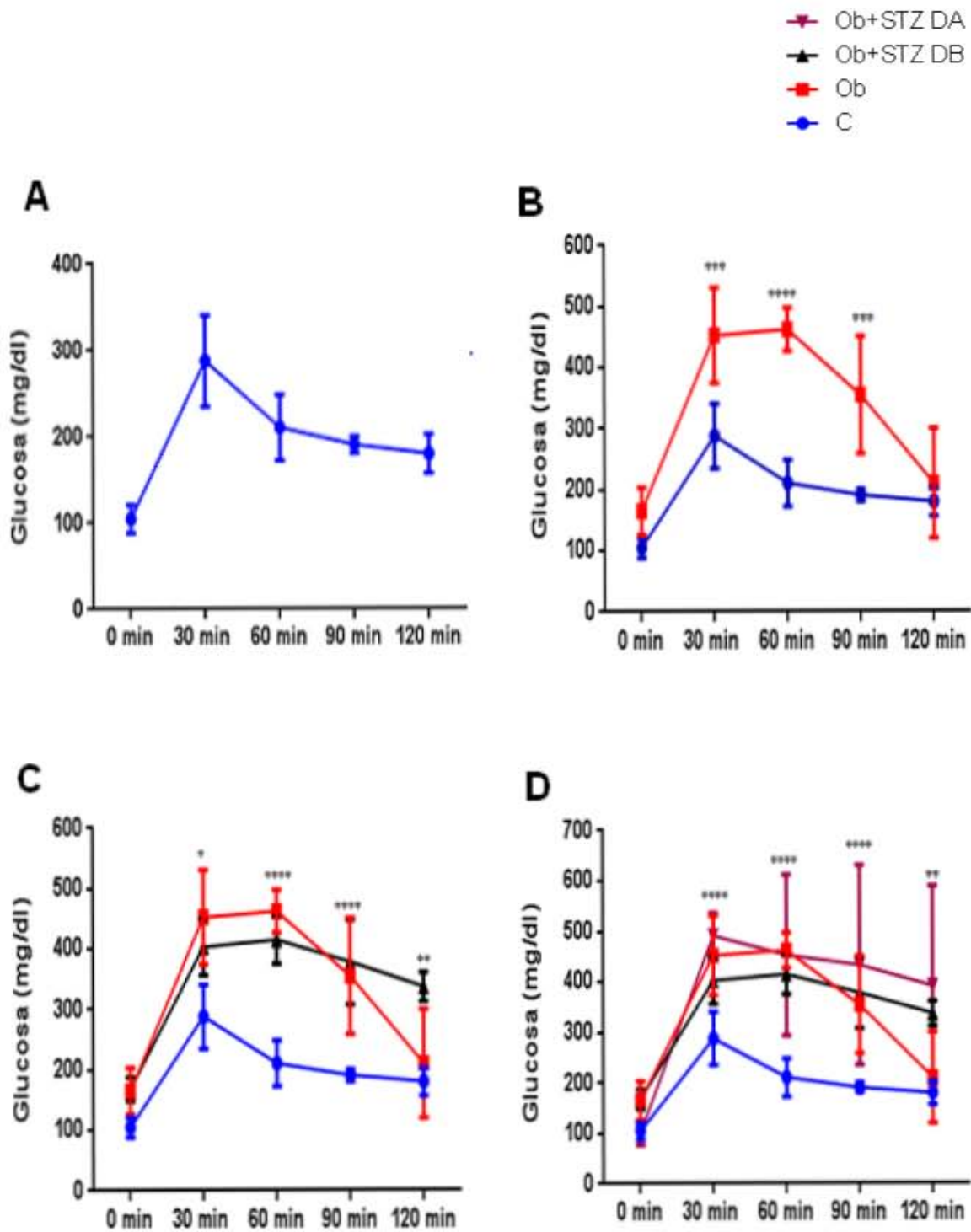


Figura 9. Curva de Tolerancia a la Glucosa (GTT) Después de 4 Semanas con STZ. (A) GTT de ratones alimentados con dieta normal. (B-D) GTT de ratones alimentados con HFD por 16 semanas y tratados con STZ. (B) Ob alimentado solamente con HFD. (C) Ob+ STZ DB, con HFD y esquema bajo de STZ. (D) Ob+ STZ DA, con HFD y esquema alto de STZ. (n=4-5 ratones/grupo). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$.

Estos resultados sugieren que la función pancreática del grupo Ob no está suficientemente afectada para permitir que los ratones obesos tengan normoglucemia a los 120 minutos de la GTT.

Para el desarrollo de hiperglucemia, a los ratones se les administró STZ en dos esquemas, los ratones tratados con esquemas bajo y alto de STZ mostraron incremento significativo de la glucosa a los 30, 60, 90 minutos. De manera importante, en el grupo Ob+ STZ DB y Ob+ STZ DA la glucemia se mantuvo elevada 45% más que el control en la última medición de la GTT (Fig. 9 C y D). Esto muestra que los grupos con STZ no pueden regresar a la normoglucemia por disfunción de las células β del páncreas y, por lo tanto, la generación de intolerancia a la glucosa en este modelo murino.

El modelo de obesidad con intolerancia a la glucosa (IGT) presentaba un aumento de peso corporal del 50%, y había sido tratado con el esquema de dosis bajas de STZ (Fig. 10). Al no haber diferencias significativas con el modelo de dosis altas de STZ, se eligió el de dosis bajas como el modelo murino de intolerancia a la glucosa para realizar los siguientes experimentos, que consistían en la administración de macrófagos M2.

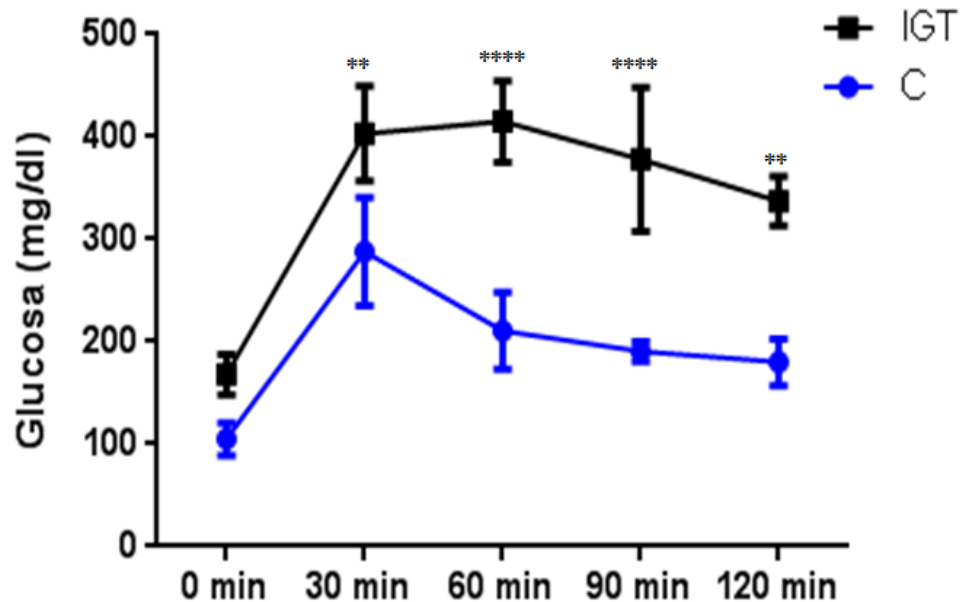


Figura 10. GTT del Modelo Murino de Obesidad con Intolerancia a la Glucosa (IGT). La IGT se evaluó en la semana 16 del experimento. Los ratones fueron tratados con dosis bajas de STZ y una HFD. (n=4-5 ratones/grupo). ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$.

9.2 Cambios morfológicos en la diferenciación de macrófagos murinos

Para la administración de macrófagos M2 se cultivaron células hematopoyéticas de la médula ósea de ratones. Las células fueron estimuladas *in vitro* con IL-3 y M-CSF para diferenciar hacia macrófagos, a las 24 hrs del estímulo no se observaron diferencias morfológicas (Fig. 11A). Los macrófagos estimulados por 72 hrs con IL-3/M-CSF mostraron morfología redondeada y/o fusiforme. Para la activación hacia un fenotipo anti-inflamatorio M2 se utilizaron IL-4/IL-13, después de 72 hrs las células tenían morfología dendrítica, además se encontraron más adheridas a la superficie de la placa de cultivo (Fig.11B y C). Para verificar el inmunofenotipo de las células cultivadas se realizaron ensayos de citometría de flujo.

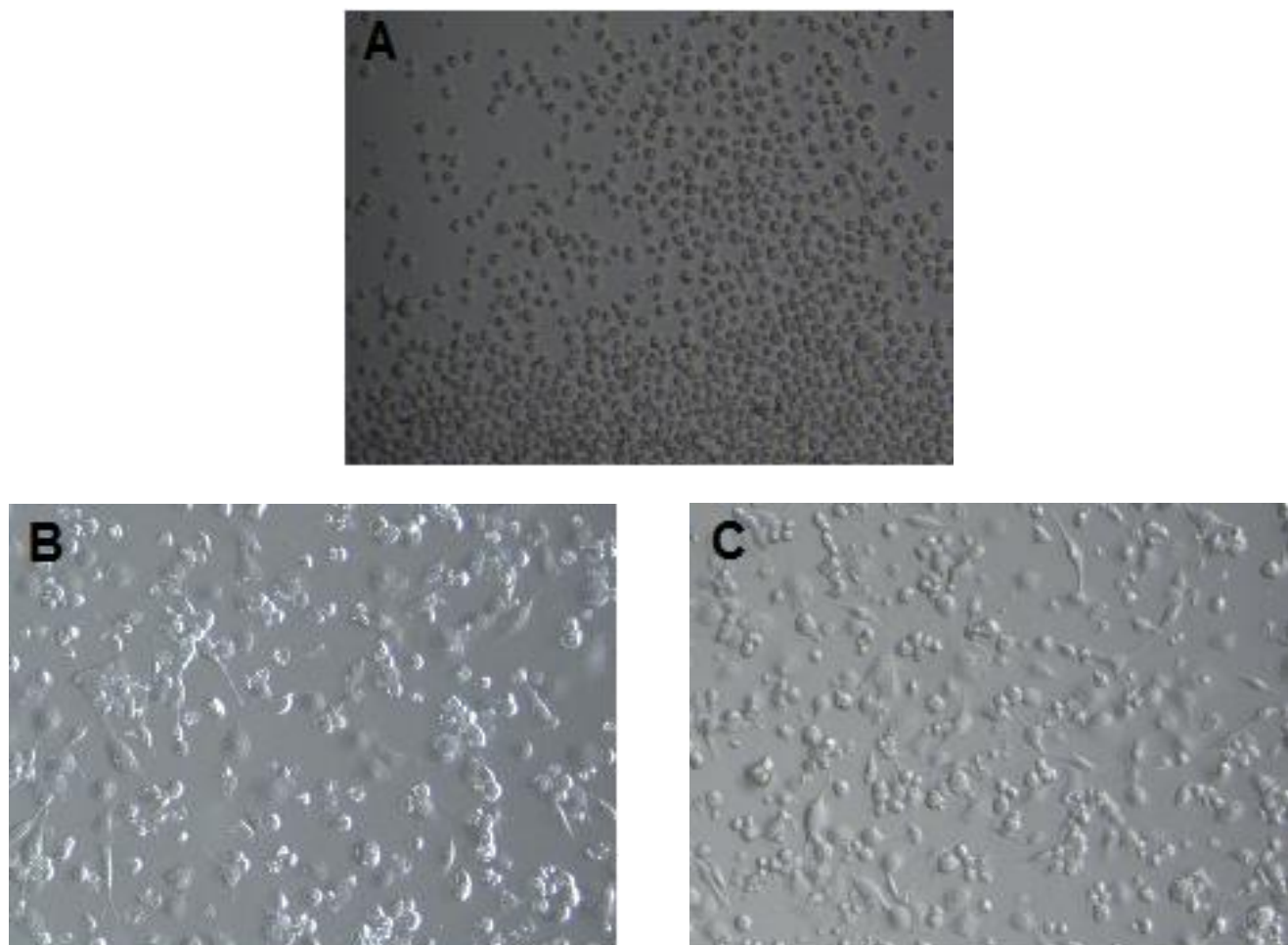


Figura 11. Micrografía de Células Hematopoyéticas en Cultivo *in vitro*. Estimuladas con Citocinas para la Diferenciación y Activación de Macrófagos. (A) Células hematopoyéticas con 10ng/mL de IL-3/M-CSF después de 24 hrs. para diferenciar a macrófagos. (B) Macrófagos estimulados con 10ng/mL de IL-3/M-CSF, después de 72 hrs. (C) Después de 72 hrs con 10ng/mL de IL-4/IL-13 los macrófagos se activaron hacia macrófagos anti-inflamtorios M2, Aumento 10x.

9.3 Marcadores inmunofenotípicos de macrófagos murinos.

Los análisis de citometría de flujo se realizaron en la población de la figura 12, acorde a la literatura pertenece a los macrófagos diferenciados por tamaño y complejidad celular. La población de macrófagos era 45% de las células de acuerdo al tamaño celular relativo (Foward Scatter, FSC por sus siglas en inglés) (Fig. 12A). En la figura 12B se evaluó además la complejidad interna o granularidad (Side Scatter, SSC por sus siglas en inglés), la población de

macrófagos fue 40%. Los siguientes análisis evaluaron la expresión de F4/80 y CD206 se realizaron en el cuadrante correspondiente con la figura 12B.

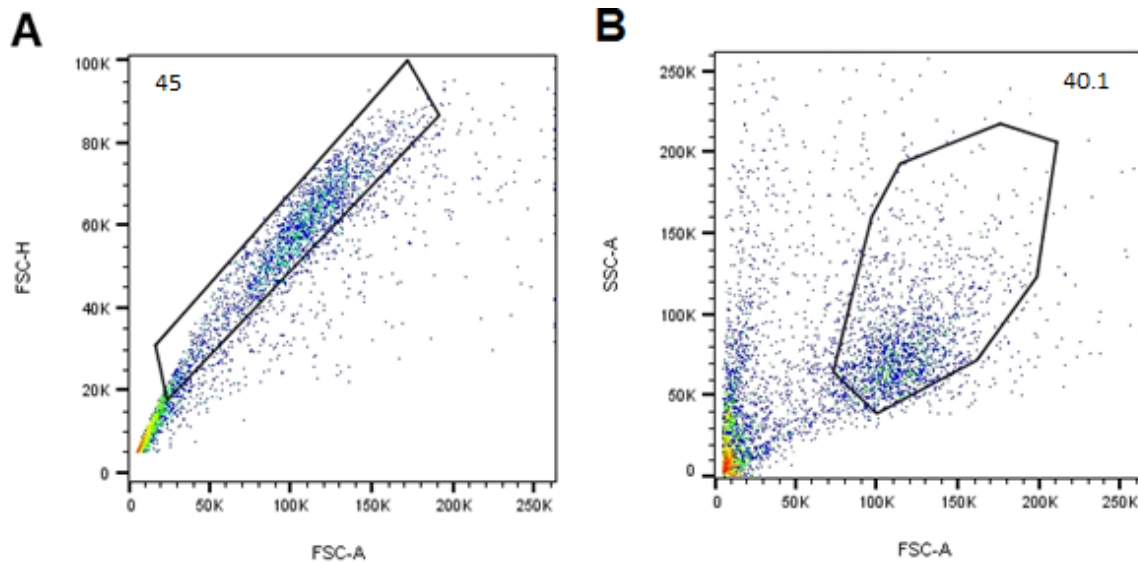


Figura 12. Gráficas de puntos representativas de las poblaciones celulares obtenidas de la médula ósea de ratón. Las poblaciones señaladas en (A, B) corresponden a macrófagos diferenciados. (A) Las células se separaron de acuerdo a su tamaño (FSC-A, FSC-H) (B) y complejidad o granularidad (SSC-A). FlowJo v10 fue el software utilizado para el análisis de datos.

El 91% de los macrófagos derivados de monocitos expresaban F4/80 después de 3 días con estímulo de M-CSF e IL-3. Esto nos sugiere que las concentraciones y el tiempo que utilizamos para la diferenciación son óptimos para obtener macrófagos murinos (Fig.13). El marcador CD206 se expresó en 95% de los macrófagos derivados de monocitos tras ser expuestos a IL-4 e IL-13, por lo tanto la expresión de CD206 orienta que la polarización de macrófagos fue hacia un fenotipo anti-inflamatorio (Fig.14).

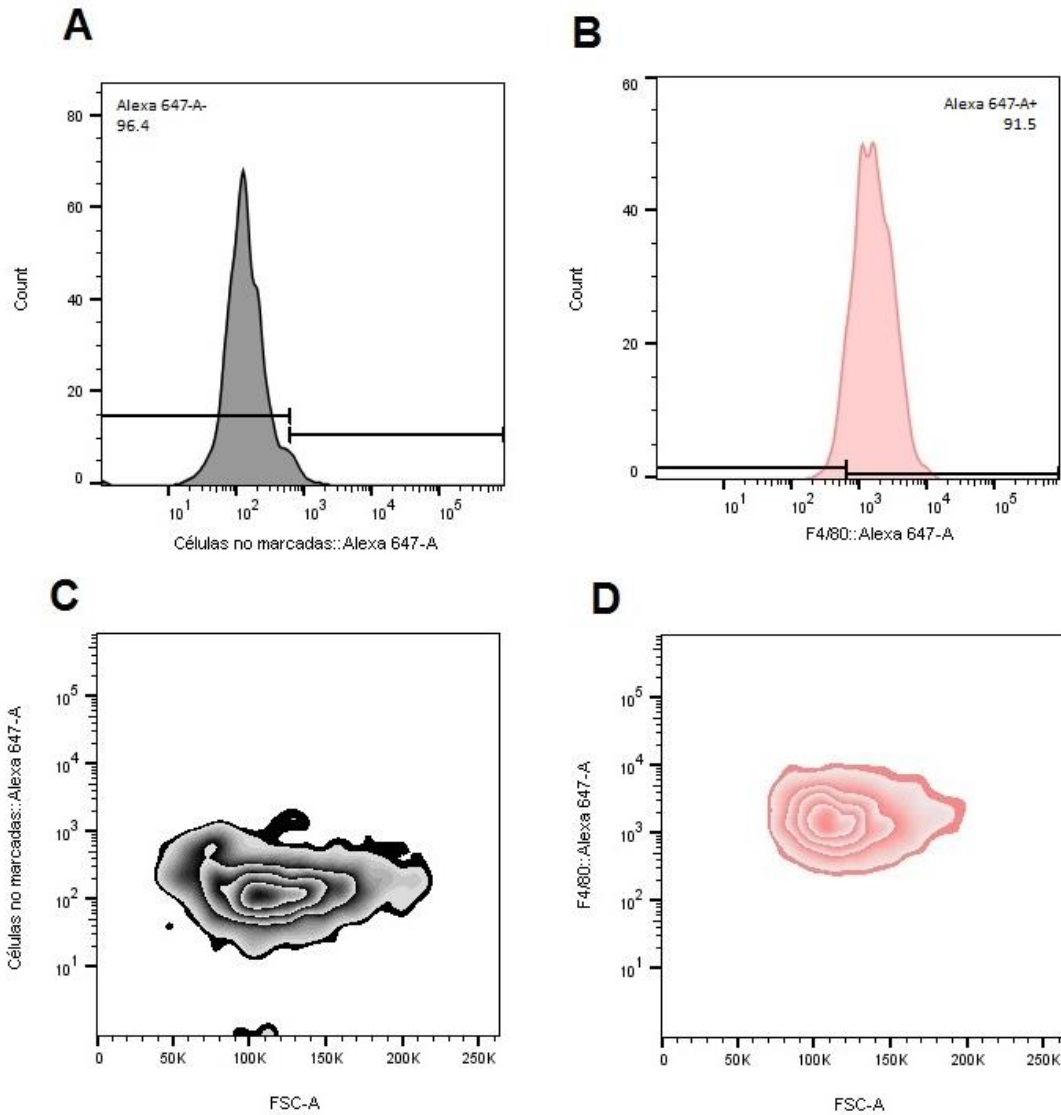


Figura 13. Gráficos representativos de los análisis realizados en macrófagos F4/80⁺ derivados de médula ósea de ratón. (A,B) Histogramas de (A) las células no marcadas con Anti-F4/80 Alexa Fluor@647 y, por ende, son poblaciones celulares negativas de la población de macrófagos, (B) las células que fueron marcadas con Anti-F4/80 Alexa Fluor@647, las poblaciones desplazadas hacia la derecha representan el porcentaje de células marcadas con el respectivo anticuerpo. (C, D) Zebra plot de (C) las células no marcadas, (D) las células marcadas con el anticuerpo F4/80. FlowJo v10 fue el software utilizado para el análisis de datos.

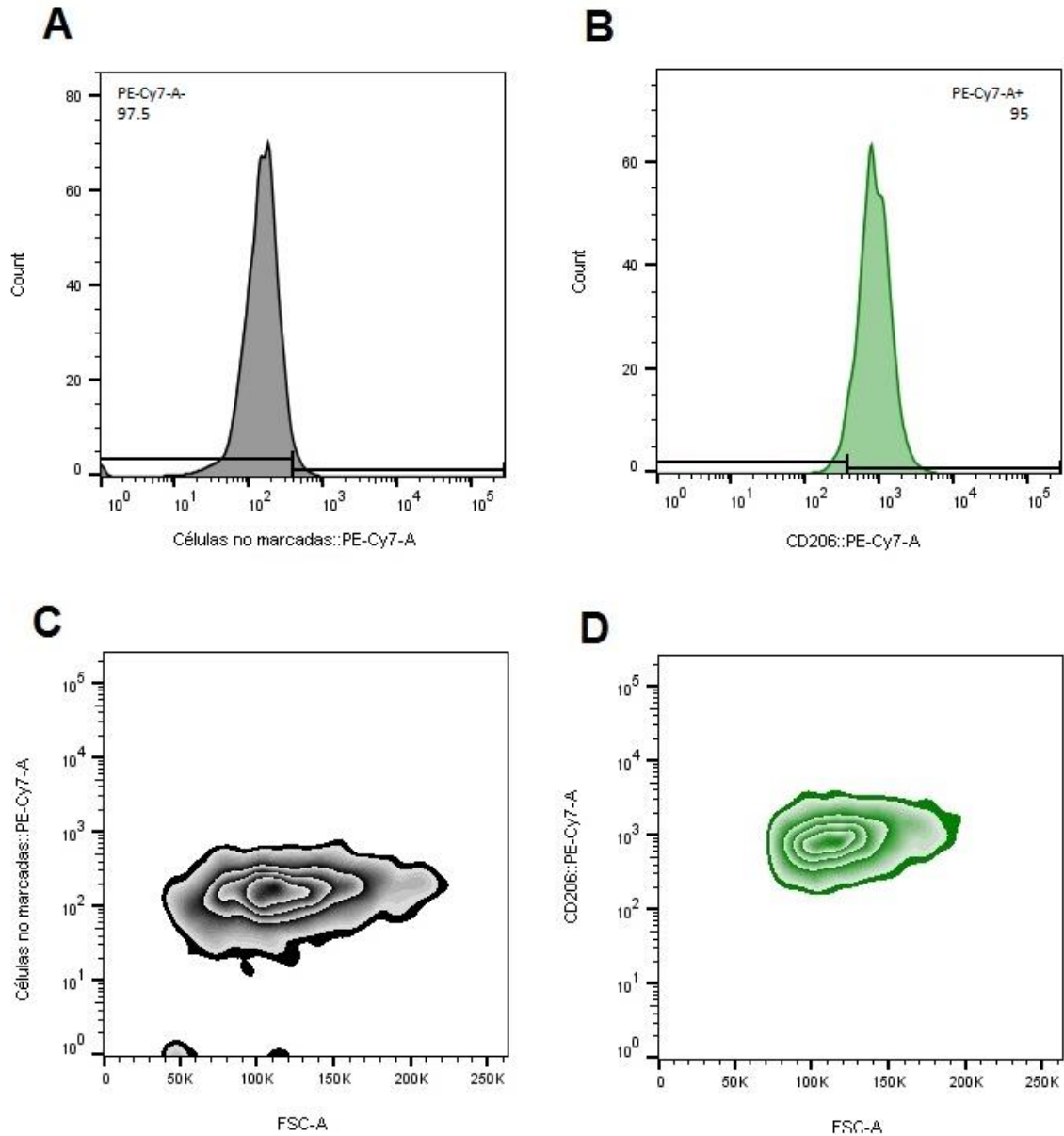


Figura 14. Gráficos representativos de los análisis realizados en macrófagos CD206⁺ derivados de médula ósea de ratón. (A,B) Histogramas de (A) las células no marcadas con Anti-CD206 PE-CyTM7 y, por ende, son poblaciones celulares negativas de la población de macrófagos, (B) las células que fueron marcadas con Anti-CD206 PE-CyTM7, las poblaciones desplazadas hacia la derecha representan el porcentaje de células marcadas con el respectivo anticuerpo. (C, D) Zebra plot de (C) las células no marcadas, (D) las células marcadas con el anticuerpo CD206. FlowJo v10 fue el software utilizado para el análisis de datos.

9.4 Características corporales y metabólicas en los ratones obesos con intolerancia a la glucosa tratados con macrófagos M2.

Los ratones obesos con intolerancia a la glucosa fueron tratados con macrófagos M2, para determinar si esta inmunoterapia celular anti-inflamatoria disminuía la IGT se realizaron GTT, después de nueve días con el tratamiento (Fig. 15).

La Figura 15A muestra el grupo control y el grupo IGT donde se observa y verifica que la glucemia es indicativa de intolerancia a la glucosa. De manera interesante, en el grupo IGT tratado con macrófagos M2 (IGT+M2) la glucemia disminuyó drásticamente: un 89% comparándolo con el control, desde los 30 hasta los 120 minutos de la GTT. Al comparar los ratones IGT con los IGT+M2, se observó disminución de la glucemia del 29-64-67-50%, en minuto 30, 60, 90, 120, respectivamente (Fig. 15B). Se calculó el área bajo la curva (Area under the curve, AUC por sus siglas en inglés) para determinar si la disminución de la glucosa en el grupo IGT+M2 era efecto directo de la administración de macrófagos M2 (Fig. 15C). El AUC de IGT+M2 fue 46% menor que el grupo IGT; de manera más sobresaliente, la AUC del IGT+M2 al compararlo con el grupo C solo fue 3% mayor, por lo tanto, las AUC de estos dos grupos no tuvieron diferencia significativa, mostrando que la glucemia en los ratones tratados disminuyeron hasta ser normoglucémicos. Todos estos datos sugieren que la terapia basada en macrófagos anti-inflamatorios M2 disminuye la intolerancia a la glucosa en un modelo murino.

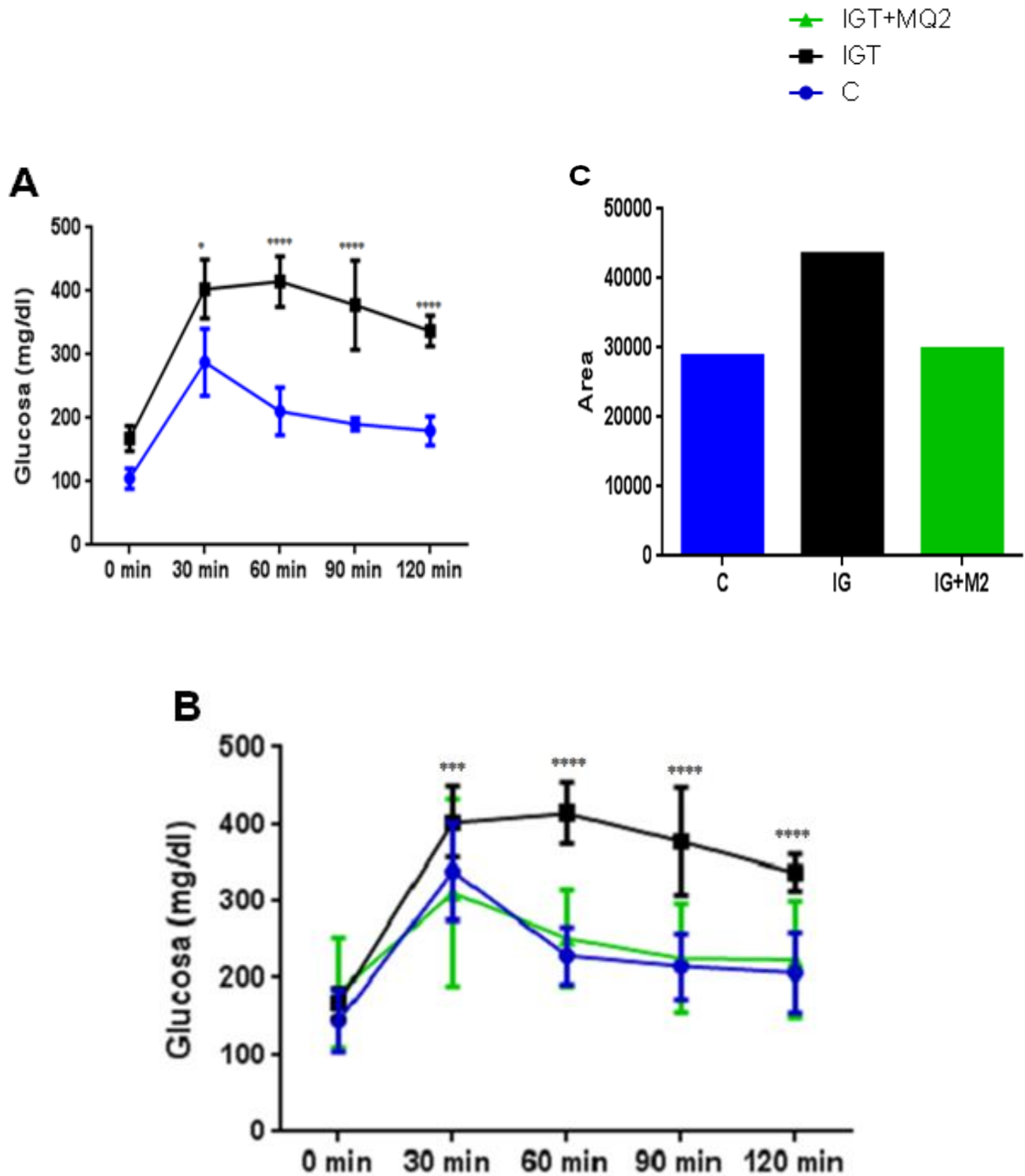


Figura 15. Administración de Macrófagos anti-Inflamatorios M2 en Ratones Obesos con IGT como Tratamiento de la Intolerancia a la Glucosa. Los ratones C57BL/6 fueron alimentados con dieta normal y HFD por 28 semanas, la administración de macrófagos M2 fue a las 26 semanas de dieta. (A-B) Después de 9 días con el tratamiento M2, se evaluó la IGT a través de una GTT. (A) C: ratones alimentados con dieta normal. IGT: ratones alimentados con HFD y con intolerancia a la glucosa (n=4-5 ratones/grupo). * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$. (B) IGT+M2: ratones alimentados con HFD,

intolerancia a la glucosa y tratados con macrófagos M2. En el grupo IGT+M2 los niveles de glucosa disminuyeron 89% respecto al grupo C (n=4-5 ratones/grupo). *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. (C) AUC de grupo C, IGT, IGT+M2.

Para determinar si el tratamiento con macrófagos M2 modificó la adiposidad de los ratones intolerantes, el peso corporal fue evaluado durante el tratamiento con macrófagos y al finalizar el experimento. Al comparar el peso del grupo C, el IGT y el IGT+M2 se observó incremento del 33% desde la semana 8; el incremento del peso corporal se mantuvo todas las semanas del experimento. Después de la administración de macrófagos M2 en la semana 26, el peso corporal disminuyó ligeramente 3% en el grupo IGT+M2, sin ser significativo. (Fig. 16A).

Al finalizar el experimento el peso de los ratones se cuantificó en todos los grupos y no se observaron cambios después de nueve días de tratamiento M2 (Fig. 16B). Por lo tanto, la inmunoterapia de macrófagos M2 disminuyó la intolerancia a la glucosa de manera independiente de la obesidad.

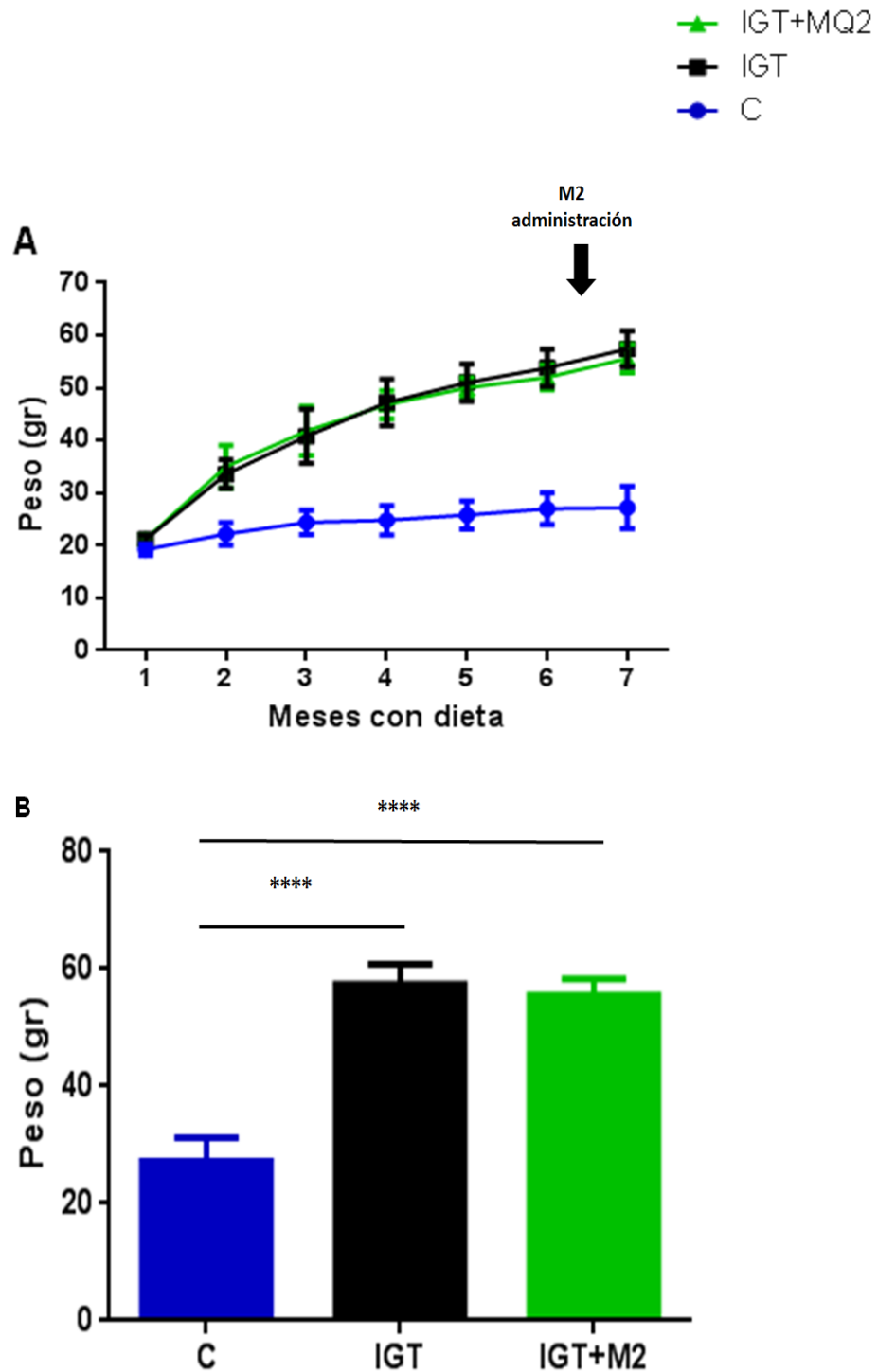


Figura 16. Efecto de la Administración de Macrófagos anti-Inflamatorios M2 Sobre el Peso Corporal de Ratones con Intolerancia a la Glucosa. (A) El peso corporal cambia significativamente desde la semana 8 con HFD, los macrófagos M2 se administraron en ratones IGT en la semana 26 de dieta, no se observa cambios en el peso corporal tras la administración de los macrófagos. (B) El peso final fue 51% mayor en los ratones IGT+M2 después de 9 días con el tratamiento al compararlo con los controles (n=4-5 ratones/grupo). **** $P < 0.0001$.

10. DISCUSIÓN

Se conoce bien que la intolerancia a la glucosa es un estado de hiperglucemia intermedia, caracterizado por resistencia a la insulina y la disfunción de las células β del páncreas, dos eventos patológicos precedidos por la obesidad y por lo tanto de inflamación sistémica de bajo grado. La inflamación observada durante la IGT parece ser resultado del aumento en la proporción de macrófagos pro-inflamatorios secretores de TNF- α , y disminución de macrófagos anti-inflamatorios M2 y de IL-10 en el tejido adiposo. En este estudio se desarrolló y administró una inmunoterapia basada en macrófagos M2 para el tratamiento de la IGT en ratones obesos. Nuestros resultados sugieren que la administración de estas células disminuye la IGT en un modelo murino de obesidad con intolerancia a la glucosa.

Para generar el modelo de intolerancia a la glucosa, utilizamos la combinación de HFD y dosis bajas y altas de STZ. Contrariamente a lo reportado por otros autores, la administración de dosis alta y bajas de STZ generalmente reduce el peso[87], en este estudio la inyección de STZ no redujo el peso corporal. De hecho, el peso de los ratones con STZ y HFD aumento 50% y durante las autopsias realizadas se observó incremento de la adiposidad visceral y retroperitoneal. Consistente con el incremento de peso y adiposidad, los ratones con IGT mostraron hiperglucemia durante la GTT realizada. En diferencia, el grupo alimentado sólo con HFD no desarrolló hiperglucemia, debido a un mecanismo compensatorio de hiperinsulinemia. Estudios previos similares han mostrado el desarrollo de prediabetes con resistencia a la insulina, hiperglucemia y deterioro en la secreción de insulina, al administrar dosis bajas de STZ y HFD, semejante a nuestros resultados no se ha observado hiperglucemia en los ratones alimentados

solamente con HFD[88]. Nosotros reportamos que la administración de HFD y dosis bajas de STZ en ratones, generó un buen modelo de obesidad con intolerancia a la glucosa para estudiar el efecto de la administración de macrófagos M2 en la IGT.

Previo a la administración de macrófagos M2 se realizó la diferenciación de monocitos de la médula ósea a macrófagos con IL-3/M-CSF. Sheng KC y colaboradores (2014) identificaron un papel importante de IL-3 en combinación con M-CSF para mediar la hematopoyesis, estimular la expansión y diferenciación de macrófagos productores de IL-10[89]. En concordancia con este estudio, evidencia experimental mostró que la diferenciación de monocitos a macrófagos se realizó con el estímulo de M-CSF por 3 días[41]. Nosotros encontramos que los macrófagos estimulados con IL-3/M-CSF por 3 días mostraron morfología redondeada y/o fusiforme y aumento considerable del marcador F4/80⁺. Este marcador se ha utilizado en estudios de histología para detectar la acumulación de macrófagos administrados externamente[59]. F4/80 es considerado un marcador universal de macrófagos, por lo tanto al haber incrementó importante de éste en las células, nosotros consideramos que los ensayos realizados para diferenciar monocitos a macrófagos fueron exitosos.

Durante la activación hacia macrófagos M2 las células con IL-4/IL-13 tenían morfología dendrítica y mayor adherencia a la placa de cultivo, después de tres días con el estímulo. En contraste a lo que este estudio reporta, Ploeger et al., sugieren que el estímulo de IL-4/IL-13 con una concentración 5 veces menor a la utilizada en nuestros ensayos, durante 48 hrs puede polarizar a los macrófagos

hacia un fenotipo M2[90]. Semejante a nuestros ensayos, el estímulo con IL-4/IL-13 por tres días polariza a los macrófagos hacia un fenotipo M2, además este subtipo de células mostró mayor expresión de CD206⁺, un sello distintivo de la diferenciación M2[91]. Reportes anteriores muestran que los ATMs CD206⁺ están relacionados con la expresión de genes anti-inflamatorios como IL-10, por lo que CD206⁺ podría considerarse un buen marcador para distinguir macrófagos M2[28].

Evidencia convincente muestra un papel importante de la inflamación por aumento de macrófagos pro-inflamatorios M1 y TNF- α y la concomitante disminución de macrófagos anti-inflamatorios M2, secretores de IL-10, en la patogénesis de la resistencia a la insulina e intolerancia a la glucosa[17]. Lo que llevó a plantearnos el desarrollo de terapias basadas en macrófagos anti-inflamatorios M2, que puedan inhibir los procesos inflamatorios observados en sujetos obesos con intolerancia a la glucosa, al restablecer la proporción de macrófagos M2 y aumento de IL-10. Nuestro estudio mostró que la administración intraperitoneal de macrófagos anti-inflamatorios M2 en ratones obesos con intolerancia a la glucosa, disminuyó la glucemia considerablemente, hasta 89%, en una curva de tolerancia a la glucosa. La administración de macrófagos M2 como terapia anti-inflamatoria ha resultado exitosa en modelos animales de inflamación. Estudios recientes en modelos de EPOC e IRA han mostrado la disminución de la inflamación en los pulmones y del daño tubular en riñones[59, 60]. La administración de etanercept es otro tipo de terapia anti-inflamatoria, utilizada en ensayos clínicos, para bloquear la actividad de TNF- α en humanos; sin embargo, no se ha observado aumentó en la sensibilidad a la insulina[92]. Hong et al.

reportaron que la elevación de los niveles de IL-10 por tratamiento con IL-10 o la sobreexpresión transgénica de IL10 mejora la sensibilidad a la insulina en el músculo esquelético en ratones alimentados con HFD[93]. Los inconvenientes de la terapia farmacológica para la prediabetes, basada en la administración de IL-10, incluyen los riesgos de efectos adversos[94]. Después de una sola dosis de IL-10 se reportó neutrofilia transitoria, linfocitopenia, monocitosis y disminución en los recuentos de plaquetas[95, 96]. Otro estudio en sujetos a los que se les administró una dosis de 100 µg / kg de IL-10 reportó síntomas leves a moderado de un resfriado[97]. Los ensayos clínicos DPP (Diabetes Prevention Program por sus siglas en inglés) y DREAM (Diabetes Reduction Assesment With Rapmipril and Rosiglitazone Medication por sus siglas en inglés) han mostrado la necesidad de medicamentos a largo plazo y, con ello, el incremento del costo del tratamiento[94, 98, 99]. Aún más importante, estos ensayos clínicos muestran que tras retirar los fármacos se vuelve a incrementar la glucemia, lo que sugiere que los medicamentos no cambian la fisiopatología de la prediabetes[98, 99]. La evidencia muestra que el tratamiento con IL-10 en enfermedades crónicas podría tener efectos inmunosupresores y no favorece la supresión de la inflamación a largo plazo[100]. Por lo tanto, el uso de fármacos no se podrían considerar la primera línea de tratamiento en la intolerancia a la glucosa[94]. Por lo que se deben utilizar tratamientos alternativos que cambien la fisiopatología de la intolerancia a la glucosa, para que el efecto a largo plazo se más benéfico en los pacientes. Nosotros creemos que tras la administración de macrófagos M2, incrementaron estas células en el tejido adiposo, se restableció la proporción de macrófagos M2 y

aumentaron los niveles de IL-10 favoreciendo un estado menos pro-inflamatorio en el tejido adiposo de ratones obesos con intolerancia a la glucosa. Por lo tanto, la inmunoterapia basada en macrófagos M2 parece que podría modificar la proporción de macrófagos M2 secretores de IL-10 para disminuir la pro-inflamación, la resistencia a la insulina y finalmente la intolerancia a la glucosa de manera independiente a la obesidad.

Los efectos de la administración de macrófagos M2 a corto plazo parece tener resultados muy favorables al disminuir considerablemente la intolerancia a la glucosa. Por estas razones es de interés e importancia estudiar los efectos a largo plazo de esta inmunoterapia, para establecerla como posible tratamiento de la intolerancia a la glucosa. Uno de los tratamientos que mejores beneficios tiene a largo plazo en la intolerancia a la glucosa es modificar el estilo de vida, al cambiar la hábitos alimenticios e incrementar el ejercicio físico, para finalmente disminuir el peso corporal[94]. En un seguimiento por 6 años, aproximadamente el 50% de los pacientes que disminuyeron el peso corporal disminuyeron la intolerancia a la glucosa[101]. A pesar de los excelentes resultados al disminuir el peso, es importante señalar que estos resultados se han obtenido de ensayos controlados por un equipo multidisciplinario, que constantemente vigila a los pacientes en el seguimiento del tratamiento. Por lo tanto, queda por demostrar si se pueden obtener resultados tan favorables en la práctica clínica habitual en la comunidad[94]. En este estudio la intolerancia a la glucosa disminuyó de manera independiente de la obesidad de los ratones. Interesantemente, después de la terapia con macrófagos M2 el peso corporal no se modificó y aún más importante

9 días después de la terapia el peso de los ratones con IGT+M2 y los ratones IGT eran similares, pero la glucemia disminuyó de manera muy importante en el grupo IGT+M2. Esto sugiere que los ratones IGT+M2 dejaron de ser intolerantes a la glucosa a pesar de seguir siendo obesos, mientras que el grupo IGT continuó con intolerancia a la glucosa.

Estas observaciones confirman el papel potencial de la administración de macrófagos M2 polarizados *in vitro* para disminuir la intolerancia a la glucosa. Nosotros proponemos que un posible mecanismo para tratar la IGT es reestablecer la proporción de macrófagos M1 y M2 en el tejido adiposo de ratones obesos intolerantes a la glucosa. El aumento de macrófagos M2 aumentará los niveles IL-10 que inhibirá la acción de TNF- α , favoreciendo la fosforilación del IRS-1, activando la vía de señalización de la insulina PKC/Akt y la traslocación de GLUT4 hacia la membrana de los adipocitos. La vía de señalización a la insulina en presencia de IL-10 conlleva a disminución de resistencia a la insulina e intolerancia crónica, y posteriormente disminución de la hiperglucemia, de la apoptosis de células β del páncreas y, finalmente, previene el desarrollo de DM2.

En este estudio nosotros demostramos que la administración de macrófagos M2 en el tejido adiposo disminuyó la IGT, en un modelo murino de obesidad con desarrollo de intolerancia a la glucosa, estos hallazgos abren la posibilidad de nuevas opciones terapéuticas para el control de esta patología.

11. CONCLUSIONES

1. Una dieta alta en grasas (HFD) incrementa el peso corporal y la adiposidad en los ratones alimentados con esta dieta y la administración de dosis bajas de STZ promueve disfunción de células β del páncreas.
2. La HFD y la administración de STZ genera un buen modelo murino de obesidad con desarrollo de intolerancia a la glucosa.
3. El estímulo *in vitro* con M-CSF e IL-3 favorece la diferenciación de monocitos a macrófagos y F4/80 es un buen marcador inmunofenotípico para macrófagos derivados de la médula ósea de ratones.
4. La activación de macrófagos *in vitro* al estimular con IL-4 e IL-13 hacia el fenotipo anti-inflamatorio M2 se realizó exitosamente y CD206 es un buen marcador inmunofenotípico de macrófagos M2 derivados de la médula ósea de ratones.
5. El tratamiento con macrófagos M2 en un modelo murino de obesidad con desarrollo de intolerancia a la glucosa parece disminuir la intolerancia a la glucosa, de manera independiente de la obesidad.

12. PERSPECTIVAS

El presente trabajo demuestra que la administración de macrófagos M2 disminuye la IGT en ratones obesos con intolerancia a la glucosa. Sin embargo, el mecanismo a través del cual esto ocurre no ha sido estudiado, los resultados en este estudio sugieren que se podría haber reestablecido la proporción de macrófagos M1 y M2 en el tejido adiposo de los ratones, pero es necesario hacer estudios específicos para conocer si el mecanismo que proponemos mejora la intolerancia a la glucosa. Si bien nuestros resultados han mostrado disminución de la IGT, es importante cuantificar los niveles de insulina para evaluar la resistencia a la insulina y la disfunción de las células β del páncreas, los dos mecanismos fisiopatológicos que promueve la generación de intolerancia a la glucosa. Nosotros sugerimos que tras la administración de macrófagos M2 aumentó la secreción de IL-10, la principal citocina relacionada con la disminución de la resistencia a la insulina, por lo que es necesario cuantificar la expresión de IL-10 y TNF- α en el tejido adiposo. Esto podría orientarnos sobre el funcionamiento de la vía de señalización de la insulina por fosforilación de IRS-1/Akt. Por otra parte, evidencia experimental mostró que la obesidad inducida por HFD polarizó macrófagos anti-inflamatorios M2 hacia un fenotipo pro-inflamatorio M1. Por lo tanto, es necesario evaluar el posible tropismo de los macrófagos M2 administrados en el tejido adiposo de los ratones obesos con IGT, detectando el Corpúsculo de Barr. Una vez evaluados los parámetros mencionados consideramos, importante evaluar el efecto de la terapia basada en macrófagos M2 a largo plazo como posible tratamiento para el control de la intolerancia a la glucosa.

13. LITERATURA CITADAUncategorized References

1. Grundy, S.M., *Pre-diabetes, metabolic syndrome, and cardiovascular risk*. J Am Coll Cardiol, 2012. **59**(7): p. 635-43.
2. Ferrannini, E., et al., *beta-Cell function in subjects spanning the range from normal glucose tolerance to overt diabetes: a new analysis*. J Clin Endocrinol Metab, 2005. **90**(1): p. 493-500.
3. Gong QH, K.J., Ying YY, Li H, Zhang XH, Wu YH, Xu GZ, *Lifestyle Interventions for Adults with Impaired Glucose Tolerance: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Intern Med, 2015. **54**(3): p. 303-310.
4. Meigs JB, M.D., Nathan DM, Blake DR, Andres R and B.L.S.o. Aging, *The Natural History of Progression From Normal Glucose Tolerance to Type 2 Diabetes in the Baltimore Longitudinal Study of Aging*. Diabetes, 2003. **52**(6): p. 1475–84.
5. Ford ES, Z.G., Li C, *Pre-Diabetes and the Risk for Cardiovascular Disease*. Journal of the American College of Cardiology, 2010. **55**(13): p. 1310–7.
6. Nathan DM, D.M., DeFronzo RA, Heine RJ, Henry RR, Pratley R, Zinman B and A.D. Association, *Impaired Fasting Glucose and Impaired Glucose Tolerance*. Diabetes Care, 2007. **30**(3): p. 753-759.
7. Daniele G, A.-G.M., DeFronzo RA., *What are the pharmacotherapy options for treating prediabetes?* Expert Opin Pharmacother, 2014. **15**(14): p. 2003-18.
8. Federation, I.D., *IDF Diabetes Atlas*. 2015: Brussels, Belgium.
9. *National Diabetes Statistics Report:Estimates of Diabetes and its Burden in the United States*. 2014: Atlanta.
10. Dorcelly B, K.K., Jagannathan R, Chiang SS, Oluwadare B, Goldberg IJ, Bergman M, *Novel biomarkers for prediabetes, diabetes, and associated complications*. Diabetes Metab Syndr Obes, 2017. **14**(10): p. 345–361.
11. Park SK, R.J., Oh CM, Choi JM, Choi YJ, Lee KO, Jung JY, *The risk of type 2 diabetes mellitus according to 2-hour plasma glucose level: the Korean Genome and Epidemiology Study (KoGES)*. Diabetes Research and Clinical Practice, 2017. **146**: p. 130-137.
12. Huang Y, C.X., Mai W, Li M, Hu Y, *Association between Prediabetes and Risk of Cardiovascular Disease and All Cause Mortality: Systematic Review and Meta-Analysis.* BMJ (Clinical research ed.), 2016. **355**: p. 1-11.
13. Charfen MA, I.E., Kaji AH, Saleh T, Qazi MF, Lewis RJ, *Detection of undiagnosed diabetes and prediabetic states in high-risk emergency department patients*. Acad Emerg Med, 2009. **16**(5): p. 394-402.
14. Díaz-Redondo A, G.-G.C., Carrillo L, Serrano R, García-Soidán FJ, Artola S, Franch J, Díez J, Ezkurra P, Millaruelo JM, Seguí M, Sangrós J, Martínez-Candela J, Muñoz P, Goday A, Regidor E, *Modifiable risk factors associated with prediabetes in men and women: a cross-sectional analysis of the cohort study in primary health care on the evolution of patients with prediabetes (PRE-DAPS-Study)*. BMC Fam Pract, 2015. **16**(5): p. 1-9.
15. Zhang SY, W.J., Zhou JW, Liang Z, Qiu QY, Xu T, Zhang MZ, Zhong CK, Jiang W, Zhang YH, *Overweight, resting heart rate, and prediabetes/diabetes: A population-based prospective cohort study among Inner Mongolians in China*. Sci Rep. , 2016 **31**(6): p. 1-6.
16. Odegaard JI, C.A., *Mechanisms of macrophage activation in obesity-induced insulin resistance*. Nat Clin Pract Endocrinol Metab, 2008. **4**(11): p. 619-26.
17. Olefsky JM, G.C., *Macrophages, inflammation, and insulin resistance*. Annu Rev Physiol, 2010. **72**: p. 219-46.

18. Buysschaert M, M.J., Bergman M, Shah A, Lonier J., *Prediabetes and associated disorders*. Endocrine, 2015. **48**(2): p. 371-93.
19. DeFronzo, R.A., *Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus*. Med Clin North Am, 2004. **88**(4): p. 787-835, ix.
20. DeFronzo, R.A. and M.A. Abdul-Ghani, *Preservation of beta-cell function: the key to diabetes prevention*. J Clin Endocrinol Metab, 2011. **96**(8): p. 2354-66.
21. Donath MY, S.S., *Type 2 diabetes as an inflammatory disease*. Nature Reviews Immunology, 2011. **11**(2): p. 98–107.
22. Abdul-Ghani, M.A., et al., *Insulin secretion and action in subjects with impaired fasting glucose and impaired glucose tolerance: results from the Veterans Administration Genetic Epidemiology Study*. Diabetes, 2006. **55**(5): p. 1430-5.
23. Abdul-Ghani, M.A., D. Tripathy, and R.A. DeFronzo, *Contributions of beta-cell dysfunction and insulin resistance to the pathogenesis of impaired glucose tolerance and impaired fasting glucose*. Diabetes Care, 2006. **29**(5): p. 1130-9.
24. Cersosimo E, T.C., Solis-Herrera C, et al. *Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus*. 2018.
25. Amano SU, C.J., Vangala P, Tencerova M, Nicoloso SM, Yawe JC, Shen Y, Czech MP, Aouadi M, *Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation*. Cell Metab., 2014. **19**(1): p. 162-171.
26. Kraakman MJ, M.A., Jandeleit-Dahm K, Kammoun HL, *Macrophage polarization in obesity and type 2 diabetes: weighing down our understanding of macrophage function?* Front Immunol, 2014. **5**: p. 1-6.
27. Johnson AR, M.J., Makowski L, *The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity*. Immunol Rev, 2012. **249**(1): p. 218-38.
28. Fujisaka S, U.I., Bukhari A, Ikutani M, Oya T, Kanatani Y, Tsuneyama K, Nagai Y, Takatsu K, Urakaze M, Kobayashi M, Tobe K, *Regulatory Mechanisms for Adipose Tissue M1 and M2 Macrophages in Diet-Induced Obese Mice*. Diabetes, 2009. **58**(11): p. 2574–2582.
29. Wentworth JM, N.G., Brown WA, Doyle L, Phipson B, Smyth GK, Wabitsch M, O'Brien PE, Harrison LC., *Pro-inflammatory CD11c+CD206+ adipose tissue macrophages are associated with insulin resistance in human obesity*. Diabetes. , 2010 **59**(7): p. 1648-56.
30. Ginhoux F, J.S., *Monocytes and macrophages: Developmental pathways and tissue homeostasis*. Nat. Rev. Immunol, 2014. **14**(6): p. 392-404.
31. Ginhoux F, G.M., *Tissue-Resident Macrophage Ontogeny and Homeostasis*. Immunity, 2016. **44**(3): p. 439-449.
32. Gleissner, C.A., *Macrophage Phenotype Modulation by CXCL4 in Atherosclerosis*. Front Physiol, 2012. **3**(1): p. 1.
33. Hume, D.A., *Macrophages as APC and the Dendritic Cell Myth*. The Journal of Immunology, 2008. **181**(9): p. 5829-5835.
34. Wynn TA, C.A., Pollard JW, *Macrophages biology in development, homeostasis and disease*. Nature, 2013. **496**(7446): p. 445-455.
35. Chitu V, S.E., *Colony-stimulating factor-1 in immunity and inflammation*. Current Opinion in Immunology, 2006. **18**(1): p. 39-48.
36. Metcalf D, B.C., Johnson GR, Nicola NA, Lopez AF, Williamson DJ, *Effects of purified bacterially synthesized murine multi-CSF (IL-3) on hematopoiesis in normal adult mice*. Blood, 1986. **68**(1): p. 46-57.
37. Baumeister T, R.S., Pech G, de Bruijn MF, Leenen PJ, Schuler G, Lutz MB, *Interleukin-3R α + myeloid dendritic cells and mast cells develop simultaneously from different bone marrow precursors in cultures with interleukin-3*. J Invest Dermatol, 2003 **121**(2): p. 280-8.

38. Wang M, S.M., Abramowicz S, Murphy AJ, Gonen A, Witztum J, Welch C, Tabas I, Westerterp M, Tall AR, *Interleukin-3/granulocyte macrophage colony-stimulating factor receptor promotes stem cell expansion, monocytosis, and atheroma macrophage burden in mice with hematopoietic ApoE deficiency*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014. **34**(5): p. 976-84.
39. Stöger JL, G.P., de Winther MP, *Macrophage heterogeneity: relevance and functional implications in atherosclerosis*. *Curr Vasc Pharmacol*, 2010. **8**(2): p. 233-48.
40. Martinez FO, G.S., Locati M, Mantovani A, *Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression*. *J Immunol*, 2006. **177**(10): p. 7303-11.
41. Torres-Castro I, A.-C.Ú., Martínez-Reyes CP, Gómez-Arauz AY, Dueñas-Andrade Y, Hernández-Ruiz J, Béjar YL, Zaga-Clavellina V, Morales-Montor J, Terrazas LI, Kzhyshkowska J, Escobedo G, *Human monocytes and macrophages undergo M1-type inflammatory polarization in response to high levels of glucose*. *Immunology Letters*, 2016. **176**: p. 81–89.
42. Gordon S, T.P., *Monocyte and macrophage heterogeneity*. *Nat Rev Immunol.*, 2005. **5**(12): p. 953-64.
43. Roszer, T., *Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms*. *Mediators Inflamm*, 2015. **2015**: p. 816460.
44. Biswas SK, M.A., *Orchestration of metabolism by macrophages*. *Cell Metab.*, 2012. **15**(4): p. 432-7.
45. Chawla, A., Nguyen, K. D., & Goh, Y. P. S., *Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease*. *Nature Reviews. Immunology* 2011: p. 738–749.
46. Lackey DE, O.J., *Regulation of metabolism by the innate immune system*. *Nat Rev Endocrinol*, 2016. **12**(1): p. 15-28.
47. Burke B, G.A., Corke KP, Gill D, Wells M, Ziegler-Heitbrock L, Lewis CE, *Hypoxia-induced gene expression in human macrophages: implications for ischemic tissues and hypoxia-regulated gene therapy*. *Am J Pathol*, 2003. **163**(4): p. 1233-43.
48. Cramer T, Y.Y., Clausen BE, Förster I, Pawlinski R, Mackman N, Haase VH, Jaenisch R, Corr M, Nizet V, Firestein GS, Gerber HP, Ferrara N, Johnson RS, *HIF-1 alpha is essential for myeloid cell-mediated inflammation*. *Cell*, 2003. **112**(5): p. 645-57.
49. Cinti S, M.G., Barbatelli G, Murano I, Ceresi E, Faloia E, Wang S, Fortier M, Greenberg AS, Obin MS, *Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans*. *Journal of Lipid Research*, 2005. **46**(11): p. 2347-55.
50. Strissel KJ, S.Z., Miyoshi H, Perfield JW 2nd, DeFuria J, Jick Z, Greenberg AS, Obin MS, *Adipocyte death, adipose tissue remodeling, and obesity complications*. *Diabetes*, 2007. **56**(12): p. 2910-8.
51. Akira S, U.S., Takeuchi O., *Pathogen recognition and innate immunity*. *Cell*, 2006. **124**(4): p. 783-801.
52. Shi H, K.M., Inouye K, Tzamelis I, Yin H, Flier JS, *TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance*. *J Clin Invest*, 2006. **116**(11): p. 3015-25.
53. Weisberg SP, M.D., Desai M, Rosenbaum M, Leibel RL, Ferrante AW Jr, *Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue*. *Journal of Clinical Investigation*, 2003. **112**(12): p. 1796–1808.
54. Lumeng CN, B.J., Saltiel AR, *Obesity induces a phenotypic switch in adipose tissue macrophage polarization*. *J Clin Invest*, 2007. **117**(1): p. 175-84.

55. Fadini GP, C.R., Mazzucato M, Agostini C, Vigili de Kreutzenberg S, Avogaro A., *Monocyte-macrophage polarization balance in pre-diabetic individuals*. Acta Diabetologica, 2013. **50**(6): p. 977–982.
56. Dey, A., J. Allen, and P.A. Hankey-Giblin, *Ontogeny and polarization of macrophages in inflammation: blood monocytes versus tissue macrophages*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 683.
57. Gordon, S., *Alternative activation of macrophages*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(1): p. 23-35.
58. Hevener AL, O.J., Reichart D, Nguyen MT, Bandyopadhyay G, Leung HY, Watt MJ, Benner C, Febbraio MA, Nguyen AK, Folan B, Subramaniam S, Gonzalez FJ, Glass CK, Ricote M, *Macrophage PPAR gamma is required for normal skeletal muscle and hepatic insulin sensitivity and full antidiabetic effects of thiazolidinediones*. J Clin Invest, 2007. **117**(6): p. 1658-69.
59. Al Faraj A, S.A., Alnafea M, *Intrapulmonary administration of bone-marrow derived M1/M2 macrophages to enhance the resolution of LPS-induced lung inflammation: noninvasive monitoring using free-breathing MR and CT imaging protocols*. BMC Med Imaging, 2015. **15**(16): p. 1-9.
60. Geng Y, Z.L., Fu B, Zhang J, Hong Q, Hu J, Li D, Luo C, Cui S, Zhu F, Chen X, *Mesenchymal stem cells ameliorate rhabdomyolysis-induced acute kidney injury via the activation of M2 macrophages*. Stem Cell Research & Therapy, 2014. **5**(3): p. 2-14.
61. Hotamisligil GS, S.N., Spiegelman BM, *Adipose expression of tumor necrosis factor-alpha: direct role in obesity-linked insulin resistance*. Science, 1993. **259**(5091): p. 87-91.
62. Tornatore L, T.A., Bennett J, Moretti M, Franzoso G, *The nuclear factor kappa B signaling pathway: integrating metabolism with inflammation*. Trends Cell Biol, 2012. **22**(11): p. 557-66.
63. Baker RG, H.M., Ghosh S, *NF- κ B, inflammation, and metabolic disease*. Cell Metab. , 2011 **13**(1): p. 11-22.
64. Hirosumi J, T.G., Chang L, Görgün CZ, Uysal KT, Maeda K, Karin M, Hotamisligil GS, *A central role for JNK in obesity and insulin resistance*. Nature, 2002. **420**(6913): p. 333-6.
65. Gual P, L.M.-B.Y., Tanti JF, *Positive and negative regulation of insulin signaling through IRS-1 phosphorylation*. Biochimie, 2005. **87**(1): p. 99-109.
66. Nandipati KC, S.S., Agrawal DK, *Protein kinases: mechanisms and downstream targets in inflammation-mediated obesity and insulin resistance*. Mol Cell Biochem, 2017. **426**(1-2): p. 27-45.
67. Scher JU, P.M., *15d-PGJ2: the anti-inflammatory prostaglandin?* Clin Immunol. 2005 Feb;114(2):100-9., 2005. **114**(2): p. 100-9.
68. Kris-Etherton PM, H.W., Appel LJ and A.H.A.N. Committee, *Fish consumption, fish oil, omega-3 fatty acids, and cardiovascular disease*. Circulation, 2002. **106**(21): p. 2747-57.
69. Satoh-Asahara N, S.A., Sasaki Y, Nakaoka H, Himeno A, Tochiya M, Kono S, Takaya T, Ono K, Wada H, Suganami T, Hasegawa K, Ogawa Y, *Highly purified eicosapentaenoic acid increases interleukin-10 levels of peripheral blood monocytes in obese patients with dyslipidemia*. Diabetes Care. , 2012 **35**(12): p. 2631-9.
70. Oswald IP, W.T., Sher A, James SL., *Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(18): p. 8676-80.
71. Gérard C, B.C., Marchant A, Abramowicz D, Vandenabeele P, Delvaux A, Fiers W, Goldman M, Velu T, *Interleukin 10 reduces the release of tumor necrosis factor and prevents lethality in experimental endotoxemia*. J Exp Med, 1993. **177**(2): p. 547-50.

72. Udalova IA, K.J., Vidal V, Nedospasov SA, Kwiatkowski D., *Complex NF-kappaB interactions at the distal tumor necrosis factor promoter region in human monocytes*. J Biol Chem, 1998 **273**(33): p. 21178-86.
73. Smallie T, R.G., Horwood NJ, Feldmann M, Clark AR, Williams LM., *IL-10 inhibits transcription elongation of the human TNF gene in primary macrophages*. J Exp Med, 2010 **207**(10): p. 2081-8.
74. Kido Y, N.J., Accili D, *Clinical review 125: The insulin receptor and its cellular targets*. J Clin Endocrinol Metab, 2001. **86**(3): p. 972-9.
75. Stafeev IS, V.A., Ratner EI, Menshikov MY, Parfyonova YV, *Latent Inflammation and Insulin Resistance in Adipose Tissue*. Int J Endocrinol, 2017. **2017**: p. 1-12.
76. Kubota T, K.N., Kadowaki T, *Imbalanced Insulin Actions in Obesity and Type 2 Diabetes: Key Mouse Models of Insulin Signaling Pathway*. Cell Metab, 2017. **25**(4): p. 797-810.
77. Momomura K, T.K., Seyama Y, Takaku F, Kasuga M, *Insulin-induced tyrosine-phosphorylation in intact rat adipocytes*. Biochem Biophys Res Commun., 1988. **155**(3): p. 1181-6.
78. Mackenzie RW, E.B., *Akt/PKB activation and insulin signaling: a novel insulin signaling pathway in the treatment of type 2 diabetes*. Diabetes, metabolic syndrome and obesity : targets and therapy, 2014. **7**: p. 55-64.
79. Vergadi E, I.E., Lyroni K, Vaporidi K, Tsatsanis C, *Akt Signaling Pathway in Macrophage Activation and M1/M2 Polarization*. J Immunol, 2017 **198**(3): p. 1006-1014.
80. Zhou X, S.P., Xu Y, *Spatiotemporal Regulators for Insulin-Stimulated GLUT4*. Journal of Diabetes Research, 2017. **2017**: p. 1-9.
81. Rossetti L, G.A., DeFronzo RA, *Glucose toxicity*. Diabetes Care, 1990. **13**(6): p. 610-30.
82. Damasceno DC, N.A., Iessi IL, Gallego FQ, Corvino SB, Dallaqua B, Sinzato YK, Bueno A, Calderon IM, Rudge MV, *Streptozotocin-Induced Diabetes Models: Pathophysiological Mechanisms and Fetal Outcomes*. BioMed Research International, 2014. **2014**: p. 11.
83. Goyal SN, R.N., Patil KR, Nakhate KT, Ojha S, Patil CR, Agrawal YO, *Challenges and issues with streptozotocin-induced diabetes - A clinically relevant animal model to understand the diabetes pathogenesis and evaluate therapeutics*. Chemico-Biological Interactions, 2016. **244**: p. 49-63.
84. Eleazu CO, E.K., Chukwuma S, Essien UN, *Review of the mechanism of cell death resulting from streptozotocin challenge in experimental animals, its practical use and potential risk to humans*. Journal of Diabetes & Metabolic Disorders, 2013. **12**(1): p. 1-7.
85. Ventura-Sobrevilla J, B.-V.V., Aguilar CN, Román-Ramos R, Vega-Ávila E, Campos-Sepulveda E, Alarcón - Aguilar F, *Effect of Varying Dose and Administration of Streptozotocin on Blood Sugar in Male CD1 Mice*. Proc West Pharmacol Soc, 2011. **54**: p. 5-9.
86. Srinivasan K, P.P., Kaul CL, Ramarao P, *Reversal of glucose intolerance by pioglitazone in high fat diet-fed rats*. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2004. **26**(5): p. 327-333.
87. Beltrand J, B.M., Chevenne D, Sebag G, De Kerdanet M, Huet F, Polak M, Tubiana-Rufi N, Lacombe D, De Paoli AM, Levy-Marchal C, *Metabolic correction induced by leptin replacement treatment in young children with Berardinelli-Seip congenital lipodystrophy*. Pediatrics., 2007. **120**(2): p. 291-6.
88. Kusakabe T, T.H., Ebihara K, Hirata M, Miyamoto L, Miyanaga F, Hige H, Aotani D, Fujisawa T, Masuzaki H, Hosoda K, Nakao K, *Beneficial effects of leptin on glycaemic and lipid control in a mouse model of type 2 diabetes with increased adiposity induced by streptozotocin and a high-fat diet*. Diabetologia, 2009. **52**(4): p. 675-83.

89. Sheng KC, H.L., Taylor A, Hapel AJ, Mahalingam S, *IL-3 and CSF-1 Interact to Promote Generation of CD11c+ IL-10-Producing Macrophages*. PLoS One, 2014. **9**(4): p. 1-7.
90. Ploeger DT, H.N., Schipper M, Koerts JA, de Rond S, Bank RA, *Cell plasticity in wound healing: paracrine factors of M1/ M2 polarized macrophages influence the phenotypical state of dermal fibroblasts*. Cell Commun Signal, 2013. **11**(1): p. 2-17.
91. Rey-Giraud F, H.M., Ries CH, *In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. 1-10.
92. Bernstein LE, B.J., Kim S, Canavan B, Grinspoon SK, *Effects of etanercept in patients with the metabolic syndrome*. Arch Intern Med 2, 2006. **166**(8): p. 908-2.
93. Hong EG, K.H., Cho YR, Kim HJ, Ma Z, Yu TY, Friedline RH, Kurt-Jones E, Finberg R, Fischer MA, Granger EL, Norbury CC, Hauschka SD, Philbrick WM, Lee CG, Elias JA, Kim JK, *Interleukin-10 prevents diet-induced insulin resistance by attenuating macrophage and cytokine response in skeletal muscle*. Diabetes, 2009. **58**(11): p. 2525-35.
94. Pour OR, D.-J.S., *Prediabetes as a therapeutic target*. Clin Chem, 2011. **57**(2): p. 215-20.
95. Huhn RD, R.E., Gallo J, Afrime MB, Sabo R, Gonyo G, Monge A, and Cutler DL, *Pharmacodynamics of subcutaneous recombinant human interleukin-10 in healthy volunteers*. Clin Pharmacol Ther, 1997. **62**(2): p. 171–180.
96. Huhn RD, P.K., Radwanski E, Clarke L, Sabo R, and Cutler DL, *Effects of single intravenous doses of recombinant human interleukin-10 on subsets of circulating leukocytes in humans*. Immunopharmacology, 1999. **41**(2): p. 109–17.
97. Moore KW, d.W.M.R., Coffman RL, O'Garra A, *Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor*. Annu Rev Immunol, 2001. **19**: p. 683-765.
98. Diabetes Prevention Program Research, G., *Effects of withdrawal from metformin on the development of diabetes in the diabetes prevention program*. Diabetes Care, 2003. **26**(4): p. 977-80.
99. Hanley AJ, Z.B., Sheridan P, Yusuf S, Gerstein HC and D.R.A.W.R.a.R.M.D. Investigators, *Effect of Rosiglitazone and Ramipril on {beta}-cell function in people with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: the DREAM trial*. Diabetes Care, 2010. **33**(3): p. 608-13.
100. Asadullah K, S.W., Volk HD, *Interleukin-10 therapy--review of a new approach*. Pharmacol Rev, 2003. **55**(2): p. 241-69.
101. Eriksson KF, L.F., *Prevention of type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus by diet and physical exercise. The 6-year Malmö feasibility study*. Diabetologia, 1991. **34**(12): p. 891-8.

14. APÉNDICE A. Capítulo de Libro.

1. José Israel León Pedroza, Adriana Pérez Gómez, **Diana Vega Galaviz**, Diana Castellanos Rodríguez, Antonio González Chávez and Galileo Escobedo. Inflamación sistémica y enfermedad metabólica: de la descripción molecular a la aplicación clínica en Síndrome metabólico. González Chávez, A. Editor. Intersistemas 2015, México ISBN: 9786074435474 Quinta edición.

Inflamación sistémica y enfermedad metabólica

José Israel León Pedroza,^{1*} Adriana Pérez Gómez,^{2*} Diana Vega Galaviz,^{2*} Diana Castellanos Rodríguez,¹ Antonio González Chávez¹ y Galileo Escobedo²

¹Servicio de Medicina Interna, Hospital general de México "Dr. Eduardo Liceaga"

²Unidad de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga"

*Estos autores contribuyeron de igual manera en este trabajo.

Autores de Correspondencia: Dr. Antonio González Chávez (antglez51@yahoo.com.mx) y Dr. Galileo Escobedo (gescobedo@unam.mx).

RESUMEN

La obesidad y las enfermedades crónicas no transmisibles están caracterizadas por la elevación sérica de biomarcadores inflamatorios, activación de la respuesta inmune celular sin los mecanismos efectores de daño tisular característicos de la inflamación aguda y respuesta autoinmune a un proteoma químicamente ampliado como consecuencia de las alteraciones metabólicas; todo esto en un contexto donde los mecanismos de resolución de la inflamación se encuentran alterados. Diversos autores han propuesto el término "metainflamación" para referirse a la inflamación que subyace a la obesidad y que se produce a partir de activación de receptores de superficie o intracelulares por ligandos endógenos metabólicos y se perpetúa por la inflamación tisular en tejido adiposo, hepático o páncreas. La investigación sobre los mecanismos inmunológicos presentes en las enfermedades cardiovasculares y metabólicas tales como dislipidemia, diabetes tipo 2, hipertensión arterial sistémica y aterosclerosis, se ha incrementado a pasos agigantados durante los últimos años. Esto permitirá caracterizar nuevos biomarcadores dando sustento al desarrollo de nuevas terapias anti-inflamatorias, lo cual podría impactar positivamente en la prevención, la detección oportuna y el control de estos problemas de salud.

15. APÉNDICE B. Congresos.

1. Ramírez-Mendoza A, Galicia-Moreno M, Arévalo-Sánchez T, Ávila-Medina Z, Moreno-González J, Pérez-Gómez A, Rodríguez-Orihuela DL, Romero-Bello, Rosique-Oramas Dorothy, **Vega-Galaviz D**, Pérez-Torres A, Escobedo G, Guzmán C, Gutiérrez-Reyes G. HISTOLOGICAL CHANGES IN THE LIVER ASSOCIATED TO OBESOGENIC DIET AND CHRONIC ALCOHOL INTAKE IN MICE. XI Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Hepatología. ANNALS OF HEPATOLOGY, 2016; 15(4); 619-655.

16. APÉNDICE C. Estancia de investigación.

1. Estancia de investigación, para estudiar la relación de las células mesenquimales derivadas de tejido adiposo (ASC) y su efecto en la polarización de los macrófagos pro-inflamatorios M1 de pacientes con Diabetes Mellitus 2, bajo la supervisión del Dr. Marco Harmsen. CAVAREM, Agosto 2017-Noviembre 2017. The University Medical Center Groningen and the Graduate School for Medical Sciences, University of Groningen, Países bajos.

University Medical Centre Groningen Department of Pathology & Medical Biology

To Whom it may concern

Geneva, 31th May, 2017

Concerns: invitation letter

To Whom it may concern:

With this letter, I invite Ms. Diana Vega Galaviz with CVU 696944 to perform a research internship in my research group, also on behalf of the University Medical Center Groningen and the Graduate School for Medical Sciences. This will be embedded in the ongoing research collaboration between prof.dr. Galileo Escobedo (Unidad de Investigación en Medicina Experimental, Facultad de Medicina Universidad Nacional Autónoma de México, Hospital General de México "Dr. Eduardo Liceaga") and myself on the mechanisms underlying pathological immunity of adipose tissue in diabetes and obesity. Ms. Vega will be learn and master novel research techniques and present her research data in our group and department. Her stay will be from August 14th to November 29th, 2017. The results will not only contribute to the Master thesis of Ms Vega, but also support an application for a Sandwich PhD between UNAM (Escobedo) and UMCG (Harmsen). I look forward to a fruitful internship.

Sincerely,

Martin C. Harmsen
Principle Investigator



Prof. Dr. Martin (Marco) C. Harmsen PhD
Lab for Cardiovascular Regenerative Medicine (CAVAREM)

Department of Pathology and Medical Biology
University Medical Center Groningen
Hanzeplein 1, EA11
NL-9713 GZ Groningen
the Netherlands



**Medical
Biology**

tel +31 50 3614776
fax +31 50 3619911
mobile +31 654727705
website www.cavarem.eu

Adipose Stem Cells attenuates inflammation in hyperglycemia state by remodeling macrophages phenotype

M.D. Diana Vega Galaviz

Supervisor Prof. Dr. Martin C. Harmsen PhD, Internship at Department of Pathology and Medical Biology, University Medical Center Groningen (UMCG).

INTRODUCTION

Diabetes mellitus (DM) is a serious public health problem and is one of the most common lifelong chronic diseases worldwide characterized by glucose levels ≥ 126 mg/dl. Obesity is the main modifiable risk factor involved in DM development. Obesity often presents with clinical problems if the body mass index (BMI) increases above 30 kg/m².^{1,2} Emerging evidence has now suggested that obesity is a state of systemic inflammation characterized by high serum levels of pro-inflammatory cytokines including tumor necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin1 β (IL- β), as well as low circulating values of anti-inflammatory mediators such as IL-10.^{3,4} This unbalance of systemic levels between pro and anti-inflammatory cytokines causes an alteration in the populations of macrophages at the. During increased obesity, the number of pro-inflammatory macrophages (also referred to as M1 macrophages) is increased in visceral adipose tissue (VAT) of obese mice and humans, while the number of anti-inflammatory (M2) macrophages is reduced.^{5,6} In the VAT of obese subjects, local M1 macrophages overproduce IL-1 β and TNF- α that contribute to insulin resistance. These pro-inflammatory cytokines inhibit the phosphorylation/activation of the insulin receptor substrate 1 (IRS-1) while TNF- α also protein kinase C (PKC) and protein kinase B (Akt) activation. The next effect is the arrest of the translocation of glucose transporter proteins from the cytosol to the cell membrane, which in turn insulin resistance increases.^{4,7} The long-term exposure of white fat adipocytes to increased levels of TNF- α M1 macrophage-derived causes a persistent insulin resistance state as well as transient and chronic hyperglycemia, hyperinsulinemia, apoptosis of pancreatic β cells, which finally results in type 2 diabetes (T2D).

Adipose-derived stem cells (ASC) have been described to support tissue repair while also modulate the immune response.⁸ A recent work has reported that administration of exogenous ASC decreases the level of TNF- α while also increases IL-10 in white adipose tissue of obese mice by promoting M1 macrophages to shift towards a M2 phenotype.⁹ In this sense, Bernardo and coworkers have found that IL-6, indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO), prostaglandin E2 (PGE2) levels from ASC are in turn capable of polarizing macrophages towards a M2 profile.^{10,11,12}

Taking all this information into account, ASC seem to have an immunological function by promoting the polarization of M1 macrophages towards M2 phenotype, which has led to propose the existence of a compensatory mechanism to promote switching of inflammatory macrophages towards anti-inflammatory macrophages.

Research question

Can ASC modify the phenotype of inflammatory M1 macrophages towards anti-inflammatory M2 macrophages in hyperglycemia?

Hypothesis

Subcutaneous adipose tissue ASC can modify the phenotype of pro-inflammatory M1 macrophages towards anti-inflammatory M2 macrophages in hyperglycemic conditions *in vitro*.

Main goal

To evaluate the ASC effect into the polarization of pro-inflammatory M1 macrophages towards anti-inflammatory M2 macrophages in hyperglycemic conditions.

Concrete goals

1. To culture monocytes from the THP1 cell line.
2. To differentiate macrophages from the THP-1 and polarize toward M1 or M2 phenotype.
3. To evaluate the mRNA expression of pro-inflammatory, anti-inflammatory cytokines and M2 markers.
4. To culture macrophages M1 and M2 in the hyperglycemic supernatants from the ASC.

Material and Methods

THP1 culture and macrophages differentiation.

The THP1 cells were cultured in RPMI 1640 (Lonza Biowhittaker Verviers, Belgium), supplemented with 10% heat inactivated fetal bovine serum, FBS (Thermo Scientific, Hemel Hempstead, UK), 100 U/mL penicillin, 100 mg/mL streptomycin (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA) and 2 mM L-glutamine (Lonza Biowhittaker, Verviers, Belgium). After 4 days, THP1 were cultured in a 24 well plate with densities from 200×10^5 , 400×10^5 , 800×10^5 , 1×10^6 cells/cm². The cells were stimulated with M-CSF (PeproTech, Rocky Hill, USA) in 3 different concentrations, 10ng/ml, 0.01ng/ml, 0.00001ng/ml at 37°C, 5% CO₂. At day 3, culture medium was removed and changed with medium plus M-CSF. At day 6, macrophages (adherent cells) were washed with PBS1x and not stimulated (control) or stimulated in culture medium with 50ng/ml LPS (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), 20ng/ml IL-4/IL13 (PeproTech, Rocky Hill, USA) at 37°C for 48 h to pro-inflammatory and anti-inflammatory phenotype, respectively. The polarization state of the macrophages was determined by quantitative RT-PCR (qRT-PCR). THP1 were cultured in a second 24 well plate with a density of 400×10^5 cells/cm² and stimulated with 100ng/ml Phorbol 12-myristate 13-acetate, PMA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) at 37°C, 5% CO₂. After 72 h, cells were washed and stimulated with LPS, IL-4/IL-13 as described previously, or not stimulated, in order to polarized macrophages to pro-inflammatory or anti-inflammatory state, for 48 h. The macrophages were also collected for test the polarization state by qRT-PCR.

Evaluation of mRNA expression by qRT-PCR.

Total RNA was isolated from the cells using TRIzol® reagent (InvitroGen, Carlsbad, CA) in accordance to the manufacturer's protocol, concentration and purity were determined by UV spectrophotometry (NanoDrop Technologies, Wilmington, NC). qRT-PCR analysis, total RNA was reverse transcribed using the First Strand cDNA synthesis kit (Fermentas UAB, Lithuania) in accordance to the manufacturer's protocol. Quantification of gene expression was performed using qRT-PCR analysis in a final reaction volume of 10 µl, formed by 5µl of 1× SYBR Green Supermix (BioRad, Richmond, CA), 6 µM primer mix (forward and reverse) and 5µl of 10ng cDNA. The CT values were normalized to GAPDH as a reference gene using the ΔCT method, normalizing for the expression of the reference gene and related to the control treatment. All cDNA samples were amplified in duplicate.

Macrophages culture with hyperglycemic ASC supernatants.

ASC primary isolation and culture were from lipoaspirates as it has been described previously¹⁴. ASCs were cultured in DMEM 1g/l or 4.5g/l (Lonza Biowhittaker, Verviers, Belgium), 10% FBS (Thermo Scientific, Hemel Hempstead, UK), 1% Penicillin/Streptomycin, P/S (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA) and 1% L-glutamine (Lonza Biowhittaker, Verviers, Belgium) from 3 different donors in high and low glucose conditions. Once the confluence was enough ASCs were split and pooled in high and low glucose conditions. Low and high glucose DMEM from ASCs was changed for RPMI 1640 (10% heat inactivated FBS, 1% P/S and 1% L-glutamine) with 11mM or 25mM, respectively. After 24 h, culture medium was collected and refresh RPMI medium, the procedure was repeated it and both times were mixed, filtered and stored in -20°C. THP1 cells were cultured for duplicate in 3 different T75 flask with a density of 7×10^3 cells/cm² and stimulated with 100ng/ml PMA at 37°C, 5% CO₂ for 72 h. At day 3, cells were washed and stimulated with LPS or IL-4/IL-13 for 48 h, the third flask did not receive stimulus. The condition medium from macrophages was changed with RPMI medium 11Mm (LG) and 25 Mm (HG) previously collected. After 72 h, macrophages were detached with 0.05% Trypsin, 2mM EDTA in PBS, centrifuged at 1600 rpm for 5 min, removed and discarded cell culture medium, the cell pellet obtained was lysed with TRIzol®. The switch of macrophages phenotype due to ASC condition medium was evaluated by qRT-PCR.

RESULTS



Figure 1. Monocyte culture from the THP-1 cell line.

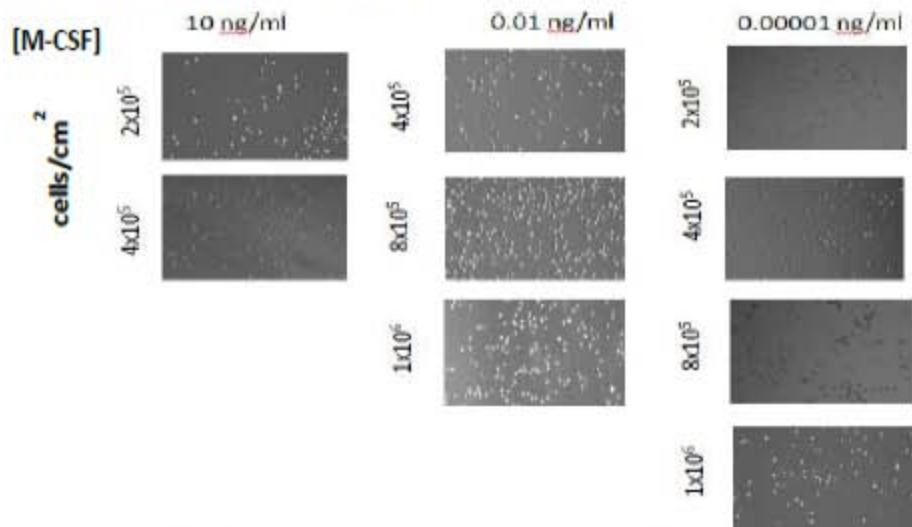


Figure 2. Characterization of THP1 with different densities after 6 days and the stimulus of M-CSF to differentiate

macrophages. After stimulation with M-CSF, macrophages did not show a dendritic morphology. At day 6 cells with a higher density (8×10^5 , 1×10^6 cells/cm²) and 10ng/ml M-CSF were dead. In the case of cells with a density of 2×10^5 cells/cm², 0.01ng/ml M-CSF it was not possible to take a picture.

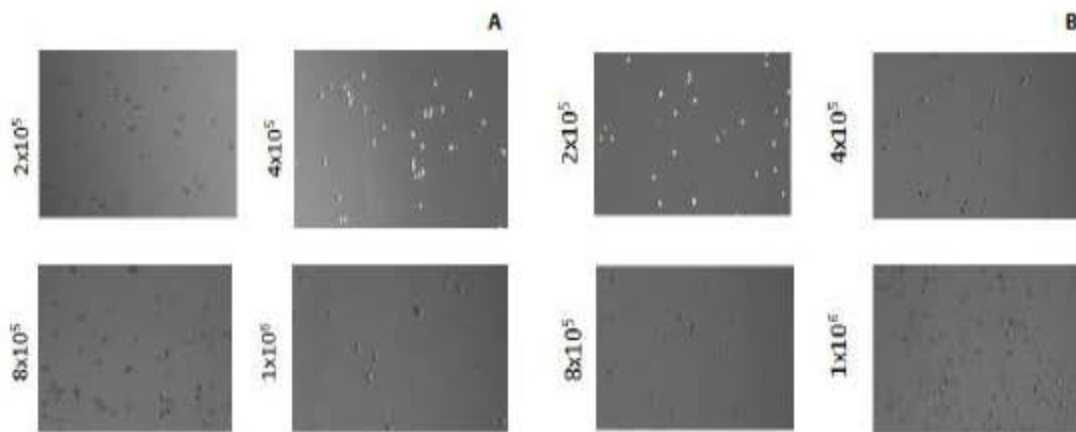


Figure3. Characterization of macrophages after M1 or M2 polarization, after stimulation with LPS, IL-4/IL-13 macrophages did not show a dendritic morphology but they were more attached to the plate surface. (A) Macrophages after 48 hrs with 50ng/ml lipopolysaccharide (LPS) to polarize toward M1. (B) Macrophages after 48 hrs with 20ng/ml IL-4/IL-13 to polarize toward M2.

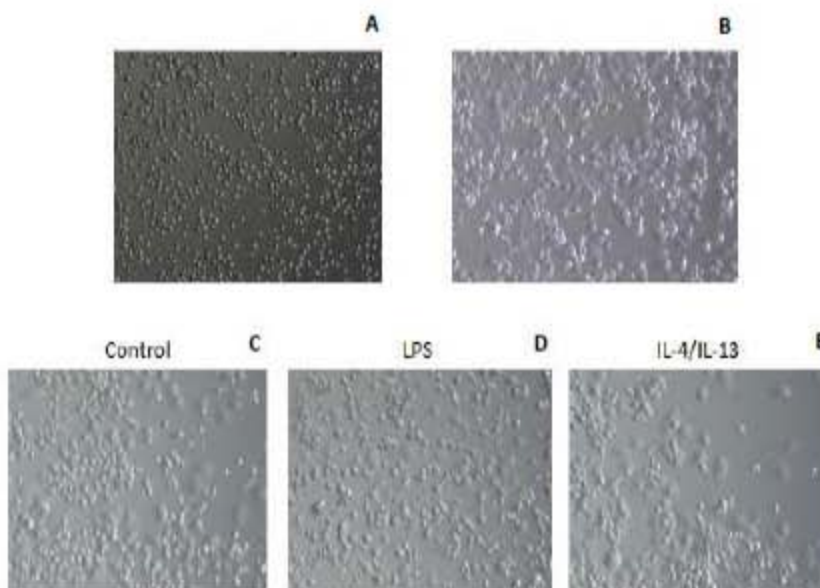


Figure4. Characterization of THP1 with the stimulus of PMA to differentiate macrophages. THP1 with PMA stimulus to differentiate macrophages. (A) THP1 after 24 hrs with PMA. (B) THP1 after 72 hrs with PMA showed a rounded and/or spindle-shaped morphology and the cells were more attached to the surface plate. (C) unstimulated macrophages (control). (D, E) After 48 h of stimulation with LPS, IL-4/IL13 M1 or M2 macrophages, respectively showed a dendritic morphology.

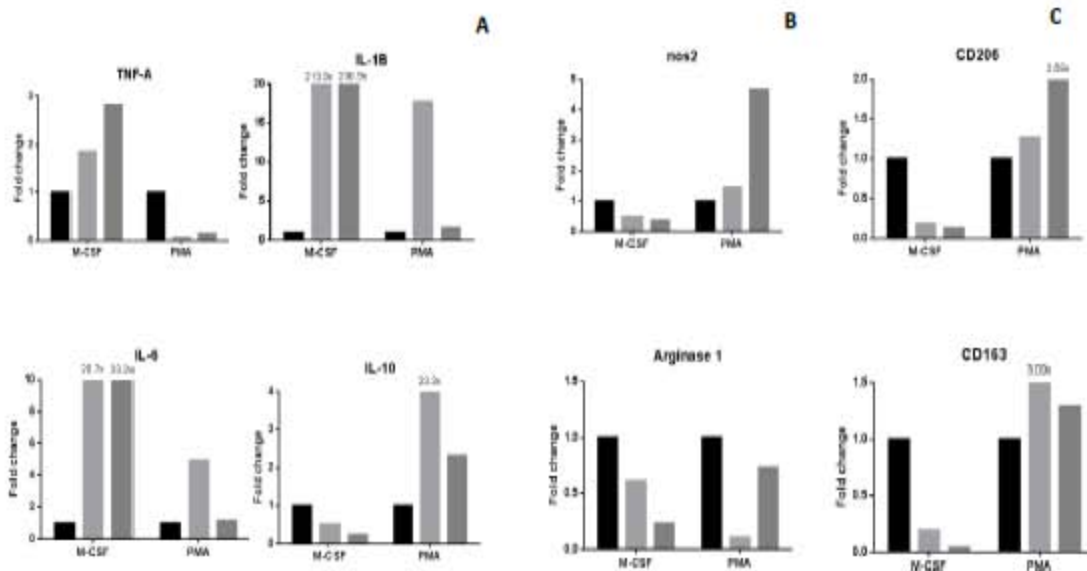


Figure 5. The polarization state of the macrophages was determined by qRT-PCR, quantification of mRNA expression with the stimulus of M-CSF or PMA. Expression of GAPDH was used as reference gene for normalization (A) Pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines. (B) Oxide nitric synthase (*nos2*), Arginase 1. (C) M2 markers in macrophages.

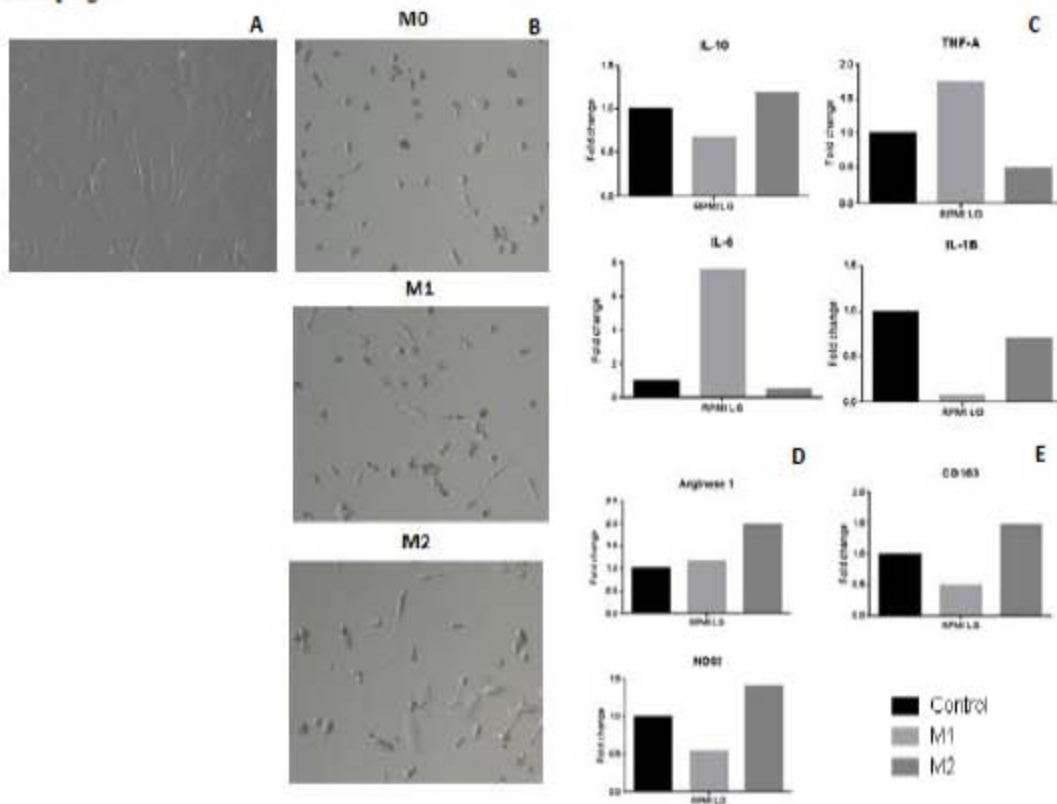


Figure 6. Macrophages M1 and M2 in the LG supernatants from the ASC.

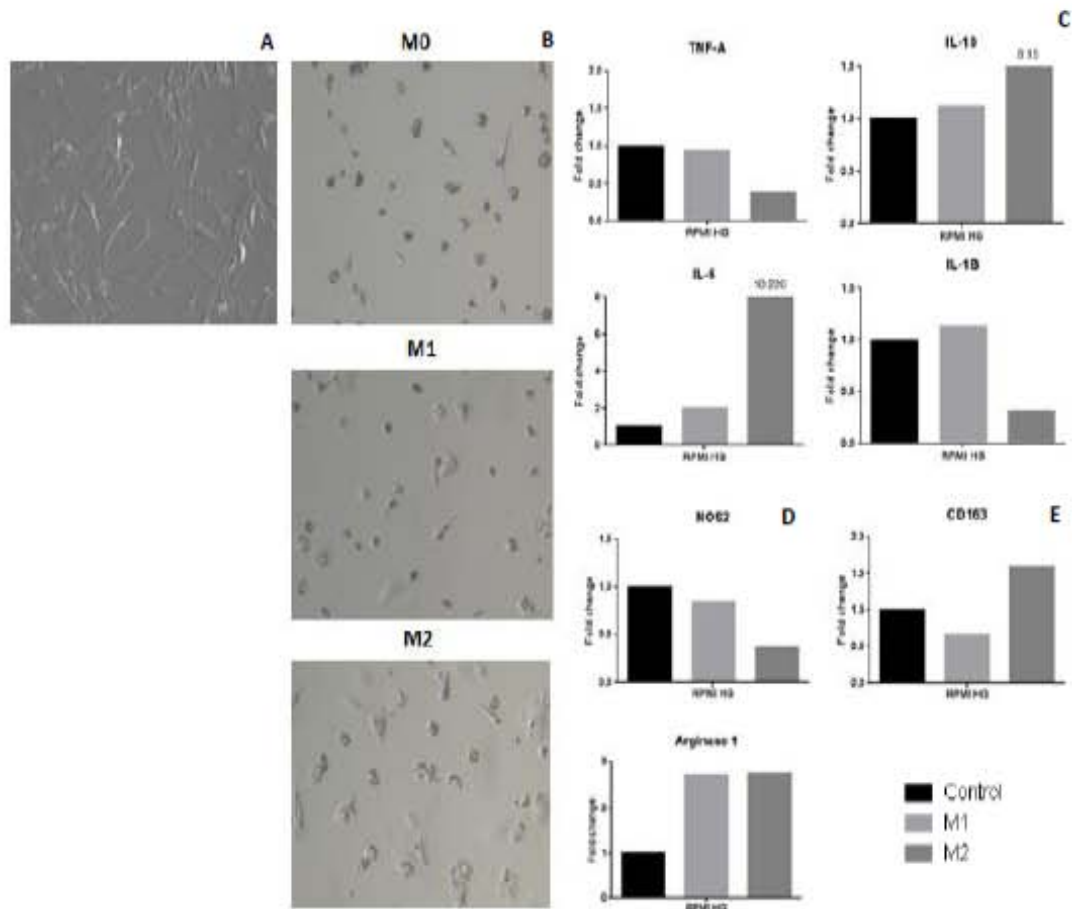


Figure 7. Macrophages M1 and M2 in the HG supernatants from the ASC.

Figure 6, 7. (A) ASC cultivated with RPMI in LG and HG concentration. ASC showed the same morphology when they were cultured in RPMI and with different glucose concentrations. (B) Macrophages M0, M1, M2 cultured with the RPMI LG and HG were attached to the surface plate and showed a rounded and/or spindle-shaped morphology. (C, D, E) qRT-PCR, quantification of mRNA expression pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines; oxide nitric synthase (nos2), Arginase 1; M2 markers in macrophages, to evaluate the ASC effect into the polarization of macrophages in hyperglycemia conditions.

Discussion

Diabetes and obesity have emerged as enormous public health problems globally. In fact, obesity is the principal factor to development T2D and it is the leading cause of death and disabilities.¹ Obesity it has been associated with pro-inflammatory macrophages M1, increasing TNF- α secretion, and decrease in the population of anti-inflammatory macrophages M2.¹⁵ This chronic pro-inflammatory state results in insulin resistance and finally promotes the T2D. ASCs from lean donors, through IL-6, IDO and PGE2 are capable to switch the phenotype of pro-inflammatory M1 towards anti-inflammatory macrophages M2 that secrete IL-10 and decrease insulin resistance.^{4,11} In this study we investigated the influence of ASC in hyperglycemic conditions into the macrophages polarization. The macrophage culture was done from monocyte cell line THP1, there are protocols to induce M1 and M2 macrophages in vitro and they are widely used. In fact, evidence shows a PMA differentiation protocol can enhance macrophage differentiation of THP1 cells. The comparison of important discriminators of the level of macrophage differentiation as numbers of mitochondria and lysosomes, resistance to apoptosis in monocyte-derived macrophages (MDM) and THP1 with PMA suggest THP1 cells as a good model for macrophages culture.¹⁶ It seems that T2D is a pro-inflammatory state derived from the inflammatory

obesity, in this study we measure the expression of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines as TNF- α , IL-1 β , IL-10 and macrophages M1/M2 markers as NOS2, Arginase 1, CD206, CD163. In this case, the expression of TNF- α , IL-1 β were increased in both macrophages pro-inflammatory M1 and anti-inflammatory M2, It regard that macrophages M2 markers CD206 were significantly increase in M2 but CD163 another M2 marker was increase in M1. Cytokine responses induced in monocytes as compared to macrophages vary depending on the stimulus and the type of differentiated macrophage studied. Daigneault et al. found in THP1 higher levels of constitutive and TNF- α and IL-1 β , this data shows that THP1 cells have *per se* a phenotype more inflammatory. Of interest, a higher expression of CD206 in THP1 with stimulus IL-4/IL-13, suggested that, although differences in baseline phenotype may exist, both cell types retain the functional capacity to adapt to the prevailing stimulus and to shift their polarization to a common stimulus-directed phenotype.¹⁶ On the other hand, higher expression of CD163 in macrophages M1 show that this is not a good marker to macrophages M2 in THP1 culture. In an obesity mice model the ASC administration demonstrated the decrease of inflammation in Visceral Adipose Tissue (VAT).¹⁷Based in that T2D is an inflammatory state due to the obesity, it was evaluate if the switch of the pro-inflammatory macrophage phenotype M1 toward anti-inflammatory macrophage M2 can be through ASCs. With these findings, it seems that culture of THP1 cells it is not a correct model to promote macrophage differentiation and evaluate the inflammatory response in the hyperglycemia of T2D. In addition, The American Diabetes Association (ADA) define T2D as hyperglycemia state with levels ≥ 7 mM, in ASC cultures the DMEM medium were change for RPMI with low (11mM) and high (25mM) glucose concentrations, our observations indicate that even 11mM glucose is a enough stimulus to maintain the pro-inflammatory phenotype in macrophages.

References

1. Shilpa N. Bhupathiraju, and Frank B. Hu. Epidemiology of Obesity and Diabetes and Their Cardiovascular Complications. *Circ Res.* 2016;118:1723-1735.
2. Berke EM, Morden NE. Medical management of obesity. *Am Fam Physician.* 2000 Jul15;62(2):419-26. Review. Erratum in: *Am Fam Physician* 2001 Aug 15;64(4):570.
3. Biswas SK, Mantovani A. Orchestration of metabolism by macrophages. *Cell Metab.* 2012 Apr 4;15(4):432-7.
4. Olefsky JM, Glass CK. Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol.* 2010;72:219-46.
5. Odegaard JI, Chawla A. Mechanisms of macrophage activation in obesity-induced insulin resistance. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2008 Nov;4(11):619-26
6. Amano SU, Cohen JL, Vangala P, Tencerova M, et al. Local proliferation of macrophages contributes to obesity-associated adipose tissue inflammation. *Cell Metab.* 2014 Jan 7;19(1):162-71.
7. Kraakman MJ, Murphy AJ, Jandeleit-Dahm K, Kanmoun HL. Macrophage polarization in obesity and type 2 diabetes: weighing down our understanding of macrophage function?. *Front Immunol.* 2014 Sep 26;5:470
8. Johnson AR, Milner JJ, Makowski L. The inflammation highway: metabolism accelerates inflammatory traffic in obesity. *Immunol Rev.* 2012 Sep;249(1):218-38.
9. Leto Barone AA, Khalifian S, Lee WP, Brandacher G. Immunomodulatory effects of adiposederived stem cells: fact or fiction?. *Biomed Res Int.* 2013;2013:383685. doi: 10.1155/2013/383685. Epub 2013 Sep 10. Review.
10. Shang Q, Bai Y, Wang G, Song Q, Guo C, Zhang L, Wang Q. Delivery of Adiposederived Stem Cells Attenuates Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance in Obese Mice through Remodeling Macrophage Phenotypes. *Stem Cells Dev.* 2015 Apr 29. [Epub ahead of print]
11. Bernardo ME, Fibbe WE. Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell Stem Cell.* 2013 Oct 3; 13(4): 392-402.
12. Adutler-Lieber S, Ben-Mordechai T, Naftali-Shani N, Asher E, Lobermar D, et al. Human macrophage regulation via interaction with cardiac adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2013 Jan;18(1):78-86.
13. François M, Romieu-Mourez R, Li M, Galipeau J. Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Mol Ther.* 2012 Jan; 20(1):187-95.

14. Zuk PA, Zhu M, Ashjian P et al. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002;13:4279-4295.
15. Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., Ferrante, A.W. Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J. Clin. Invest.* 2003;112:1796-1808.
16. Daigneault M, Preston JA, Marriott HM, Whyte MK, Dockrell DH (2010) The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages. *PLoS ONE* 5(1): e8668.
17. Shang Qianwen, Bai Yang, Wang Guannan, Song Qiang, Guo Chun, Zhang Lining, and Wang Qun Delivery of Adipose-Derived Stem Cells Attenuates Adipose Tissue Inflammation and Insulin Resistance in Obese Mice Through Remodeling Macrophage Phenotypes *Stem Cells and Development*. April 2015, 24(17): 2052-2064.

Sincerely,

Martin C. Harmsen
Principle Investigator



Prof. Dr. Martin (Marco) C. Harmsen PhD
Lab for Cardiovascular Regenerative Medicine (CAVAREM)

Department of Pathology and Medical Biology
University Medical Center Groningen
Hanzeplein 1, EA11
NL-9713 GZ Groningen
the Netherlands



tel +31 50 3614776
fax +31 50 3619911
mobile +31 654727705
website www.cavarem.eu

17. APÉNDICE D. Distinciones no CONACYT.

1. Research Vouchers por 1200 euros para estudiante de maestría aspirantes a realizar el doctorado en la modalidad de PhD sándwich, 2017. Abel Tasman Talent Program, University of Groningen, Países bajos.

| | | |
|---|-------------------------------------|--|
|  | university of groningen | |
| | | <p>Joyce Fongers, MA T +31 (0)50 363 78 04 F +31 (0)50 363 73 00 j.e.fongers@rug.nl</p> <p>Office for International Relations University of Groningen P.O. Box 72 9700 AB The Netherlands The Netherlands www.rug.nl</p> |
| <p>Handled by Joyce Fongers, MA</p> | | |
| <p>Date June 29, 2017</p> | | <p>Our reference</p> |
| <p>Subject Abel Tasman Research Internship Diana Vega Galaviz</p> | | |
| <p>To Whom it May Concern:</p> <p>This letter is to attest that Ms. Diana Vega Galaviz, born 10 July 1989, has been awarded a grant of €1200 for one month to perform a research internship at the department of Pathology and Medical Biology of the University of Groningen/University Medical Center Groningen under the supervision of prof. dr. Marco Harmsen.</p> <p>The grant is awarded within the Abel Tasman Talent Program of the Faculty of Medical Sciences for prospective research master and PhD students.</p> <p>The internship will take place from August 10, 2017 until November 7, 2017.</p> <p>Should you have any further questions, please do not hesitate to contact us,</p> <p>Sincerely yours,</p>  | | |
| <p>Dr. Martin Smit Director Graduate School of Medical Sciences University of Groningen</p> | | |
| | |  |
| <p>1/1</p> | | |