



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

**Estudio de la influencia de MIF en la
diferenciación y función de macrófagos murinos**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

PRESENTA

ULISES ANTONIO ANDRADE MEZA

DIRECTORA DE TESIS

Dra. Miriam Rodríguez Sosa



Los Reyes Iztacala, Tlalnepanitla, Estado de México. Enero, 2020



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
 FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
 SECRETARÍA GENERAL ACADÉMICA
 CARRERA DE BIOLOGÍA

No. reg.: BIO/030/19

Los Reyes Iztacala a 09 de diciembre de 2019

DRA. PATRICIA D. DAVILA ARANDA
DIRECTORA DE LA FES IZTACALA
Presente

Atención: Lic. Eloy González Fernández
 Jefe de la Unidad de Administración Escolar

Los abajo firmantes, miembros de la Comisión Dictaminadora del trabajo de: **TESIS DE INVESTIGACION**
 Titulado "Estudio de la influencia de MIF en la Diferenciación y Función de Macrófagos Murinos"

Que presenta el (la) pasante de Biología **ULISES ANTONIO ANDRADE MEZA** número de cuenta: **311068027** Para obtener el título de Biólogo.

Informan que después de haber revisado cuidadosamente el trabajo, consideramos que reúne las características de calidad académica que se requieren para aspirar a la obtención del título citado, razón por la cual otorgamos nuestros votos **aprobatorios** para la presentación del examen profesional correspondiente.

GRADO	NOMBRE	FIRMA	CARGO
DR.	LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDES		Presidente
DRA.	EMMA BERTA GUTIERREZ CIRLOS MADRID		Vocal
DRA.	MIRIAM RODRIGUEZ SOSA		Secretario
DRA.	YOLANDA IRASEMA CHIRINO LOPEZ		Suplente
MTRA.	IMELDA JUAREZ AVELAR		Suplente

Con base en lo anterior solicito su autorización para que los profesores que otorgan los votos aprobatorios funjan como sinodales del examen profesional en el cargo anotado, y a la Administración Escolar otorgue la fecha para la Réplica Oral del trabajo presentado.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

JEFA DE CARRERA

DRA. CLAUDIA TZASNA HERNANDEZ DELGADO

Dra. Patricia D. Davila Aranda
 Directora de FES Iztacala

Va. Bo.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
 DE MÉXICO
 FES IZTACALA



FACULTAD DE
 BIOLOGÍA



Agradecimientos

Primeramente, me gustaría agradecer a la Dra. Miriam por haberme aceptado en su laboratorio desde el tercer semestre, tiempo en el cual pude estar inmerso en el área de investigación; motivo por el cual regresé a su laboratorio y producto de este gusto por la ciencia es la presente tesis. Nada de esto hubiera sido posible sin su apoyo y dirección. Gracias Doc, por todo el tiempo que me dedicó para lograr desarrollar este proyecto.

A mis asesores: Dr. Luis Ignacio Terrazas, Dra. Ema Berta Gutiérrez, Dra. Yolanda Chirino y M. en C. Imelda Juárez. Gracias por su ayuda y comentarios desde el inicio de este proyecto, por allá del LICyT.

A mis padres y hermanas, que me apoyaron durante todo el tiempo que duré estudiando mi licenciatura y continuaron conmigo durante el desarrollo de este proyecto. Todo esto ha sido posible gracias a ustedes cuatro y su infinito apoyo y acompañamiento.

A la M. en C. Imelda Juárez, por enseñarme a trabajar en el laboratorio y siempre estar al pendiente de mí. Gracias por las incontables horas de trabajo juntos, siempre rostizados en el cuarto de cultivo, pero siempre hiciste más amenos los días de experimentación con tu exquisito gusto musical.

A la Dra. Norma Delgado. Por su enorme ayuda con las fotos obtenidas en el microscopio confocal y su asesoría con esa parte del proyecto.

A Tapia, Mafer y Jim, que desde la prepa han estado conmigo. Vernos crecer desde el bachillerato ha sido toda una experiencia. Contar con la amistad de ustedes tres, es de lo mejor de la vida. Gracias por siempre estar.

A Mafer, Lucero y Leo. Por hacerme más llevadera y divertida la carrera y la vida diaria, siempre estuvieron ahí para ayudarme cuando he colapsado. Gracias por todos estos años que hemos pasado juntos y por todas las experiencias que tenemos desde que iniciamos la licenciatura.

Al resto del grupo 01 de la licenciatura: Ibrán, Sara, Yatsiry, Carlos, Lalo, etc. Cursar la licenciatura con ustedes fue muy divertido, pero a la vez me ayudaron a mi formación académica. A Brenda, que llegó al final de la licenciatura, pero desde entonces se ha convertido en una gran amiga mía, gracias también por las bacterias y por la ayuda para trabajarlas.

A la Thalís y al Tona que me adoptaron académicamente y siempre vieron por mí y mi proyecto, incluso cuando estuve durante la licenciatura. Una parte del gusto que adquirí por la investigación lo debo a que ustedes me simplificaban todo. Sin su ayuda y experiencia, tampoco hubiera podido lograr esta tesis. He aprendido (y sigo aprendiendo) mucho de ustedes. Ha sido una experiencia gratificante verlos culminar su doctorado y cumplir sus metas.

A la Betsy y la Marthita. Que han hecho que mi estancia en el laboratorio sea de lo más divertido posible. Además, que siempre me han ayudado en todo lo que les ha sido posible. Gracias infinitas. A Alexia (mi gran sensei) que con sus grandes consejos y sabiduría ha contribuido inmensamente a este proyecto, gracias por siempre ayudarme. A Dana, que también me ayudó durante mi estancia en el lab. En general, gracias a todos y cada uno de los que han estado y a los que ahora forman parte del equipo de trabajo del Lab. 5. He aprendido mucho de todos ustedes, son un excelente equipo que siempre busca ayudar a todos.

A toda la UBIMED: Ingrid, Caro, Yael, Mony, al equipo del lab nacional, etc. A todos los que me han ayudado y con los que he compartido muchas horas de trabajo en la unidad. Gracias a todos ustedes, porque también son parte de esta tesis.

A la FES Iztacala y a la UNAM y a todos mis profesores en general. Por permitirme formarme en sus aulas. Sus enseñanzas me han llevado hasta aquí. Gracias por todas las horas que emplearon en transmitirnos su conocimiento.

El presente trabajo de investigación fue parcialmente financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), No. De proyecto: A1-S-10463 y por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), No. De Proyecto: IN209718 de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

Índice general

Índice de cuadros y figuras.....	v
Abreviaturas.....	vi
Resumen.....	1
Introducción.....	2
Inmunidad innata.....	2
Células presentadoras de antígeno.....	3
Monocitos.....	4
Macrófago (Mφ).....	4
Clasificación de los Macrófagos.....	5
GM-CSF y M-CSF.....	10
Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF) (Figura 1).....	11
Células productoras de MIF.....	13
Justificación.....	15
Hipótesis.....	15
Objetivo general.....	16
Objetivos particulares.....	16
Materiales y método.....	17
Organismos.....	17
Determinación del genotipo de los ratones WT y <i>Mif</i> ^{-/-}	17
Obtención y diferenciación celular.....	18
Inmunofenotipo por citometría de flujo.....	19
Determinación de citocinas en sobrenadante.....	20
Determinación de los transcritos de moléculas características de un perfil M1 y M2 por RT-PCR.....	21
Cuantificación de nitritos (NO ₂ ⁻) en el sobrenadante del cultivo celular.....	22
Ensayo de potencial de membrana mitocondrial.....	23
Actividad de las deshidrogenasas celulares.....	23
Actividad fagocítica.....	24
Resultados.....	26
Verificación del genotipo de los ratones.....	26
MIF modifica la expresión de algunos antígenos de membrana.....	27
La producción de TNF-α e IL-10 está influenciada por MIF.....	32

La expresión de algunos genes asociados a los perfiles proinflamatorios y antiinflamatorios se ve modificada por los diferentes estímulos.....	33
Determinación de nitritos (NO ₂ ⁻).....	34
La ausencia de MIF disminuye el potencial de la membrana mitocondrial.....	35
La actividad metabólica celular se ve influenciada por la presencia de MIF, así como por la infección con <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
Actividad fagocítica	39
Discusión	43
Conclusiones	57
Perspectivas	58
Bibliografía	59
Anexo técnico.....	65

Índice de cuadros y figuras

Cuadro 1. Algunos estímulos y algunas características de macrófagos polarizados	10
Figura 1. Estructura tridimensional de MIF de Homo sapiens.....	13
Cuadro 2: Concentraciones de estímulos utilizados para la polarización.....	19
Cuadro 3: Anticuerpos utilizados para la identificación de los Mφ.	20
Cuadro 4: Transcritos amplificados por PCR.	22
Cuadro 5: Anticuerpos utilizados para la tinción de macrófagos en el ensayo de infección.....	25
Figura 2. Gel de agarosa donde se observan los productos obtenidos de la PCR para los genes de <i>Mif</i> (201 pb) y <i>Neo</i> (500 pb).	26
Figura 3. Estrategia de análisis para la selección de macrófagos F4/80+ de los cultivos celulares ..	28
Figura 4. Dot plots y porcentajes de macrófagos M1+ o M2+ obtenidos de los cultivos celulares..	31
Figura 5. El estímulo LPS+IFN-γ favorece la producción de TNF-α en Mφ WT.	33
Figura 6. Transcritos de mRNA de algunos genes asociados a un perfil M1 o M2.	34
Figura 7. Concentración de NO ₂ ⁻ en sobrenadante de cultivo de Mφ con los diferentes estímulos.	35
Figura 8. Actividad mitocondrial.	38
Figura 9. Actividad metabólica.....	39
Figura 10. Estrategia de análisis para la selección de macrófagos F4/80+ de los cultivos celulares para el ensayo de fagocitosis	41
Figura 11. Dot plots y porcentajes de macrófagos CFSE+ obtenidos de los cultivos celulares infectados con <i>P. aeruginosa</i>	42
Figura 12. Propuesta del papel de MIF en la homeostasis celular.....	52

Abreviaturas

ARN	Ácido ribonucleico
ABTS	Ácido 2'2-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-6-sulfónico]
CD	Células dendríticas
CD68	Cúmulo de diferenciación 68, macrosialina
CFSE	Éster de succinimidil-carboxifluoresceína.
CPA	Célula presentadora de antígeno
DMEM	Medio esencial mínimo de Eagles modificado de Dulbecco
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERK	Cinasa de regulación extracelular
ET	Tolerancia a endotoxinas
ETC	Cadena transportadora de electrones
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos
GSH	Glutación
GSSG	Glutación disulfuro
HIF1 α	Factor de transcripción inducible por hipoxia
IDH	Isocitrato deshidrogenasa
IFN- γ	Interferón gamma
IL4R	Receptor de la interleucina 4
IMF	Intensidad media de fluorescencia
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
LPS	Lipopolisacáridos
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos
MEC	Matriz extra-celular
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
MIF	Factor inhibidor de la migración de macrófagos
MMR	Receptor de manosa de macrófagos, CD206
MTT	Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol
NADH	Dinucleótido de nicotinamida adenina reducido

NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ON	Óxido nítrico
OXPHOS	Fosforilación oxidativa mitocondrial
PAMP	Patrones asociados a microorganismos patógenos
PAMPS	Patrones moleculares asociados a patógenos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Ficoeritrina
PPRS	Receptores de reconocimiento de patrones
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SFB	Suero fetal bovino
TCA	Ciclo del ácido tricarbóxico
TGF- β	Factor de crecimiento tumoral beta
TLR	Receptor tipo toll
TNFR1	Receptor del factor de necrosis tumoral tipo 1
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
VEGF	Factor de crecimiento del endotelio vascular

Resumen

La inmunidad innata es la primera línea de defensa ante los patógenos. Para cumplir esta función, el sistema inmune ha desarrollado formas de reconocer patrones presentes en los organismos patógenos mediante receptores presentes en diferentes linajes celulares, entre ellos células dendríticas, neutrófilos o macrófagos. Estos últimos pueden reconocer, fagocitar y procesar un antígeno proteico para descomponerlo y presentarlo a células T. Sin embargo, las funciones del macrófago van más allá de la presentación antigénica: pueden desencadenar una respuesta proinflamatoria, así como contener y resolver la inflamación. Esta plasticidad de los macrófagos ha resultado en una clasificación en dos grandes grupos: macrófagos M1 y macrófagos M2, reflejados en los perfiles TH1/TH2, respectivamente.

El Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF) es una citocina proinflamatoria, clave en las etapas iniciales de la inmunidad innata, que promueve la migración y reclutamiento de linfocitos y macrófagos. Diversos modelos reportan que MIF promueve la polarización de los macrófagos hacia ambos perfiles. Hay estudios que sugieren que MIF promueve un fenotipo M1 mediante la producción de TNF- α e IFN- γ . En contraparte, otros estudios le atribuyen a MIF la activación M2, en ratones, así como en una respuesta de citocinas antiinflamatorias.

Para establecer su participación en la polarización, se estimularon macrófagos de tipo silvestre y deficientes para MIF, con rMIF (MIF recombinante), se caracterizaron tanto a nivel de fenotipo como a nivel funcional y se compararon contra macrófagos M1 y M2. En presencia de rMIF se observó una tendencia al aumento de la polarización M1; por otra parte, en ratones deficientes para MIF, la polarización M1 fue menor y la tendencia a un fenotipo M2 ausente. Demostramos la participación de MIF, además de su papel en los perfiles pro y antiinflamatorio, como enzima antioxidante celular que probablemente influye en el sistema redox. Estos resultados sugieren la participación de MIF más allá de una citocina proinflamatoria, como un componente clave, pero no imprescindible para la maduración y funcionalidad del macrófago.

Introducción

Inmunidad innata

La inmunidad innata es la primera respuesta del sistema inmune ante los microbios, que impide, controla o elimina la infección del huésped frente a muchos microorganismos patógenos; sin embargo, los microbios son extremadamente heterogéneos y su tasa de mutación es mayor que cualquiera de los huéspedes. Para ello, el sistema inmunitario innato ha desarrollado una estrategia de respuesta basa en reconocer estructuras moleculares que son constitutivas o producidas por los microorganismos patógenos. Las moléculas microbianas que estimulan la inmunidad innata son con frecuencia compartidas por distintas clases de microbios y se llaman patrones moleculares asociados a microorganismos patógenos (del inglés, pathogen-associated molecular patterns -PAMPs-); entre los ejemplos más comunes de PAMPs encontramos los lipopolisacáridos bacterianos (LPS), peptidoglicanos, DNA bacteriano, entre otros. Si bien, estas estructuras antes mencionadas son químicamente distintas, todas poseen características comunes: son producidas por el patógeno, suelen ser vitales para la supervivencia o patogenicidad del microorganismo y generalmente poseen estructuras invariables entre distintas clases de patógenos [1].

Las moléculas del sistema inmunitario innato que reconocen los PAMPs son los receptores de reconocimiento de patrones (del inglés, pattern recognition receptors -PPRs-) expresados en las células del sistema inmune innato como son las células dendríticas, macrófagos y neutrófilos. Estos receptores se expresan en la superficie celular, vesículas fagocíticas y en el citosol. Cuando estos receptores se unen a los PAMPs inducen rápidamente la respuesta inmune del huésped mediante la activación de vías complejas de señalización que culminan en la inducción de respuestas inflamatorias mediadas por varias citocinas y quimiocinas que, subsecuentemente facilitarán la erradicación del patógeno [2].

El inicio de las respuestas inmunitarias adaptativas y su desarrollo requiere la captación de antígenos y su exposición ante linfocitos T específicos. Las células

que cumplen esta función se denominan células presentadoras de antígeno (CPA) [3].

Células presentadoras de antígeno

Son células que pueden reconocer, fagocitar y procesar un patógeno o un antígeno proteico, para descomponerlo en péptidos y presentarlo a través de una estructura molecular conocida como complejo principal de histocompatibilidad (del inglés, major histocompatibility complex -MHC-) que se expresa en la superficie celular, donde pueden interactuar con los receptores apropiados de las células T [4].

Las células capaces de reconocer, procesar y presentar antígenos a través de moléculas clásicas MHC clase II o no clásicas como el CD1, se han denominado CPA profesionales. Esto, para diferenciarlas del resto de las CPA no profesionales, las cuáles son capaces de presentar moléculas de origen intracelular en un contexto de presentación antigénica a través del MHC clase I [5].

Complejo principal de histocompatibilidad

La función de las moléculas del MHC es unir fragmentos de péptidos derivados de patógenos y mostrarlos en la superficie de la CPA para su reconocimiento por las células T apropiadas [6]. Existen diferencias importantes en el reconocimiento antigénico de las moléculas de clase I y II por parte de las células T. En general, las moléculas MHC-I están presentes en todas las células nucleadas, mientras que las de clase II están expresadas en linfocitos B, macrófagos, células dendríticas, endoteliales y otros pocos tipos celulares [7].

Los linfocitos T citotóxicos CD8+ reconocen antígenos presentados a través de MHC-I, esto hace que se activen para matar células infectadas por microbios intracelulares, como los virus o células que expresan antígenos tumorales. Por el contrario, los linfocitos T CD4+ cooperadores, reconocen antígenos presentados a través de MHC-II, sus funciones asociadas a su activación están limitadas al reconocimiento del antígeno presentado por un número menor de tipos celulares. Las moléculas MHC-II presentan péptidos derivados de microbios y proteínas extracelulares [3].

Las células B, CD, y los macrófagos expresan constitutivamente moléculas MHC-II y se consideran células CPA profesionales [8]. Sus características incluyen la capacidad de internalizar antígenos solubles y particulados, procesar y cargar péptidos antigénicos en MHC clase II, translocar complejos MHC-péptido a la superficie celular y expresar moléculas accesorias como CD80 y CD86. Esto permite su activación y responden a señales que las capacitan a migrar para drenar los ganglios linfáticos y activar las células T, tanto nativas como de memoria CD4+ [9].

Monocitos

Los monocitos son un subtipo de células blancas circulantes que pueden diferenciarse en una variedad de macrófagos y células dendríticas. Los monocitos circulantes en la sangre son derivados de precursores en la médula ósea, con una vida media relativamente corta, de 1 día en ratones y 3 días en humanos. Son mediadores de la defensa antimicrobial del huésped. Al ser estimulados por una respuesta inflamatoria, activan vías de supervivencia, migran a los tejidos y se diferencian en macrófagos. Sin embargo, en ausencia de estímulos de activación o de crecimiento pueden morir por apoptosis [10, 11].

Macrófago (Mφ)

Los **Mφ** son células multifuncionales presentes en la mayoría de los tejidos de vertebrados, conocidos por su actividad fagocítica que es importante para la defensa del huésped contra infecciones, así como para una variedad de funciones de "limpieza", como la eliminación de células apoptóticas y la remodelación de la matriz extracelular [12]. Estas células fueron descritas por primera vez en detalle por Elie Metchnikoff, a finales del siglo XIX quién descubrió su capacidad para engullir, digerir y destruir los componentes celulares de las células huésped y microbianas vivas y muertas [13].

Los Mφ son pieza clave en el desarrollo y arquitectura del tejido, en la respuesta inmune contra patógenos al generar y resolver una respuesta inflamatoria, actúan como células centinelas y efectoras, vigilando y controlando los cambios tisulares

y especialmente en el mantenimiento de la homeostasis tisular (al despejar las células apoptóticas o senescentes, y al remodelar y reparar los tejidos) [14].

Clasificación de los Macrófagos

La mayoría de los tejidos en el cuerpo poseen poblaciones de M ϕ residentes en los tejidos; a menudo, varios subconjuntos fenotípicamente distintos son evidentes en nichos microanatómicos. Los M ϕ residentes en tejidos son extremadamente heterogéneos, consecuencia de las funciones específicas de cada tejido; sin embargo, los M ϕ que se encuentran en los tejidos son más conocidos por su papel como centinelas inmunes en la primera línea de defensa de los tejidos, donde están ubicados y programados transcripcionalmente para el encuentro con patógenos o desafíos ambientales [15]. Así, la activación del M ϕ es el resultado del contacto del M ϕ con un inmunógeno, que favorece la producción de citocinas, quimiocinas y otros mediadores inflamatorios, y el reclutamiento de monocitos. Reflejado en la nomenclatura Th1/Th2, es común referirse a los M ϕ activados como células M1 ó M2, de acuerdo a las características moleculares que presenten [16].

Macrófago M1 (cuadro 1)

La polarización M1, conocida como la activación “clásica” del M ϕ , es inducida por interferón gamma (IFN- γ), ya sea solo o en conjunto con estímulos microbianos como LPS, o citocinas como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (por sus siglas en inglés, GM-CSF) [16]. Los M ϕ M1 se caracterizan por una alta producción de metabolitos oxidativos, como óxido nítrico (ON) y anión superóxido (O $_2^-$), empleando la glicólisis, para la producción de precursores de dichos metabolitos oxidativos, así como para la producción de energía [17]. Además, producen citocinas proinflamatorias que son esenciales para la defensa del huésped y eliminación de células tumorales, pero que también pueden causar daños colaterales a células/tejidos sanos [18].

La activación clásica del M ϕ (M1) está asociada con una glicólisis aumentada, en comparación al estado basal, y un deterioro del ciclo del ácido tricarbóxico (del

inglés, tricarboxylic acid cycle –TCA-) y la fosforilación oxidativa (del inglés, oxidative phosphorylation -OXPHOS-) [19].

El aumento de la glicólisis se basa principalmente en el incremento en la velocidad en el consumo de la glucosa favorecido por la sobreexpresión del transportador de glucosa GLUT1 como resultado de la exposición de los M ϕ al LPS [20]. El LPS favorece la activación de NF-kB que a su vez puede inducir la expresión del Factor de Transcripción Inducible por Hipoxia (HIF1 α), el cual regula la glicólisis mediante la expresión de genes que codifican para enzimas glicolíticas y el GLUT1; la sobreexpresión de GLUT1 facilita el rápido consumo de glucosa [21]. Por otro lado, HIF1 α favorece la conversión de piruvato en lactato promoviendo la expresión de dos enzimas: lactato deshidrogenasa, que produce lactato a partir del piruvato, y piruvato deshidrogenasa cinasa que inactiva la piruvato deshidrogenasa, limitando el piruvato disponible para el TCA [22-25]. Dos puntos adicionales en la regulación del flujo glicolítico, el primero ocurre al nivel de la 6-fosfofructo-2-cinasa B, donde los M ϕ M1 expresan predominantemente la isoforma 53 que, comparada con otras isoformas, cataliza de manera menos eficiente la conversión de la fructuosa-2,6-bisfosfato en fructuosa 6-fosfato, aumentando el flujo glicolítico [25]. El segundo punto ocurre en la piruvato cinasa M2, debido a que los M ϕ M1 sobreexpresan la isoforma 2 de esta cinasa, cuando esta enzima está sobreexpresada existe en un equilibrio de monómeros o dímeros inactivos enzimáticamente y tetrámeros enzimáticamente activos [23]. La enzima inactiva se transloca al núcleo y al unirse a HIF1 α desencadena la expresión de genes regulados por HIF1 α , mientras que los tetrámeros enzimáticamente activos son retenidos en el citoplasma y promueven la glicólisis [25]

En los macrófagos M1, junto con una glicólisis mejorada, hay un deterioro en el TCA, el cual se ha propuesto que tiene rupturas en dos puntos: uno en la disminución de la enzima isocitrato deshidrogenasa (IDH) que conduce a la acumulación del precursor isocitrato, y el otro después del succinato, lo que conduce a la acumulación de succinato. Esta acumulación de succinato estabiliza a HIF1 α , que es clave en la inducción de la expresión de la citocina proinflamatoria

IL-1 β , lo cual conecta directamente el metabolismo de la glucosa con la función inflamatoria del M ϕ [19]. Sin embargo, los puntos de ruptura del TCA continúan siendo imprecisos y se requiere más investigación para determinar las modificaciones exactas ocasionadas en el TCA, así como para evaluar sus consecuencias inmunes [26].

Recientemente, se ha demostrado que la producción y oxidación del succinato regula la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y limita las citocinas antiinflamatorias como IL-1RA e IL-10. Por otra parte, el citrato acumulado es utilizado para la producción de ácido itacónico, el cual es un metabolito que posee actividad antimicrobiana directa [27].

Macrófago M2 (cuadro 1)

La polarización M2, conocida como activación “alternativa” del M ϕ , es inducida por el factor estimulante de colonias de macrófagos (por sus siglas en inglés, M-CSF), por células fúngicas, parásitos, complejos inmunes, células apoptóticas, las interleucinas IL-4, IL-13, IL-10 y el factor de crecimiento transformante (TGF- β), entre otras [28].

El fenotipo M2 posee una capacidad alta de fagocitosis, produce componentes de la matriz extracelular, factores de angiogénesis y quimiotaxis, así como IL-10. Además de defender ante patógenos, los M ϕ M2 limpian al hospedero de células apoptóticas, mitigan la respuesta inflamatoria y promueven la curación de heridas. Comúnmente se consideran como opuestos benignos de los M ϕ M1, aunque los M ϕ M2 pueden ocasionar inflamación alérgica, ayudar al crecimiento de los tejidos tumorales y pueden ser reservorio de diversos patógenos [29].

En contraste con los M ϕ M1, los M ϕ M2 basan su metabolismo principalmente en el TCA y la OXPHOS para el metabolismo de la glucosa y la generación de energía, debido a que esta vía permite la generación eficiente y sostenida de la energía necesaria para la reparación de tejidos y las funciones de remodelación de los M ϕ M2 [27].

Con base en los estímulos aplicados y los cambios transcripcionales observados, los M ϕ M2 se han clasificado en las siguientes subdivisiones:

M2a

La activación M2a es promovida por las citocinas IL-4 e IL-13, resultando en M ϕ implicados en la remodelación del tejido, los cuales inicialmente expresan enzimas involucradas en la degradación de la matriz extracelular (MEC), como colagenasa y metaloelastasa e inhibidores de metaloproteinasas 1 y 2. Posteriormente, los M2a contribuyen a la deposición de MEC mediante la producción de fibronectina, tenascina-C y β -IG-H3, así como el entrecruzamiento de estos [30].

Adicionalmente, estos M ϕ modulan la proliferación y síntesis de colágeno por parte de los fibroblastos a través de la expresión de altos niveles del factor de crecimiento transformante β 1 (del inglés, transforming growth factor β 1 -TGF- β 1-), factor de crecimiento derivado de plaquetas AA y BB (del inglés, platelet-derived growth factor -PDGF-), llevando a cabo estas acciones durante la resolución de reacciones inflamatorias agudas y crónicas [31].

M2b

Los M ϕ M2b, también denominados “tipo II”, son generados por la exposición a complejos inmunes y a ligandos de los receptores tipo toll (del inglés, toll-like receptor -TLR-). Poseen un fenotipo muy diferente a los M ϕ M2a y M ϕ M2c, pues tienen alta expresión de IL-10 y baja de IL-12, producen altos niveles de citocinas inflamatorias como TNF- α , IL-1 β e IL-6. Se caracterizan principalmente por promover la diferenciación de linfocitos hacia el perfil Th2. Otras de sus funciones son la exacerbación de patologías relacionadas con citocinas de ese tipo, como el asma, las infecciones con helmintos, la muerte y encapsulación de parásitos, y favorecen la producción de anticuerpos principalmente del isotipo IgG1 [31].

M2c

Los M ϕ M2c son diferenciados por la exposición a IL-10, TGF- β y glucocorticoides [27]. El fenotipo M2c se caracteriza por una baja expresión de citocinas inflamatorias como IL-12 o TNF- α , baja capacidad para fagocitar y presentar antígenos, así como una alta expresión de mediadores antiinflamatorios como IL-10 y TGF- β . Participan en la inmunoregulación, deposición de la matriz y en la remodelación tisular [32].

M2d

La activación de los Mφ M2d es resultado del estímulo de la IL-6 y adenosina [29]. La adenosina es un producto del metabolismo de la adenosina trifosfato. En macrófagos disminuye la producción de TNF-α y favorece la producción de citocinas antiinflamatorias, como IL-10 [33], por ello, estos Mφ se caracterizan por producir altos niveles de IL-10 y del factor de crecimiento endotelial vascular (del inglés, vascular endotelial growth factor -VEGF-) [34]. Estos Mφ han sido relacionados con el desarrollo de tumores, al facilitar la angiogénesis y promover la inducción de masa y crecimiento de las células tumorales [35].

	M1	M2a	M2b	M2c	M2d
Expresión de marcadores	CD68 CD86 CD80 MHC II IL-1R TLR2 TLR4 iNOS SOCS3	CD163 MHC II SR MMR/CD206 CD200R TGM2 DecoyR IL-1R II Solo en ratón: <i>Ym1/2</i> <i>Fizz1</i> <i>Arg-1</i>	CD86 MHC II	CD163 TLR1 TLR8	VEGF
Secreción de citocinas	TNF- α IL-1 β IL-6 IL-12 IL-23	IL-10 TGF- β IL-1ra	IL-1 IL-6 IL-10 TNF- α	IL-10 TGF- β	IL-10 IL-12 TNF- α TGF- β
Secreción de quimiocinas	CCL10 CCL11 CCL5 CCL8 CCL9 CCL2 CCL3 CCL4	CCL17 CCL22 CCL24	CCL1	CCR2	CCL5 CXCL10 CXCL16
Estímulo	IFN- γ LPS GM-CSF	M-CSF IL4 IL-13 Infección por hongos o parásitos	ICs IL-1R	IL-10 TGF- β GCs	IL-6 LIF Adenosina

Cuadro 1. Algunos estímulos y algunas características de macrófagos polarizados [29].

GM-CSF y M-CSF

El GM-CSF y el M-CSF son dos citocinas que parecen ser importantes controlando el número y funciones del linaje de las poblaciones de macrófagos, en condiciones inflamatorias son GM-CSF y M-CSF. Ambas citocinas fueron descritas originalmente como factores de crecimiento que generaban linajes hematopoyéticos de la médula ósea, incluyendo macrófagos derivados de monocitos y un tipo de células dendríticas denominadas “derivadas de monocitos” o “células dendríticas inflamatorias”; sin embargo, se ha demostrado que además

de factores de crecimiento, funcionan como factores de supervivencia celular, proliferación, diferenciación y activación [36]. Además, poseen diferentes patrones de expresión. El M-CSF es producido ubicuamente y es expresado constitutivamente bajo condiciones de homeostasis por muchas de las células y tejidos del organismo, mientras que el GM-CSF es producido principalmente por leucocitos activados formando parte de la respuesta del huésped ante infecciones o daños [37, 38].

Las poblaciones del linaje de macrófagos responden al M-CSF y el GM-CSF de manera diferente; sin embargo, la naturaleza de las diferencias no está clara ni se han aclarado los mecanismos responsables. Mientras que el M-CSF polariza a los macrófagos hacia un fenotipo antiinflamatorio (M2), el GM-CSF promueve un fenotipo proinflamatorio (M1), siendo estos efectos opuestos del M-CSF y el GM-CSF en los macrófagos [36, 39].

Finalmente, se ha reportado que la estimulación posterior a la diferenciación, a menudo ejerce efectos antagonistas sobre la “polarización” previa de los macrófagos mediada por el M-CSF o GM-CSF; es decir, se pueden polarizar a M1 o a M2 de manera dependiente del estímulo utilizando IFN- γ o IL-4 independientemente del factor de diferenciación [40].

Factor Inhibidor de la Migración de Macrófagos (MIF) (Figura 1)

MIF es una proteína soluble identificada inicialmente como un producto de secreción de linfocitos cultivados y estimulados *in vitro*. Su nombre le fue asignado por la capacidad de inhibir la migración aleatoria de macrófagos cultivados *in vitro*. Posteriormente, se pudo establecer que tiene una participación importante en la activación del M ϕ , incluyendo adherencia, diseminación, fagocitosis y una actividad mejorada contra tumores [41].

El cDNA para MIF codifica para una proteína de 115 aminoácidos con un peso molecular de 12.5 kDA que no tiene homología en la secuencia con ninguna otra proteína. Las secuencias de aminoácidos del MIF humano y murino comparten un 90 % de identidad. MIF existe como un homotrímero y cada monómero está conformado por dos α -hélices antiparalelas y seis β -láminas (Figura 1) [42, 43].

Actualmente, MIF se reconoce como una citocina proinflamatoria con funciones similares a una quimiocina e inclusive a una tautomerasa¹ [44]. Esta proteína es un componente clave en las etapas iniciales de la respuesta inflamatoria asociadas a la inmunidad innata, que promueve la migración y el reclutamiento de monocitos y leucocitos en sitios inflamatorios e infecciosos [45].

Diferentes estrategias experimentales han ayudado a establecer que MIF contrarresta los efectos inmunosupresores de los glucocorticoides y favorece la producción de citocinas inflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-8, IL-17, IFN- γ y prostaglandina E2, así como la liberación de ON y la inducción de la vía de la ciclooxigenasa [46]

Adicionalmente, se encontró que MIF posee actividad de factor de crecimiento; favorece la expresión de receptores tipo TLR-4 en células presentadoras de antígeno, como los macrófagos, favoreciendo la respuesta contra bacterias. Por otra parte, se ha propuesto que posee actividad proinflamatoria al inhibir p53, lo que conlleva a mantener la viabilidad celular durante una infección. Es por todo esto que MIF se ha reconocido como una molécula crítica en la actividad proinflamatoria de la respuesta inmune innata y la restricción de ciertas infecciones por parásitos [47]. Incluso, se ha demostrado el papel de MIF en enfermedades inmunológicas e inflamatorias, como el choque séptico, cáncer y enfermedades crónicas, incluyendo la enfermedad de colon irritable, artritis reumatoide, colitis, obesidad y diabetes [48].

¹ **Tautomerasa:** Enzima que cataliza la transformación de su sustrato en su respectivo isómero.

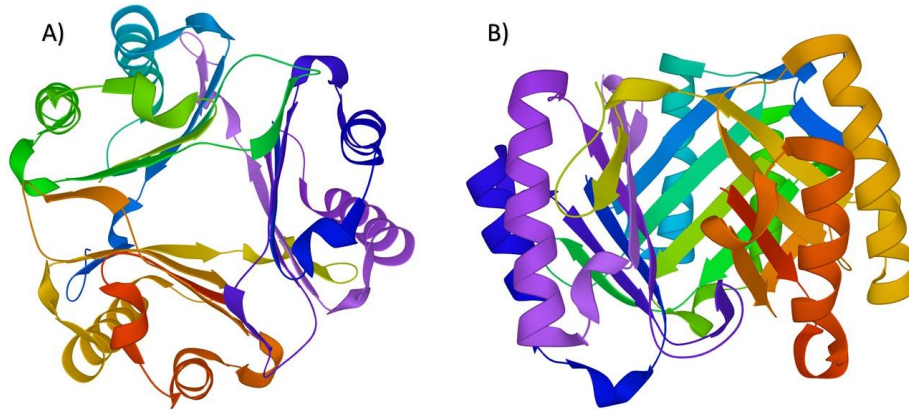


Figura 1. Estructura tridimensional de MIF de Homo sapiens. A) Vista frontal. B) Vista lateral.
[49], Protein Data Bank in Europe.

Células productoras de MIF

La proteína MIF se encuentra preformada y almacenada en vesículas intracelulares para su rápida secreción como un homotrímero, siendo este su forma activa. Además, es secretada tanto por algunas células inmunes: monocitos, macrófagos, linfocitos T y B, mastocitos y eosinófilos, como por células específicas de órganos, como hepatocitos, osteoblastos, células del endotelio, entre otras . A diferencia de otras citocinas, es también secretada por la glándula pituitaria en respuesta a infecciones e inclusive al estrés [44, 45, 50].

Actividad de MIF

MIF ejerce sus efectos en la célula, mediante la unión y activación de su receptor canónico CD74, que es la forma presente en la superficie celular de la cadena invariante del MHC-II, reclutando y fosforilando a su correceptor CD44. La interacción MIF/CD74 conduce a la activación de MAPK ERK1/2, y a la señalización de PI3K/AKT, dando como resultado proliferación celular, supervivencia mejorada inhibiendo P53 y expresión del gene *cxc18* [51, 52], así como una sobreexpresión de TLR-4, activando la familia de factores de transcripción ETS, promoviendo una respuesta de tipo Th1 por medio de la secreción de citocinas como TNF- α , IFN- γ e IL-1 β [53].

MIF también se puede unir a receptores no convencionales como CXCR2 y CXCR4. Estos son receptores de quimiocinas, implicados en acciones

inflamatorias de MIF y en la patogénesis de diversas enfermedades, que incluyen infarto de miocardio, aterosclerosis y sepsis [52].

Justificación

Hay evidencia de que MIF participa en la polarización de los M ϕ , por lo que se considera una pieza clave en el desarrollo de diversas enfermedades, como infartos, diabetes e inclusive cáncer. Por otra parte, MIF es clasificada como una citocina proinflamatoria, lo cual podría favorecer la polarización de los macrófagos hacia el fenotipo M1. Sin embargo, no se ha realizado un estudio que demuestre realmente la participación de MIF en la polarización de los M ϕ hacia los fenotipos M1 o M2. Es por ello que el presente proyecto se ha enfocado a establecer la participación de MIF en la polarización de los M ϕ .

Hipótesis

MIF favorecerá la polarización de monocitos hacia el fenotipo de M ϕ M1 en un modelo de activación y diferenciación *in vitro* de M ϕ murinos obtenidos de médula ósea.

Objetivo general

- Estudiar la participación de MIF en la polarización de los Mφ M1 y M2.

Objetivos particulares

1. Verificar el genotipo de los ratones WT y MIF knockout (*Mif*^{-/-})
2. Obtener células de médula ósea de los ratones WT y *Mif*^{-/-} y diferenciarlas *in vitro* con M-CSF a Mφ.
3. Estimular los Mφ obtenidos de ratones WT o *Mif*^{-/-} con IFN-γ/LPS o IL-4/IL-13 para su polarización de los Mφ M1 o Mφ M2, respectivamente, o MIF recombinante (rMIF) para la estudiar la influencia de MIF sobre la polarización, como controles se utilizaron Mφ sin estímulo.
4. Caracterizar morfológicamente los Mφ, mediante citometría de flujo.
5. Determinar los niveles de TNF-α, e IL-10 en el sobrenadante de los cultivos celulares de Mφ mediante técnica de ELISA-Sándwich.
6. Determinar la expresión de algunos genes asociados a Mφ M1 y Mφ M2, en Mφ , mediante la técnica de RT-PCR.
7. Cuantificar la concentración de óxido nítrico, de manera indirecta mediante la cuantificación de nitritos (NO₂⁻), en sobrenadante de los cultivos celulares de Mφ mediante técnica de Griess.
8. Determinar el estado del potencial de membrana mitocondrial de los Mφ, por la técnica de MitoTracker.
9. Evaluar la actividad de las deshidrogenasas celulares por MTT en Mφ.
10. Evaluar la capacidad fagocítica de Mφ por citometría de flujo.

Materiales y método

Organismos

Se utilizaron ratones hembras y machos BALB/c de seis a ocho semanas de edad, tres hembras y tres machos por grupo, de tipo silvestre (WT) y genéticamente deficientes para MIF (*Mif*^{-/-}). Los ratones fueron obtenidos del bioterio de FES-Iztacala (UNAM, México).

Determinación del genotipo de los ratones WT y *Mif*^{-/-}

Obtención de DNA genómico

Con el objetivo de verificar que el gen de MIF estuviera presente (WT) o ausente (*Mif*^{-/-}), se realizó el genotipo de los ratones mediante la técnica de PCR. El DNA genómico fue obtenido y purificado siguiendo el método previamente reportado por Laird en 1991 [54]. Brevemente se obtuvieron 0.5 cm de la parte distal de la cola de cada uno de los ratones a verificar. Se colocó la muestra en tubos de 1.5 ml (Eppendorf), se añadieron 500 µl de buffer de lisis (anexo 1) y 20 µl de proteinasa K (Invitrogen, 100 µg/µl), se incubó toda la noche a 56 °C.

Posteriormente se centrifugó a 14000 rpm por 10 min, se recuperó el sobrenadante y se vertió en 500 µl de isopropanol (Sigma) frío, se mezcló suavemente para hacer evidente la precipitación del DNA. Nuevamente se centrifugó a 14000 rpm por 10 min para precipitar por completo el DNA, se decantó el sobrenadante y se lavó el botón con etanol (Sigma) frío al 75 %, se resuspendió y se centrifugó a 14000 rpm por 5 min. Se decantó el sobrenadante y la pastilla, se dejó evaporar el residuo de alcohol por 2 h a temperatura ambiente. Finalmente, se resuspendió el botón en 200 µl de agua grado miliQ (mQ).

Amplificación de los genes *Mif* y de resistencia a la Neomicina

Se amplificó el gen de *Mif* y el gen de resistencia a la Neomicina (Neo) para corroborar su presencia o ausencia en los ratones a utilizar, como controles positivos se utilizó el DNA genómico de ratones heterocigotos, así como controles negativos sin DNA para corroborar que no hubo interferencias en la reacción. Todos los reactivos utilizados en esta técnica fueron de grado biología molecular. Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen final de 20 µl utilizando el kit

para PCR Taq Pol DNA EP0402 (ThermoFisher) conforme a las instrucciones proporcionadas por el fabricante (anexo 2).

Electroforesis

Los productos obtenidos de la amplificación de dichos genes fueron separados por una electroforesis en gel de agarosa (Cleaver Scientific) al 1.5 % en amortiguador TBE 1 x (anexo 3) y 0.1 % de bromuro de etidio sobre un molde, incubando a 4 °C hasta que solidificara.

A cada uno de los tubos de la reacción de PCR se le añadieron 4 µl de amortiguador de carga blue juice (Invitrogen); una vez mezclados se tomaron 8 µl de la muestra y se cargaron en el gel a partir del segundo pozo, dejando el primero pozo libre para cargar 2 µl del marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen). El gel con las muestras se corrió a 100 v durante 45 min y fue revelado con el equipo Gel Doc EZ (Bio-Rad).

Obtención y diferenciación celular

Se obtuvieron células de médula ósea (del inglés bone marrow –BM-) de fémures y tibias de ratones WT y *Mif*^{-/-} mediante perfusión con solución salina. Las células obtenidas se centrifugaron por 10 min a 1500 rpm, se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 1 ml de DMEM sin suplementar. 10 µl de la suspensión celular se le añadió azul tripano (Sigma) 1:1 para verificar viabilidad y se contaron en cámara de Neubauer, se ajustaron las células a 2x10⁶/ ml, se sembró 1 ml/pozo en placa de 12 pozos (Sarstedt). Las células sembradas se estimularon con 20 ng/ml de M-CSF (PeproTech) en medio DMEM (GE Healthcare) suplementado al 10 % con suero fetal bovino (SFB) (Gibco) y antibiótico al 1 % (Gibco).

En el día 3 y 5 de incubación las células fueron re-estimuladas con 20 ng/ml de M-CSF, se mantuvieron los cultivos celulares dentro de una incubadora a 37 °C, 5 % CO₂. Al día 7 se realizó un lavado con DMEM sin suplementar para descartar las células no adherentes. Los cultivos se sincronizaron por 2 h en medio DMEM sin suplementar y posteriormente, se añadieron estímulos para diferenciar los

macrófagos de acuerdo con el cuadro 2, según correspondiera. A las 72 h post-estímulo las células fueron analizadas mediante diferentes técnicas.

Perfil	Estímulo	Concentración por ml
Control	DMEM suplementado	10 % SFB, 1 % antibiótico
M1	LPS (Sigma)	50 ng
	IFN- γ (PeproTech)	10 ng
M2	IL-4 (PeproTech)	50 ng
	IL-13 (PeproTech)	10 ng
MIF	rMIF (R&D SYSTEMS)	40 ng

Cuadro 2: Concentraciones de estímulos utilizados para la polarización.

Inmunofenotipo por citometría de flujo

Para identificar las subpoblaciones de M ϕ obtenidas con los diferentes estímulos aplicados, se realizó un inmunofenotipo mediante citometría de flujo. Brevemente, después de la estimulación por 24, 48 y 72 h se colectó el sobrenadante de los cultivos y se almacenó a -70 °C hasta su uso. A las células se les añadió 1 ml de solución salina fría y las placas se colocaron sobre una cama de hielo. Las células se despegaron cuidadosamente utilizando el émbolo de una jeringa para insulina. Se colectaron las células en tubo eppendorf de 1 ml, se centrifugó a 1500 rpm por 10 min a 4 °C. El botón se resuspendió en 100 μ l de buffer para Facs (anexo 4) con anticuerpo anti-ratón CD16/32 (Biolegend) para bloquear el reconocimiento inespecífico de otros anticuerpos, se incubó por 15 min a 4 °C. Se centrifugó 10 min a 1500 rpm a 4 °C, se retiró el sobrenadante y se resuspendió el botón en 100 μ l de PBS con el marcador de viabilidad Zombie Aqua (Biolegend) por 20 min a temperatura ambiente en la oscuridad con la finalidad de descartar las células muertas. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugó a 1500 rpm por 10 min y se resuspendió el botón en 100 μ l de la mezcla de anticuerpos, para lo cual se utilizaron los siguientes anticuerpos que se enlistan en el cuadro 3 (Biolegend).

Tinción	Marcador	Fluorocromo acoplado	λ excitación	λ emisión
Viabilidad	--	Zombie Aqua	355 nm	516 nm
Macrófagos (Linaje)	Anti-F4/80	Pacific Blue	410 nm	455 nm
M1	Anti-CD68	FITC	490 nm	525 nm
	Anti-TNFR1	APC	650 nm	660 nm
M2	Anti-IL4R	PECy7	565 nm	767 nm
	Anti-MMR (CD 206)	PE	565 nm	578 nm

Cuadro 3: Anticuerpos utilizados para la identificación de los Mφ.

Las células fueron teñidas según la concentración recomendada por fabricante para cada anticuerpo y se fijaron en paraformaldehído amortiguado con SFB al 4 %. Se realizó la adquisición de las muestras en citómetro de flujo Attune Nxt (Invitrogen). Los datos obtenidos fueron analizados con el software Flow Jo X (Becton Dickinson).

Determinación de citocinas en sobrenadante

El sobrenadante de los cultivos celulares de 24, 48 y 72 h post-estímulo se utilizó para la determinación de TNF-α e IL-10 mediante un ensayo tipo ELISA-Sándwich (PeproTech) (anexo 5), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente se diluyó el anticuerpo de captura específico para cada citocina a cuantificar en una placa de 96 pozos. El anticuerpo de captura se incubó a 4 °C toda la noche. Se realizaron cuatro lavados de las placas con solución de lavado (PBS-Tween al 0.05 %) y se bloqueó con solución de bloqueo (PBS-BSA 1 %) por 2 h a temperatura ambiente y se lavó cuatro veces con la solución de lavado. Se realizó una curva de referencia con diluciones seriadas del estándar de la citocina a cuantificar según las indicaciones del fabricante. Se agregaron 50 µl de las

muestras a cada pozo y se incubaron toda la noche a 4 °C. Se decantaron las muestras y se lavó cada pozo cuatro veces con solución de lavado. Se agregó el anticuerpo secundario y se dejó incubar por dos horas a temperatura ambiente. Se lavó cuatro veces cada placa con PBS-Tween y se añadió streptavidina peroxidasa 1:4000 por 45 min. Se lavaron cuatro veces las placas y fueron reveladas con ácido 2'2-azino-bis-[3-etilbenzotiazol-6-sulfónico] (ABTS) y H₂O₂ 3 % y se incubaron por cinco minutos, posteriormente se cuantificó la absorbancia con un lector de placas de ELISA a 405 nm de longitud de onda (EPOCH, BioTek).

Determinación de los transcritos de moléculas características de un perfil M1 y M2 por RT-PCR

A las 72 h post-estímulo las células libres de sobrenadante se resuspendieron en 500 µl/pozo de Trizol reagent (Sigma), se recuperó la suspensión y se almacenó en tubos eppendorf libres de DNAsas y RNAsas a -70 °C hasta su uso.

La extracción de RNA se realizó de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, los tubos con trizol se descongelaron en hielo y se añadieron 200 µl de cloroformo (Sigma), se mezcló en el vortex y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Se centrifugó a 14000 rpm por 15 min a 4 °C. La fase transparente se recuperó y se añadió a 500 µl de isopropanol (Sigma) frío. Las muestras fueron incubadas por 10 min a temperatura ambiente y nuevamente fueron centrifugadas a 14000 rpm a 4 °C. Se decantó el sobrenadante y el botón se dejó secar a temperatura ambiente 2 h, el botón se resuspendió en 20 µl de H₂O grado biología molecular. Finalmente se cuantificó el RNA a 260 nm de longitud de onda en una placa Take3 (BioTek) el lector de placas.

Síntesis del cDNA

Se sintetizó cDNA con el kit Superscript 1st strand system (Invitrogen). Se incubó la mezcla en un termociclador (Bio-Rad).

Amplificación del cDNA.

El cDNA que se obtuvo se cuantificó a 206 nm de longitud de onda y ajustó a 100 ng por reacción para cada muestra. Se procedió a realizar un análisis semicuantitativo de la transcripción de algunos genes relacionados con los perfiles M1/M2. Para caracterizar el perfil M1 se utilizaron dos marcadores clásicos

asociados a esta polarización: la óxido nítrico sintasa inducible (*inos*) y *tnf-α*. Para el perfil M2 se utilizaron como indicadores la enzima *arginasa-1*, *relm-α* y *ym-1*. Como control de carga se utilizó un gen que se ha descrito se expresa de manera constitutiva en los macrófagos (cuadro 4). La amplificación se realizó con el kit para PCR descrito anteriormente, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, en un volumen final de 20 µl (anexo 6).

Constitutivo	Perfil M1	Perfil M2
<i>gapdh</i>	<i>tnf-α</i>	<i>arginasa-1</i>
--	<i>inos</i>	<i>relm-α</i>
--	--	<i>ym-1</i>

Cuadro 4: Transcritos amplificados por PCR.

Electroforesis de los productos del PCR. Los productos obtenidos de la amplificación de los genes de interés fueron separados por una electroforesis en gel de agarosa (Cleaver Scientific) al 1.5 % en amortiguador TBE 1 x (anexo 3) y 0.1 % de bromuro de etidio sobre un molde.

A cada uno de los tubos de la reacción de PCR se le añadieron 4 µl de amortiguador de carga blue juice (Invitrogen); una vez mezclados se tomaron 8 µl de la muestra y se colocó en el gel de agarosa a partir del segundo pozo, dejando el primero pozo libre para cargar 2 µl del marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen). El gel con las muestras se corrió a 100 V durante 45 min y fue visualizado con el equipo Gel Doc EZ (Bio-Rad).

Cuantificación de nitritos (NO₂⁻) en el sobrenadante del cultivo celular

La determinación del NO₂⁻ se realizó en los sobrenadantes obtenidos de los cultivos de macrófagos, a las 24, 48 y 72 h post-estímulos. El ensayo consistió en preparar dos soluciones:

Solución A: 0.1 % Naftil etilendiamina diclorhidrato en agua destilada

Solución B: 0.11 % Sulfanilamida en H₃PO₄ al 5 %.

Antes de realizar el ensayo, las soluciones A y B se mezclaron 1:1 para obtener el reactivo de Griess. En una placa de 96 pozos se realizó una curva de referencia

con nitrito de sodio (NaNO_2) 1:100, se colocaron 200 μl en el primer pozo de la curva y realizando diluciones seriadas 1:2. Posteriormente se añadieron 50 μl de sobrenadante en los pozos correspondientes y 50 μl del reactivo de Griess por pozo a toda la placa, se incubaron por 5 min a temperatura ambiente y se cuantificaron las absorbancias en un lector de ELISA a 540 nm.

Ensayo de potencial de membrana mitocondrial

Para visualizar el potencial de membrana mitocondrial, se realizó una tinción intracelular. Para esto, las muestras celulares inicialmente fueron sembradas sobre portaobjetos redondos y estériles colocados en las placas de cultivo. Después de la diferenciación y estímulo que se describieron en la parte superior, las células fueron teñidas con MitoTracker Orange (Thermo Fisher), para las mitocondrias y DAPI (Sigma) para el DNA nuclear, durante 1 h a 37 °C, 5 % CO_2 en medio DMEM suplementado al 5 %, se lavó tres veces después de la tinción con medio DMEM sin suplementar para eliminar el exceso de marcadores fluorescentes. Las células fueron fijadas por 40 min en paraformaldehído 4%, y lavadas tres veces con PBS para retirar el exceso de paraformaldehído. Se montaron en portaobjetos, los cuales se observaron en un microscopio confocal a 576 nm de longitud de onda (Leica TCS SP8 X), se obtuvieron imágenes de la fluorescencia y morfología celular. Finalmente, las imágenes obtenidas se analizaron con el programa LAS X para cuantificar la fluorescencia relativa seleccionando diez regiones de interés sobre el canal de fluorescencia correspondiente al mitotracker.

Actividad de las deshidrogenasas celulares

La actividad metabólica del M ϕ se evaluó mediante la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5 difeniltetrazol (MTT) (Sigma). Los M ϕ de ratones WT o *Mif*^{-/-} diferenciados y estimulados por 72 h, fueron lavados con DMEM e infectados con *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) en una relación de 10 bacterias por célula del cultivo. Las bacterias fueron contadas y ajustadas a 10×10^6 y resuspendidas en DMEM suplementado al 5 % con SFB sin antibiótico. Una vez añadido el mililitro de DMEM con *P. aeruginosa* se centrifugaron las

placas por 10 min a 1500 rpm y se dejaron incubar por 2 h a 37 °C. Pasado el tiempo se retiró el medio y las células se lavaron dos veces con DMEM sin suplementar para eliminar el exceso de bacterias.

Para la viabilidad mitocondrial se agregó un mililitro de MTT por pozo a la placa de cultivo celular. EL MTT se preparó a partir de un stock de MTT a 0.5 mg/ml en solución salina; se tomaron 100 µL de este stock y se diluyeron en 900 µl de DMEM suplementado al 5 % de SFB, y al 1 % de antibiótico. Las células se incubaron por 30 min a 37 °C en estufa de CO₂. Transcurrido el tiempo de incubación se retiró el sobrenadante y se añadieron a cada pozo 500 µl de isopropanol para solubilizar los cristales de formazán. Finalmente, se cuantificaron las absorbancias en un lector de placas a 450 nm de longitud de onda (Epoch)(BioTeck).

Actividad fagocítica

El estudio de la capacidad fagocítica se llevó a cabo mediante infección del cultivo de los Mφ de ratones WT o *Mif*^{-/-} diferenciados con M-CSF no estimulados o estimulados con IFN-γ/LPS, IL-4/IL-13 o rMIF por 72 h, fueron lavados con DMEM e infectados con *P. aeruginosa* marcada con el fluorocromo CFSE. Brevemente, las bacterias fueron contadas y ajustadas a una concentración de 1x10⁷ y resuspendidas en solución salina, se añadió 1 µl de CFSE por cada mililitro de solución salina, se incubó 36 °C en condiciones de oscuridad por 30 min, pasado este tiempo se centrifugó a 1500 rpm por 10 min y se decantó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en solución salina y se centrifugó de nuevo con el fin de eliminar el exceso de CFSE, posteriormente se resuspendió en DMEM suplementado al 5 % de SFB sin antibiótico. Los Mφ recibieron 1 ml del stock de bacterias marcadas con CFSE (10x10⁶/ pozo). Las placas se centrifugaron por 10 min a 1500 rpm y se dejaron incubando por 2 h a 37 °C, 5 % CO₂. Se decantó el sobrenadante y se realizaron dos lavados con DMEM sin suplementar para eliminar los residuos de bacterias. Las células se cosecharon y marcaron para citometría de flujo con el método descrito anteriormente para el inmunofenotipo, utilizando los anticuerpos del cuadro 5.

Tinción	Marcador	Fluorocromo acoplado	λ excitación	λ emisión
Viabilidad	--	Zombie Aqua	355 nm	561 nm
Macrófagos (Linaje)	Anti-F4/80	PE	565 nm	578 nm
<i>P. aeruginosa</i>	--	CFSE	494 nm	521 nm

Cuadro 5: Anticuerpos utilizados para la tinción de macrófagos en el ensayo de infección.

Resultados

Verificación del genotipo de los ratones

Para verificar el genotipo de los ratones a utilizar, se amplificaron los genes que codifican para *Mif* y Neo (expresado únicamente en ratones deficientes para *Mif*) mediante la técnica de PCR. Los productos obtenidos fueron separados por medio de una electroforesis en gel de agarosa con bromuro de etidio y se revelaron posteriormente. En todos los casos se confirmó el genotipo de los ratones utilizados, ratones silvestres (WT) o deficientes para *Mif* (*Mif*^{-/-}) cumplieron con la condición esperada. Como se puede observar en la Figura 2 la expresión del producto del gen de *Mif* en los ratones WT correspondió a 200 pb, que es el tamaño esperado para este gene. Mientras que en los ratones *Mif*^{-/-} no se observó el transcrito del gen de *Mif*, pero si el transcrito del gen *Neo* a 500 pb, esto comprueba la deficiencia del gen *Mif* en los ratones mutantes utilizados. Como control positivo se utilizó el DNA genómico de ratones heterocigotos *Mif*^{+/-} y se realizó un control negativo para descartar contaminaciones en la técnica. Todos los ratones empleados en los experimentos fueron homocigotos de tipo silvestre (*Mif*^{+/+}) y homocigotos deficientes para *Mif* (*Mif*^{-/-}).

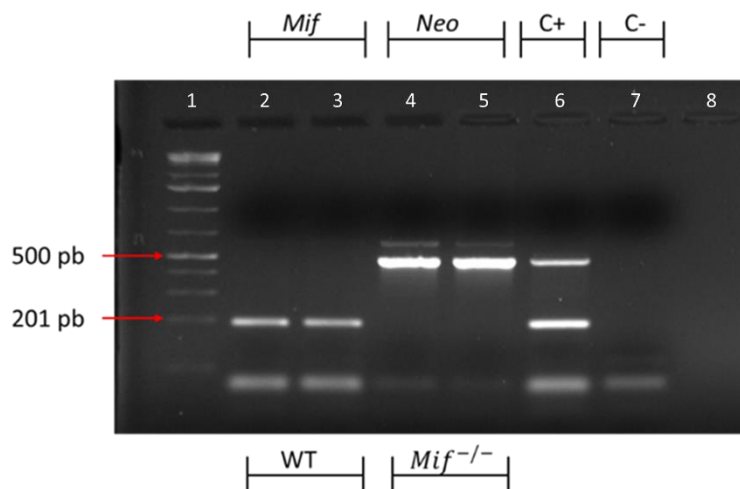


Figura 2. Gel de agarosa donde se observan los productos obtenidos de la PCR para los genes de *Mif* (201 pb) y *Neo* (500 pb). 1 = marcador de peso molecular, 2, 3 = ratones WT, 4, 5 = ratones *Mif*^{-/-}, 6 = ratón heterocigoto, 7 = control negativo sin cDNA 8= carril vacío. Se comprobó la presencia de *Mif* en los ratones WT, así como su ausencia en los ratones *Mif*^{-/-}. Los ratones WT no presentaron *Neo*, mientras que los ratones *Mif*^{-/-} sí la expresaron.

MIF modifica la expresión de algunos antígenos de membrana

Para determinar las poblaciones celulares obtenidas tras la diferenciación de las células de médula ósea con M-CSF, y posterior estimulación por 72 h con IFN- γ /LPS, IL-4/IL-13 o rMIF se analizaron las células mediante citometría de flujo para determinar los porcentajes de células con características de M ϕ M1 y M2.

Macrófagos

Durante el análisis de citometría en Dot Plots, se separaron las células que fueron adquiridas de manera singular (singletes) mediante la selección de una región lineal comparando los parámetros de área y altura del tamaño celular (FSC-A/FSC-H) (Figura 3A, Singletes). Se seleccionó la región de células grandes y granulosas (GG) (Figura 3B) y de estas se seleccionó la población viva, la región negativa para el fluorocromo Zombie Aqua (Figura 3C). Los M ϕ fueron seleccionados de la población positiva para F4/80 (Figura 3D).

En los grupos *Mif*^{-/-} sin estímulos fue posible notar un aumento de 2.5 % de células positivas para F4/80+, así como una mayor cantidad de moléculas presentes por célula en comparación con el grupo WT (Figura 3F, CTL).

En cuanto a las células WT que recibieron los estímulos IFN- γ /LPS, IL-4/IL-13 o rMIF, se observó una tendencia por expresar un porcentaje similar de M ϕ F4/80+, así como una cantidad mayor de moléculas presentes por célula. Por el contrario, la cantidad de M ϕ F4/80+ deficientes para *Mif* fue 6.75 % menos, en comparación con el WT para el tratamiento de LPS + IFN- γ , y 10.35 % menos para el tratamiento de IL-4 + IL-13. Interesantemente, los M ϕ WT estimulados con rMIF presentaron un 96.7 % de células F4/80+, el cual fue el porcentaje más alto de los tratamientos. En contraste, en los M ϕ deficientes para *Mif* se encontró un 10.2 % menos de células F4/80+, en comparación con el WT. Esto podría sugerir que la deficiencia de MIF afecta de manera negativa la maduración del M ϕ , principalmente en presencia de un estímulo de activación. Sin embargo, son necesarias más repeticiones para confirmar estas tendencias observadas.

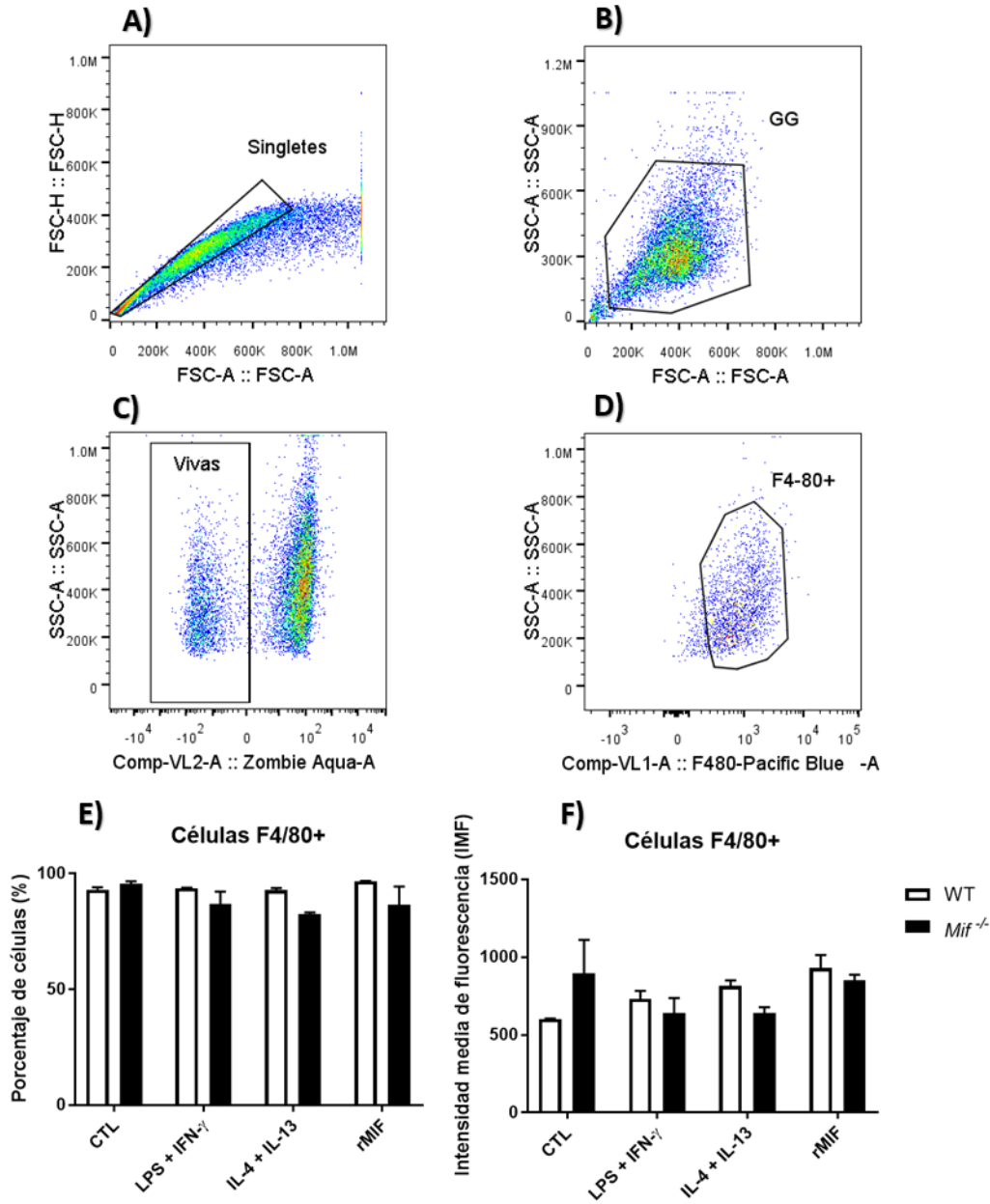


Figura 3. Estrategia de análisis para la selección de macrófagos F4/80+ de los cultivos celulares. A) Selección de singletes. B) Región seleccionada de células grandes y granulosas. C) Selección de células vivas. D) Región seleccionada para obtener a los macrófagos maduros F4/80+. E) Porcentaje de células F4/80+, las barras representan la media de los porcentajes \pm error estándar. F) Intensidad media de fluorescencia de las células positivas para F4/80+, las barras representan la media de las intensidades medias de fluorescencia \pm error estándar. n= 2.

Macrófagos CD68+TNFR1+ (M1)

Con las regiones descritas en la parte superior, se seleccionaron los Mφ positivos para CD68 y TNFR1 para obtener la población M1 (Figura 4A) y esta población se comparó con los distintos tratamientos.

En las figuras 4A y 4C (gráfica representativa de puntos y gráfica de barras, promedio de 2 experimentos respectivamente) se puede apreciar el porcentaje de células F4/80+CD68+TNFR1+ (Mφ M1). Se observó que las células sin tratamiento, provenientes de ratones WT, tuvieron 39 % más Mφ CD68+TNFR+ comparadas con los macrófagos de ratones *Mif*^{-/-} (grupo CTL). Este resultado sugiere que la presencia de MIF afecta negativamente la expresión de moléculas de membrana asociadas a Mφ M1.

Cuando las células fueron tratadas con IFN-γ/LPS, el porcentaje de células M1+ disminuyó significativamente en los grupos WT y *Mif*^{-/-} (Fig. 4C) de un 73 % a 10.66 % de CTL WT a M1 WT, respectivamente y de 39 % para CTL *Mif*^{-/-} 26.9 % para M1 *Mif*^{-/-}. De manera sorprendente, el tratamiento de FN-γ/LPS en Mφ *Mif*^{-/-} presentó 16.2 % más de células F4/80+ que los Mφ WT. Esto podría deberse a que una sobre estimulación con LPS, puede desensibilizar la respuesta de los macrófagos como fue reportado por Ruckdeschel y colaboradores en 2002. Se tiene que repetir y probar diferentes concentraciones de IFN-γ/LPS para confirmar o descartar este resultado.

Cuando las células fueron tratadas con IL-4/IL-13 se observó un incremento del 20 % en los Mφ M1+, en comparación con los Mφ CTL y 54.8 % más que el control deficiente para *Mif*. Por otro lado, las células provenientes de ratones *Mif*^{-/-} presentaron 13.15 % menos células M1+ que las IL-4/IL-13 WT y 41.6 % más que el control *Mif*^{-/-} así como 7.15 % más que las WT CTL (Fig. 4C). Esta observación sugiere que la presencia de MIF favorece la expresión de marcadores característicos de un perfil M1.

Finalmente, cuando las células WT recibieron únicamente rMIF, se observó un porcentaje de células M1+ ligeramente menor al CTL, es decir, 65.95 % de WT rMIF contra 73.6 %, de WT CTL, además, la cantidad de Mφ M1+ de dicho

tratamiento fue 10.55 % mayor que el tratamiento *Mif*^{-/-} rMIF y este último fue 16.3 % mayor que su control respectivo. Este resultado confirma que MIF se requiere para la expresión de algunos de los marcadores de membrana asociados a un perfil M1.

Macrófagos MMR+IL4R+ (M2)

A partir de la región de células grandes y granulosas, positivas para F4/80 descritas en la parte superior, se hizo el análisis de la población de Mφ M2+ seleccionando los eventos positivos para MMR+IL4R+ (Fig. 4B). A partir de la región doble positiva se compararon las poblaciones de los distintos tratamientos (Figura 4D).

El porcentaje de células positivas para los marcadores de Mφ M2 solo se observó en las células estimuladas con IL-4/IL13, donde se presenta un aumento del 3.4 % en las células *Mif*^{-/-} con respecto a las WT. Respecto a los demás tratamientos, el porcentaje de células dobles positivas fue menor al 1 % por lo que no fue posible su interpretación.

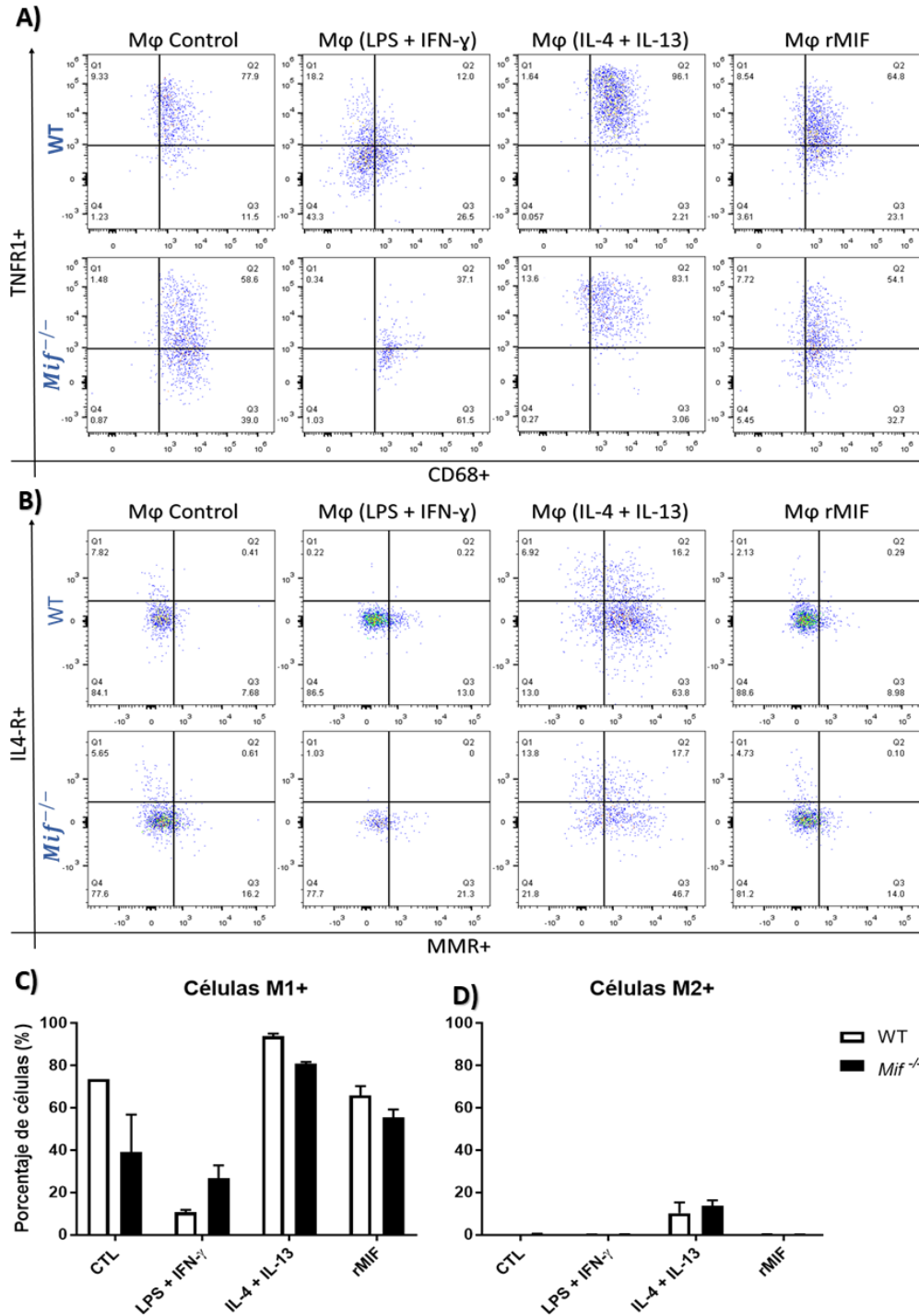


Figura 4. Dot plots y porcentajes de macrófagos M1+ o M2+ obtenidos de los cultivos celulares. A) Panel representativo de los dot plots obtenidos para CD68 vs TNFR1. B) Panel representativo de los dot plots obtenidos para MMR vs IL4R. C) Porcentaje de células CD68+ TNFR1+ las barras representan la media de los porcentajes \pm error estándar. n= 2. D) Porcentaje de células MMR+ IL4R+ las barras representan la media de los porcentajes \pm error estándar, n= 2.

La producción de TNF- α e IL-10 está influenciada por MIF

Para determinar el tipo de respuesta a nivel celular se cuantificó la concentración de la citocina proinflamatoria TNF- α , característica de M ϕ M1, y la citocina antiinflamatoria IL-10, característica de M ϕ M2, en el sobrenadante del cultivo celular a las 24, 48 y 72 horas.

Los resultados obtenidos muestran que la mayor producción de TNF- α se observó en los M ϕ estimulados con IFN- γ /LPS. De manera importante, los M ϕ *Mif*^{-/-} produjeron menos TNF- α que los M ϕ WT a las 48 y 72 h post-estimulación (Fig. 5A, M ϕ estimulados con IFN- γ /LPS). Esta observación confirma que MIF favorece el perfil inflamatorio característico de los M ϕ M1. Debido a que los M ϕ *Mif*^{-/-} no respondieron al estímulo IFN- γ /LPS para producir TNF- α .

Como se esperaba, con el estímulo de IL-4/IL-13 los M ϕ WT produjeron poco TNF- α a las 48 y 72 h post-estimulación, mientras que los M ϕ *Mif*^{-/-} no produjeron TNF- α en ningún tiempo (Fig. 5A, M ϕ estimulados con IL-4/IL-13).

Con la adición de rMIF los M ϕ *Mif*^{-/-} restablecieron su capacidad para producir TNF- α (Figura 5A, M ϕ estimulados con rMIF).

La producción de IL-10 solo se observó en los cultivos estimulados con IL-4/IL-13, alcanzándose la mayor producción en las células *Mif*^{-/-} a las 72 horas después de estímulo, seguidas de las células WT (Figura 5B, M ϕ estimulados con IL-4/IL-13).

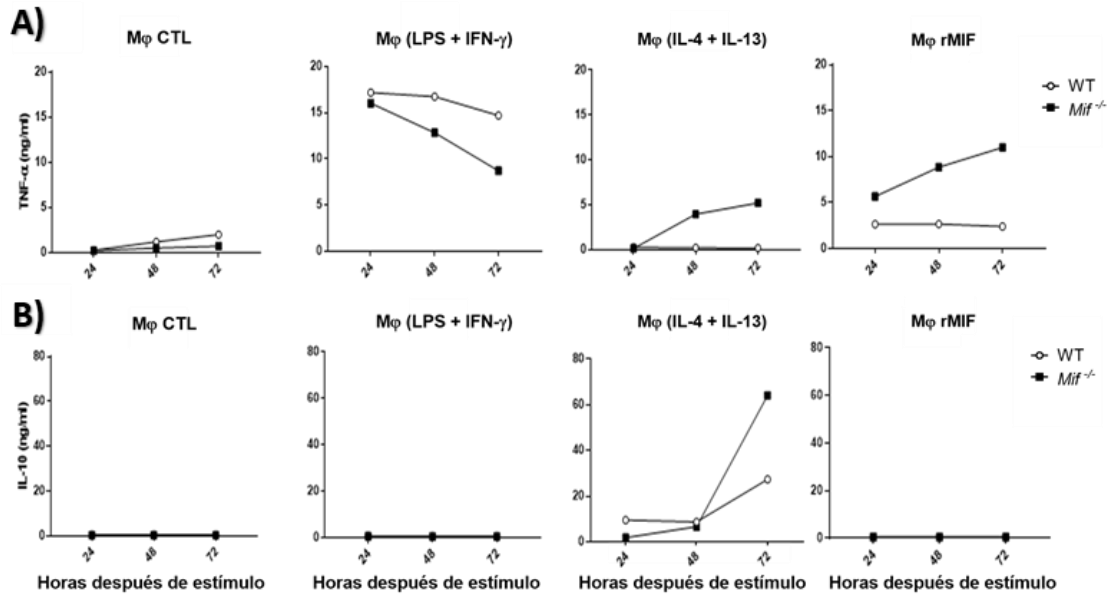


Figura 5. El estímulo LPS+IFN-γ favorece la producción de TNF-α en Mφ WT. El estímulo LPS + IFN-γ favorece la producción de TNF-α en Mφ WT. Se muestran las concentraciones de TNF-α e IL-10 en el sobrenadante de los cultivos celulares (ng/ml) a las 24, 48 y 72 h post-estimulación. A) Concentración de TNF-α en los distintos tratamientos. B) Concentración de IL-10 para los diferentes estímulos. Figura representativa de dos experimentos independientes, n= 2.

La expresión de algunos genes asociados a los perfiles proinflamatorios y antiinflamatorios se ve modificada por los diferentes estímulos

Para caracterizar la expresión de algunos genes involucrados con la polarización a macrófagos M1 o M2, se amplificaron los genes a *Tnf-α*, *iNos*, *arginasa*, *Relm-α*, *Ym-1*, como control, se utilizó *Gapdh*. Los productos del RT-PCR se revelaron mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 6A), a este gel se le realizó una densitometría para cuantificar la sobreexpresión del gen (Figuras 6B, 6C) donde se observó que los estímulos para M1 favorecen la sobreexpresión de genes asociados a una polarización M1 (Figura 6B) así como los estímulos para M2 favorecen a los genes asociados a esta polarización (Figura 6C). Además, se observó una diferencia en la expresión de genes entre ambos grupos (WT y *Mif*^{-/-}).

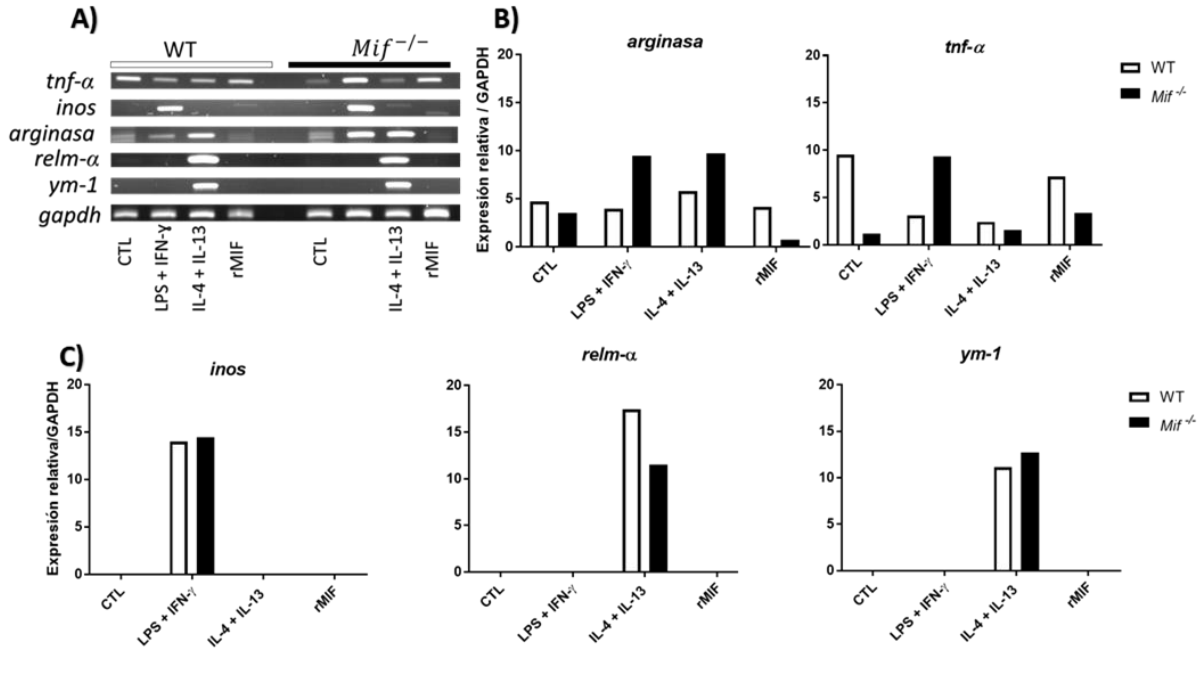


Figura 6. Transcritos de mRNA de algunos genes asociados a un perfil M1 o M2. A) Gel de agarosa donde se observan los productos del RT-PCR para diversos genes. B) Figura representativa de la cuantificación de la expresión de algunos genes de la polarización de macrófagos a M1. C) Cuantificación de la expresión de algunos genes asociados a la polarización M2 de macrófagos.

Determinación de nitritos (NO₂⁻)

La producción de ON es una molécula característica de una polarización hacia un perfil M1, es por ello por lo que se determinó de manera indirecta mediante la cuantificación de dióxido de nitrito, que es el metabolito estable que se genera a partir del óxido nítrico.

Los resultados muestran una ligera producción de óxido nítrico en las primeras 24 horas, para los macrófagos WT estimulados para M2; sin embargo, esta producción desciende al nivel basal a partir de las 48 horas y se mantiene estable. Por otro lado, la mayor producción (49.6 μM) ON ocurrió en los macrófagos estimulados para M1, siendo el grupo *Mif*^{-/-} el que alcanza la mayor producción a las 72 horas después del estímulo y comenzó a descender hasta casi alcanzar la producción del grupo WT (39.3 μM), el cual, parece seguir una tendencia a aumentar (Figura 7).

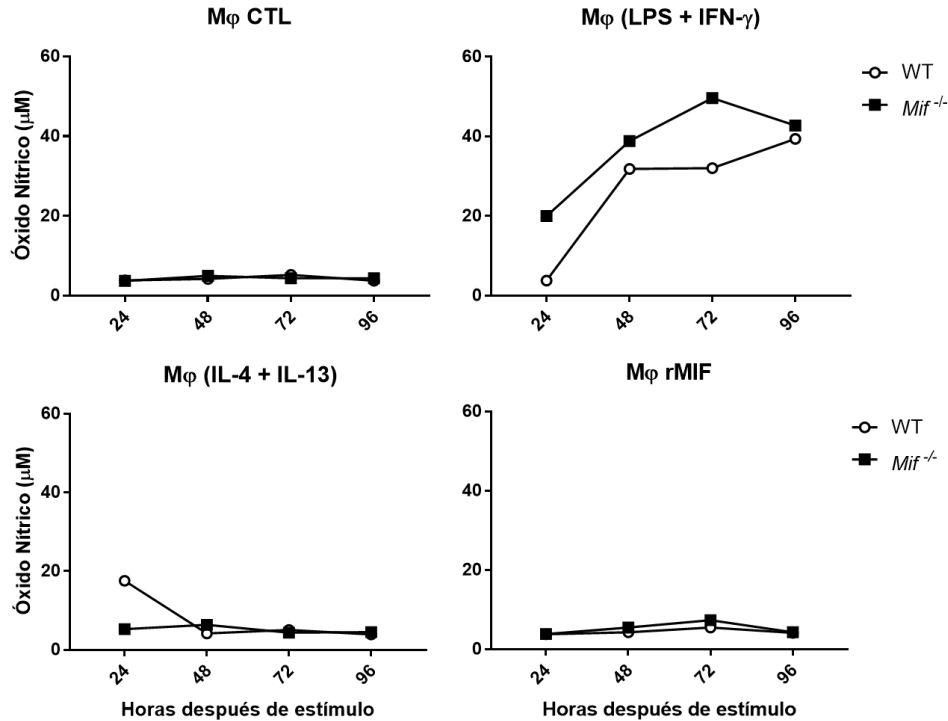
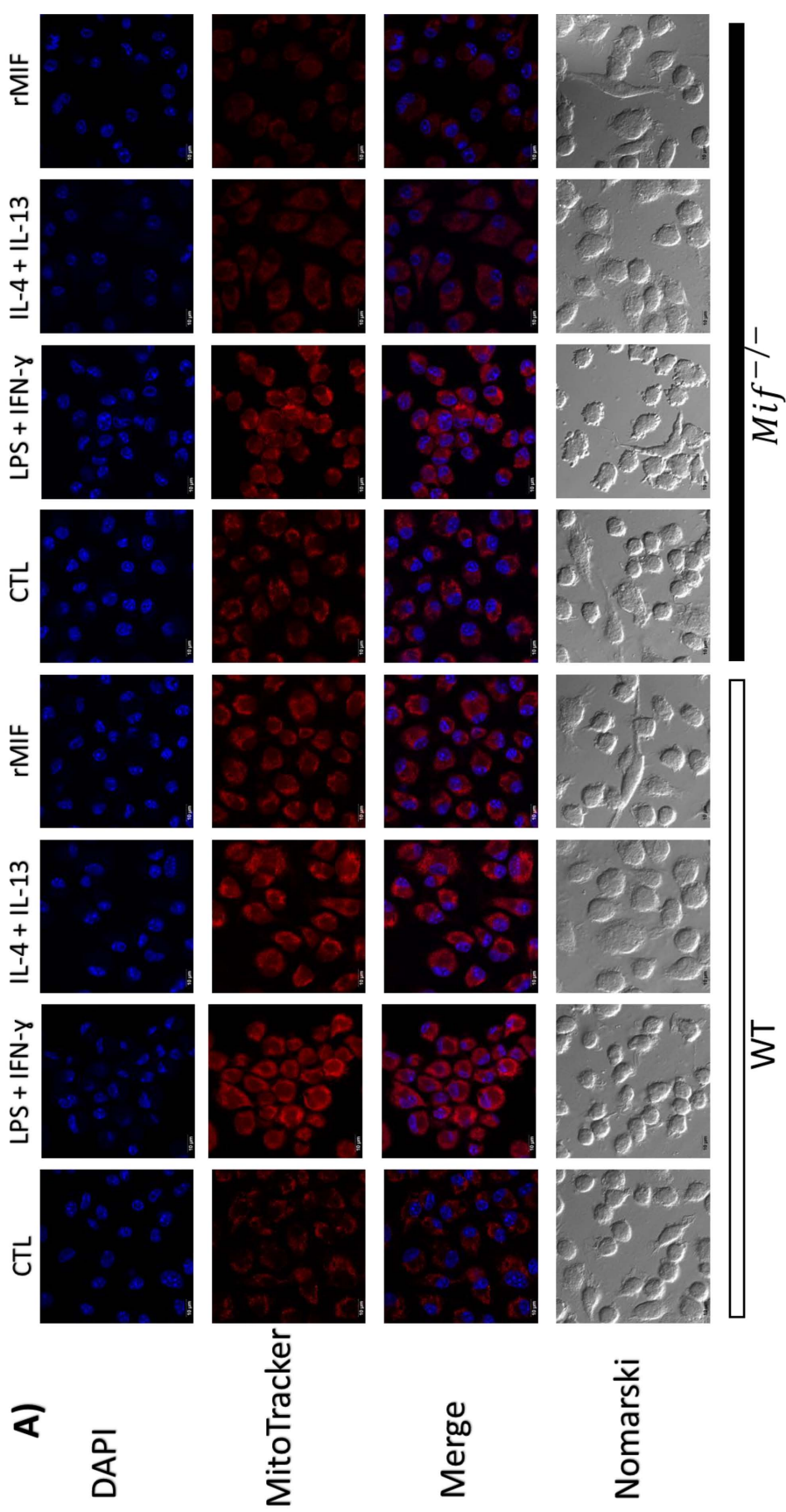


Figura 7. Concentración de NO₂⁻ en sobrenadante de cultivo de Mφ con los diferentes estímulos. Figuras representativas de la concentración de NO₂⁻ en los cultivos a 24, 48, 72 y 96 horas después de ser estimulados. Los resultados muestran la media obtenida, n=2.

La ausencia de MIF disminuye el potencial de la membrana mitocondrial

Las células fueron teñidas con MitroTracker Orange a las 72 h después de ser estimuladas para observar el cambio en el potencial de la membrana mitocondrial y se utilizó DAPI para teñir el núcleo. Las preparaciones fueron analizadas bajo un microscopio confocal (Leica TCS SP8 X) (Figura 8A), donde es posible notar cambios no solo en la mitocondria, sino también a nivel morfológico, gracias a la microscopía óptica de contraste interferencial, o Nomarski. El potencial de la membrana mitocondrial se vio significativamente alterada por los tratamientos y por la presencia de MIF (Figura 8B). La fluorescencia del control WT disminuyó significativamente en comparación con el control *Mif*^{-/-} así como con los diferentes tratamientos; sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los tratamientos de los cultivos WT. Por otra parte, el control deficiente para *Mif* presentó una mayor fluorescencia en comparación con los tratamientos en *Mif*^{-/-} además, también se puede observar diferencias entre los tres tratamientos *Mif*^{-/-} siendo

estadísticamente significativas dichas modificaciones. Interesantemente, al añadir rMIF a las células WT no se encontraron diferencias significativas con los estímulos para M1 y M2 WT, pero al añadir rMIF a células *Mif*^{-/-}, no hubo diferencias significativas de fluorescencia con el control WT ni con el tratamiento M2 *Mif*^{-/-}, pero sí hubo diferencias significativas al comparar los tres tratamientos de las células WT contra las deficientes en *Mif*.



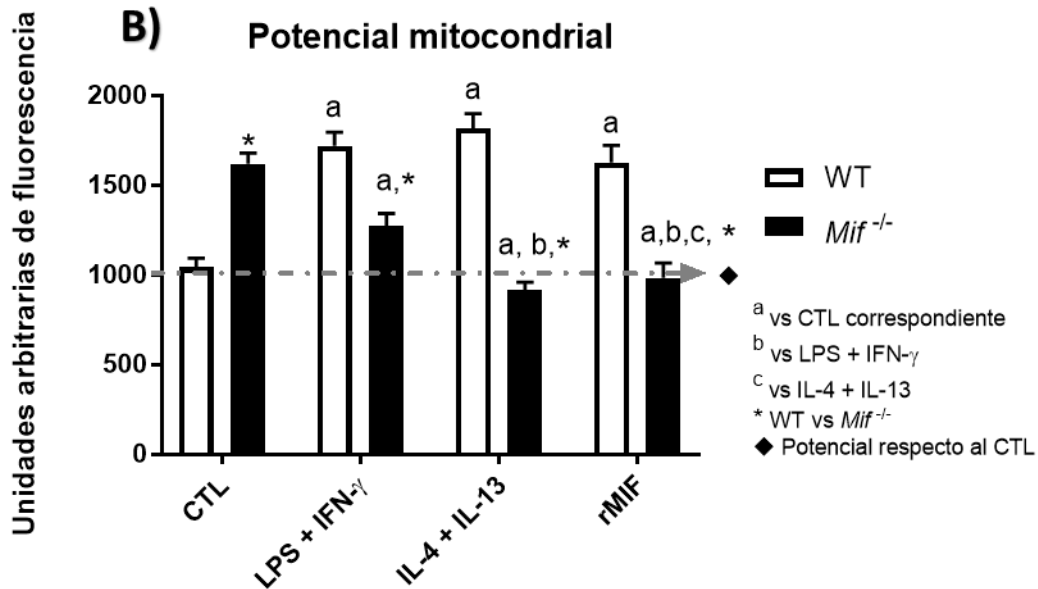


Figura 8. Cambio en el potencial de membrana mitocondrial. A) Panel de fotografías representativas de los estímulos empleados, obtenidas bajo el microscopio confocal. B) Cuantificación de la fluorescencia de cada tratamiento. Las barras representan unidades arbitrarias de fluorescencia \pm error estándar (SE). Resultados obtenidos de cuatro experimentos independientes $n=4$. a, b, c prueba de ANOVA. * $p<0.05$ prueba "t" student (Graphpad Prism 7).

La actividad metabólica celular se ve influenciada por la presencia de MIF, así como por la infección con *Pseudomonas aeruginosa*

La actividad metabólica fue determinada mediante el ensayo de reducción de MTT en las células expuestas a los estímulos para polarización (M1/M2/MIF) y en las células infectadas con *P. aeruginosa* (Figura 9). Los resultados muestran que casi todos los grupos sin infección (solo estímulos) poseen una actividad metabólica menor a la de los grupos infectados con *P. aeruginosa*, solo el WT M1 presentó una mayor actividad. Por otro lado, los grupos que fueron infectados muestran una tendencia a aumentar la reducción del MTT, tanto WT como *Mif*^{-/-} estimulados para M1 presentaron el mayor porcentaje de reducción, seguido por el grupo estimulado para M2.

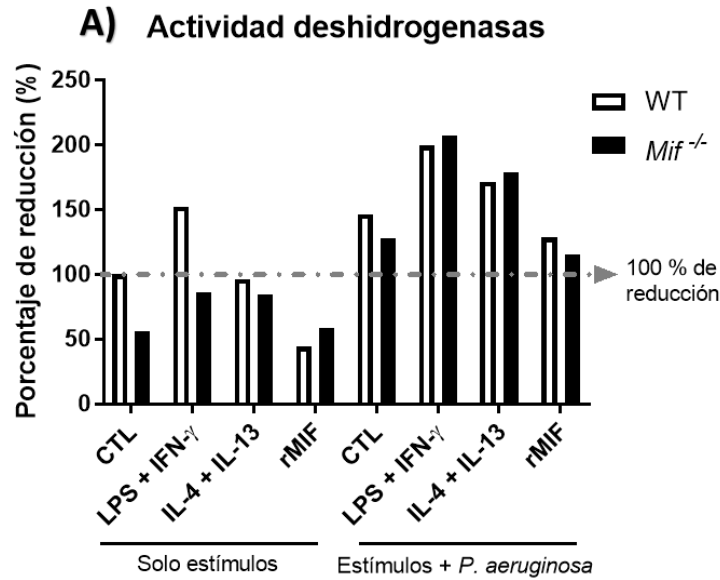


Figura 9. Actividad de deshidrogenasas celulares Porcentaje de reducción de MTT con respecto al CTL para los diferentes tratamientos empleados, así como para los cultivos infectados con *P. aeruginosa*. Las barras representan el porcentaje de reducción normalizado respecto al control WT.

Actividad fagocítica

Macrófagos

Las células que fueron adquiridas de manera singular (singletes) se separaron mediante la selección de una región lineal comparando los parámetros de área y altura del tamaño celular (FSC-A/FSC-H) (Figura 10A). Enseguida se seleccionó la región de células grandes y granulosas (GG) (Figura 10B) y de estas se seleccionó la población viva, con fluorescencia negativa para el fluorocromo Zombie Aqua (Figura 10C). Los macrófagos fueron seleccionados de la población F4/80+ (Figura 10D). En las células sin infectar se observó una mayor cantidad de células *Mif*^{-/-} que presentaron F4/80 (Figura 10E) así como una mayor cantidad de moléculas presentes por célula, en comparación con las WT (Figura 10F). En cuanto a las células infectadas con *P. aeruginosa*, en las poblaciones control no se observaron diferencias entre WT y *Mif*^{-/-} al evaluar la presencia y cantidad de moléculas F4/80 por célula. Respecto a los demás tratamientos, hay una tendencia a que más células WT expresen F4/80 y en mayor cantidad en comparación con las células deficientes para *Mif*.

Fagocitosis

Con las regiones descritas anteriormente, se seleccionaron los macrófagos positivos para CFSE+ para obtener la población que fue capaz de fagocitar a la bacteria (Figura 11A) dicha población se comparó entre los distintos tratamientos. En la figura 11B en el eje de las Y se aprecia el porcentaje de células que realizaron fagocitosis, el mayor porcentaje de células positivas correspondió a las células WT estimuladas para M1 y para las WT y *Mif*^{-/-} estimuladas con rMIF; es decir, estas tres poblaciones presentan el mismo promedio de células CFSE+. Por otra parte, los tratamientos WT control y *Mif*^{-/-} control y M1, presentaron valores similares entre ellos, pero menores a los anteriormente descritos. Finalmente, el tratamiento M2 fue el que presentó el menor porcentaje de células CFSE+, y entre estos, M2 WT presentó un porcentaje mayor que el *Mif*^{-/-} pero menor que cualquiera de los tratamientos anteriores. Ahora bien, en la figura 11C, podemos observar la intensidad media de fluorescencia por tratamiento; es decir, si las células fueron capaces de fagocitar más o menos bacterias. Es de interés que el tratamiento M2 WT presentó la mayor intensidad de fluorescencia, seguido por el M2 *Mif*^{-/-}. Las poblaciones control, tanto WT como *Mif*^{-/-} presentaron una intensidad media similar, siendo las *Mif*^{-/-} las que presentaron una intensidad ligeramente mayor a las WT. Respecto a los cultivos estimulados con LPS e IFN- γ , las células *Mif*^{-/-} presentaron una intensidad menor comparados con los anteriores, pero ligeramente mayor al WT. Finalmente, las células con la recombinante de MIF presentaron la menor fluorescencia.

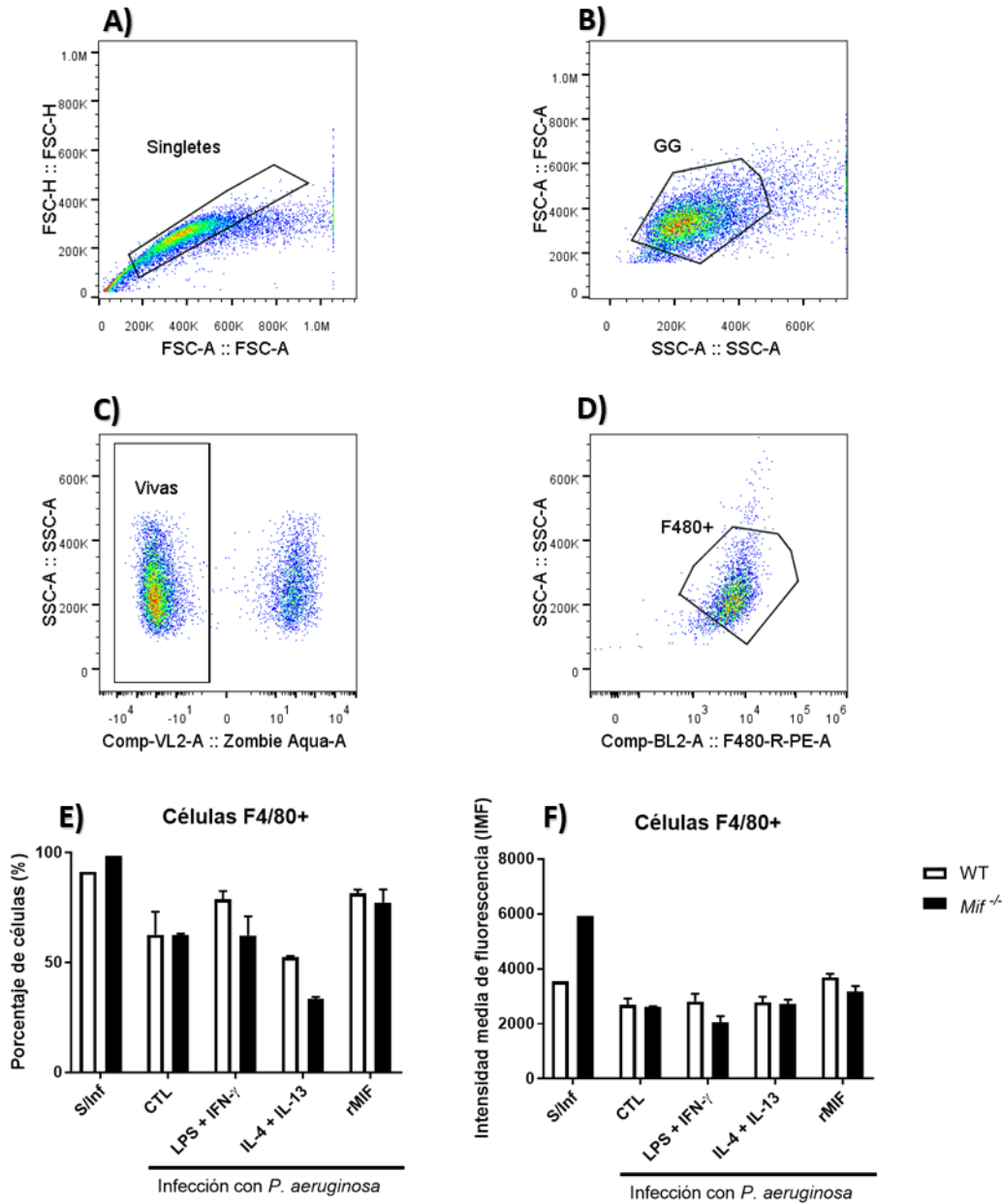


Figura 10. Estrategia de análisis para la selección de macrófagos F4/80+ de los cultivos celulares para el ensayo de fagocitosis A) Selección de singletes. B) Región seleccionada de células grandes y granulosas. C) Selección de células vivas. D) Región seleccionada para obtener a los macrófagos maduros F4/80+. D) Porcentaje de células F4/80+ las barras representan la media de los porcentajes \pm error estándar. E) Intensidad media de fluorescencia de las células positivas para F4/80, las barras representan la media de las intensidades medias de fluorescencia \pm error estándar. n = 2.

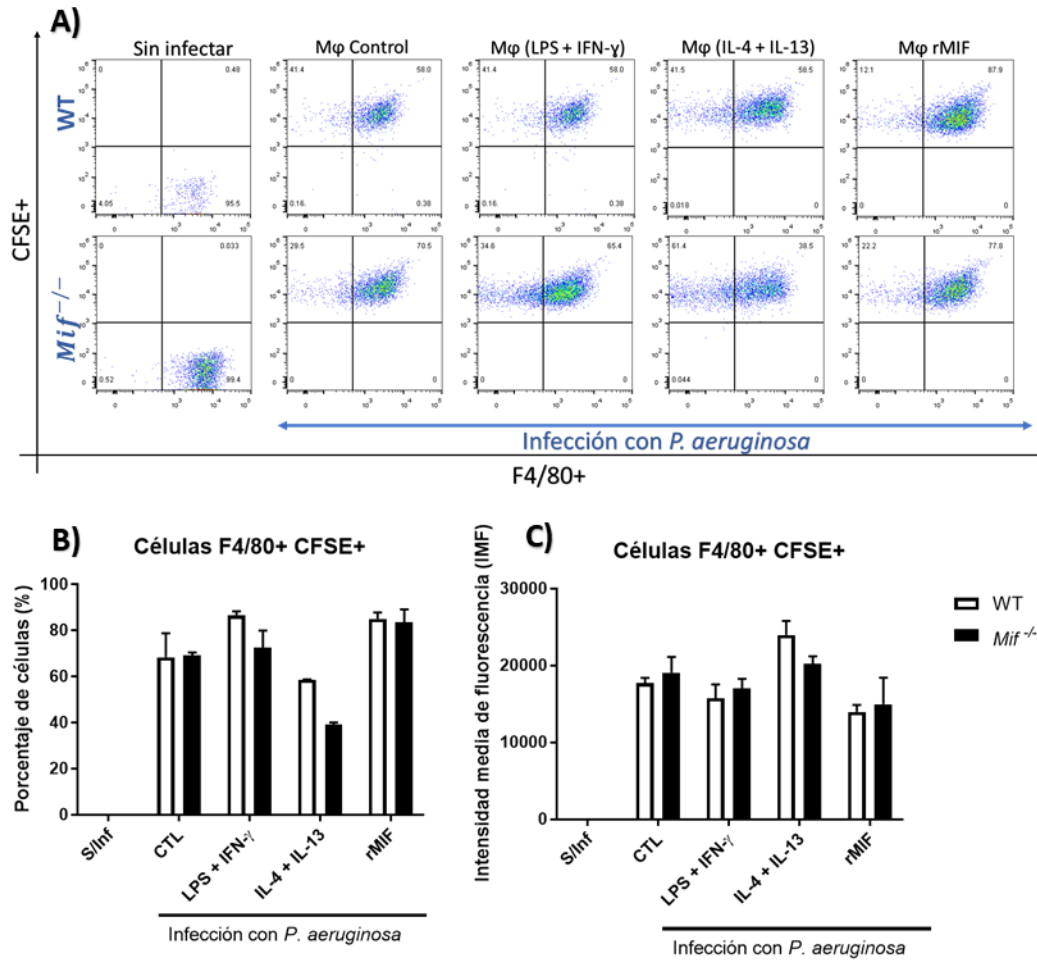


Figura 11. Dot plots y porcentajes de macrófagos CFSE+ obtenidos de los cultivos celulares infectados con *P. aeruginosa*. A) Panel representativo de los dot plots obtenidos para F4/80 vs CFSE. B) Porcentaje de células F4/80+CFSE+ las barras representan la media de los porcentajes \pm error estándar. n= 2. D) Intensidad media de fluorescencia CFSE+ las barras representan la media de los porcentajes \pm error estándar (SE). n= 2.

Discusión

La activación de los macrófagos se ha convertido en un área clave de la inmunología, debido a sus implicaciones en la inflamación y la patogénesis de diversas enfermedades; sin embargo, la descripción de esta activación continúa siendo polémica y confusa debido a que abarca una amplia variedad de marcadores utilizados de diferentes maneras. No obstante, hay que tener en cuenta la capacidad de los macrófagos para cambiar sus estados de activación, entre M1-M2, en respuesta a una extensa variedad de señales externas; desde factores de crecimiento, citocinas, productos microbianos, infecciones, anticuerpos, es decir, prácticamente cualquier entidad capaz de ser reconocida por los macrófagos [40]. Es por ello, que el perfil de activación de los macrófagos está íntimamente relacionado con el microambiente en el que se encuentran, y es este el origen de la polémica sobre el papel de MIF en la diferenciación y función de los macrófagos.

Si bien, existen reportes que han tratado de establecer la participación de MIF en dicha activación, estos se encuentran influenciados por estímulos asociados a una patología. Por ejemplo, aquellos reportes que proponen que MIF favorece una polarización hacia un perfil M1, desarrollaron sus modelos experimentales en lesiones de médula ósea y gliomas [56, 57] mientras que aquellos que sugieren un perfil M2 favorecido por la presencia de MIF, realizaron sus observaciones en tejido adiposo y melanoma [58, 59]. Por esto, el presente modelo experimental realizado *in vitro* permitió aislar a las células de estímulos externos y poder elucidar de una manera particular el efecto de MIF, evidenciando que este no favorece ninguno de los dos perfiles de polarización; más bien, mejora la respuesta típica de cada perfil al reducir el tiempo en el que las células responden a los estímulos.

Para esclarecer con mayor claridad la participación de MIF en la polarización de los macrófagos, utilizamos ratones de tipo silvestre (WT) y deficientes para MIF (ratones knockout *Mif*^{-/-}).

Las células obtenidas de médula ósea se diferenciaron a macrófagos utilizando el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF o CSF-1), el cual se sabe que regula la supervivencia, proliferación y diferenciación de diferentes precursores de fagocitos mononucleares indiferenciados hacia macrófagos completamente diferenciados [60]. Un marcador clásico de la diferenciación y maduración de los macrófagos murinos es el receptor F4/80 [61] por ello, fue el primer marcador que analizamos por citometría de flujo, y pudimos observar que, si bien, más del 90 % de las células fueron positivas para F4/80 en la mayoría de los distintos tratamientos, aunque existen diferencias en la expresión entre ellos y entre WT y *Mif*^{-/-} y diferencias aún más marcadas en la IMF. Estas diferencias, principalmente entre M1 y M2, pueden deberse a que se ha reportado que el IFN- γ puede regular negativamente la presencia de moléculas de F4/80 [62]. Además, pareciera que MIF tiene un papel en la expresión de dicho marcador, pues las células tipo silvestre muestran una ligera tendencia a presentar una mayor cantidad de antígeno en la superficie celular, aunado a esto, la mayor expresión se da en las células estimuladas con la recombinante de MIF, Sin embargo, son necesarias más repeticiones para confirmar esta tendencia.

Más adelante, evaluamos la presencia de marcadores de membrana clásicos para ambos tipos de polarización: el receptor tipo I de TNF- α y CD68 para M1 y el receptor alfa para IL-4 y el receptor para manosa (CD206) para M2. Respecto a los marcadores para M1, sorprendentemente encontramos una mayor disminución en la presencia de células con estos marcadores de superficie, especialmente en las poblaciones estimuladas con LPS + IFN- γ , con una disminución aún mayor en los cultivos WT. Sin embargo, se ha descrito que, aunque CD68 es un marcador comúnmente utilizado para discriminar macrófagos M1, pues se cree considera un marcador de inflamación [63] solo del 10 al 15 % de este marcador se expresa en la superficie celular; esto debido a que se cree que tiene un papel en la presentación de antígeno, pues se ha localizado predominantemente en endosomas tardíos y se ha descrito que es capaz de intercambiarse entre la membrana plasmática y vesículas intracelulares [64]. En relación con el receptor tipo I de TNF- α , se ha descrito que de los dos tipos de receptores que existen, el

tipo I es el que se expresa en menor cantidad en la superficie celular en comparación con el tipo II [65]; adicionalmente, la unión de TNF- α con cualquiera de los dos receptores, induce la liberación del dominio extracelular del receptor, siendo un mecanismo de regulación de esta citocina. Por otro lado, esta unión también puede llevar a la internalización del complejo TNF α /receptor, seguido de la degradación del ligando [66]. Esto coincide con los datos obtenidos de la cuantificación de TNF- α por ELISA en el presente trabajo, donde los cultivos que produjeron una mayor cantidad de TNF- α , son los que presentan el menor porcentaje de células positivas en todos los tratamientos.

Como fue mencionado anteriormente, el receptor alfa para la interleucina 4 (IL-4R α) y el MMR fueron los marcadores empleados para el perfil M2. Los datos obtenidos mostraron que solo las células estimuladas con IL-4 e IL-13 (M2) fueron positivas para ambos marcadores, los demás tratamientos obtuvieron menos del 1 % de dobles positivas, esto, debido a que se sabe que tanto IL-4 como IL-13 inducen la expresión del MMR [67, 68] lo cual se puede observar en los dot plots del presente trabajo. Además, IL-4 inhibe la producción de TNF- α en macrófagos [69] no obstante, en el presente estudio esto solo sucedió en las células WT, pues las células *Mif*^{-/-} produjeron cantidades bajas de TNF- α ; sin embargo, se sabe que los macrófagos M2 pueden producir cantidades bajas de dicha citocina en comparación con la producida por los M1 [70]. Por otro lado, el receptor alfa de la interleucina 4 (IL-4R α), al unirse a su ligando favorece el reclutamiento de una segunda cadena: la cadena gamma común (γ c). La cadena α del receptor de la IL-4 también funciona como componente del receptor de la IL-13 (IL-13R) [71]. Como fue mencionado anteriormente, IL-4 e IL-13 fueron los estímulos utilizados para polarizar a los macrófagos a un perfil M2, y ambas citocinas necesitan la cadena α del receptor de la interleucina 4, cadena que es reconocida por el anticuerpo utilizado para la citometría. Probablemente, la unión de los ligandos con sus respectivos receptores provoque un cambio estructural o un impedimento físico que disminuya el porcentaje uniones antígeno-anticuerpo, lo cual explicaría el bajo porcentaje de células IL-4R α ⁺ así como las dobles positivas (MMR⁺, IL-4R α ⁺). Por lo mencionado anteriormente, es probable que los cultivos control,

M1 y estimulados con MIF recombinante expresaran una baja cantidad de ambos receptores en comparación con los M2, aunado a eso, se sabe que la expresión del MMR puede ser demasiado baja como para ser cuantificable por citometría de flujo [72]. Adicionalmente, la producción de IL-10, una citocina antiinflamatoria se encontró restringida a aquellos macrófagos estimulados con IL-4 e IL-13, como ha sido reportado previamente [73], encontrándose una mayor producción en los ratones deficientes de *Mif*, sugiriendo que MIF podría tener un papel en la regulación de la producción de esta citocina.

Además de los marcadores de membrana y la producción de citocinas, otra manera frecuente de caracterizar la polarización de los macrófagos es mediante la determinación de la expresión de transcritos de mRNA. Para ello, evaluamos la expresión de transcritos asociados a ambas polarizaciones. Como fue mencionado anteriormente, TNF- α mostró diferencias entre la cantidad de citocina producida y la cantidad de receptor en las células bajo los diferentes tratamientos; por ello, evaluamos la expresión del transcrito, encontrando diferencias entre las expresiones de cada tratamiento, pero interesantemente, siguiendo la misma relación entre ellos, por ejemplo, para M1 WT: menor cantidad de transcrito, mayor cantidad de citocina liberada, menor cantidad de receptor para TNF- α y por ende, menor cantidad de células positivas para este. Por otra parte, pareciera ser que esta relación entre la cantidad de TNF- α producido, el receptor I para TNF- α , el porcentaje de células positivas para este receptor y F4/80+ así como la expresión del transcrito pareciera estar regulada, en parte, por MIF, pues se sabe que esta citocina favorece la producción de citocinas proinflamatorias, como TNF- α e IFN- γ [53]. Para el perfil antiinflamatorio, se evaluaron los genes *ym-1* y *relm- α* , pues son clásicos del perfil M2. Ambos transcritos se expresaron únicamente en los macrófagos con una polarización M2, lo cual coincide con lo reportado anteriormente, por Raes en 2002, donde reportan que ambos transcritos son fuertemente inducidos tanto *in vivo*, como *in vitro* en los macrófagos M2, pues dependen del estímulo con IL-4; por el contrario, el IFN- γ antagoniza los efectos de IL-4 sobre la expresión de *relm- α* y *ym1*, por ello, en el presente trabajo, dichos marcadores no fueron encontrados en los demás estímulos.

Además de estos tres marcadores, evaluamos otros marcadores involucrados con el metabolismo de la L-arginina por medio de dos enzimas distintas: iNOS para producir óxido nítrico y arginasa para producir colágeno; correspondiendo a los perfiles M1 y M2, respectivamente. Los resultados obtenidos muestran que el transcrito para *inos* se encuentra expresado únicamente en los macrófagos estimulados con LPS + IFN- γ , con un ligero aumento en las células *Mif*^{-/-}, pues se sabe que ambos estímulos, ya sea solos o en conjunto, inducen la expresión de dicha enzima, por el contrario, IL-4 e IL-13 así como MIF recombinante no son capaces de inducir una alta expresión de esa enzima. Para el caso de la arginasa ocurre algo muy interesante, si bien, esta enzima es un indicador clásico de una polarización M2, se ha documentado que el LPS puede estimular tanto a la arginasa como a la iNOS, por otro lado, el IFN- γ no solo no es capaz de inducir la actividad de esta enzima, al mismo tiempo inhibe la inducción ocasionada por el LPS [75]. Sorprendentemente, nuestros resultados muestran una expresión similar entre ambos controles, WT M1 y WT MIF. Esto se debe a que todas las células fueron obtenidas de médula ósea y diferenciadas con MCSF. Esta diferenciación confiere propiedades funcionales diferentes a estas células, por ejemplo, en comparación con líneas celulares o células diferenciadas con GM-CSF. Por ello, las células diferenciadas, pero sin estimular, presentan niveles considerables de arginasa, no obstante, ni el LPS, solo o en conjunto con IFN- γ aumentaron los niveles de arginasa [76]. En el presente trabajo, tanto M1 *Mif*^{-/-} como M2 *Mif*^{-/-} presentaron casi la misma cantidad de expresión del transcrito de *arginasa*, sugiriendo que MIF pudiera tener un papel en la regulación de la transcripción de la arginasa en respuesta a ambos estímulos.

De la misma manera que con la producción de citocinas, quisimos evaluar si una mayor expresión del transcrito de iNOS resultaba en una mayor producción de ON. Como ha sido ampliamente reportado, uno de los marcadores clásicos de los macrófagos M1 es la producción de ON en respuesta al IFN- γ solo o en conjunto con LPS [77], lo cual coincide con los datos obtenidos en la cuantificación indirecta del ON, donde encontramos una relación directa entre la cantidad de expresión de *inos* con la producción del ON; es decir, los macrófagos M1 deficientes de *Mif*

presentaron mayor expresión del transcrito de *inos* y mayor cantidad de óxido nítrico, en relación con la cantidad de transcrito y producción obtenidos por los macrófagos M1 de tipo silvestre. Para los demás tratamientos no encontramos niveles aumentados de este metabolito en comparación con el control, sugiriendo que MIF por sí solo no favorece la producción de ON, aunque pareciera tener un papel en regular la producción de este en los M1.

Como ha sido mencionado anteriormente, el metabolismo de la L-arginina en ON o colágeno es una manera clásica de diferenciar los tipos de polarización; de hecho fue una de las primeras maneras en diferenciar a los macrófagos M1 de los M2 [40]. Siguiendo esta línea, evaluamos si MIF, solo o en conjunto con los estímulos para cada perfil, tenía implicaciones a nivel metabólico en la célula. Una de las maneras frecuentemente utilizadas para evaluar la función mitocondrial y el estrés oxidativo en la mitocondria se basan en emplear la intensidad de sondas mitocondriales o de especies reactivas de oxígeno [78]. En el presente trabajo, las células fueron teñidas con Mitotracker Orange, el cual es un colorante catiónico fluorescente que se acumula en la mitocondria en respuesta al alto potencial negativo de membrana.

Como fue mencionado brevemente en la introducción, en comparación con los macrófagos sin estimular, el metabolismo de los macrófagos M1 se caracteriza por altos niveles de glicólisis y la vía de las pentosas fosfato, estas dos vías favorecen una rápida producción de ATP, así como la generación de NADPH para la producción de ROS y ON. Por otra parte, estos macrófagos acumulan ciertos intermediarios del TCA, incluyendo succinato, citrato y ácido itacónico, además, de un incremento en la síntesis de ácidos grasos. Sin embargo, se ha demostrado que los macrófagos M1 realizan la fosforilación oxidativa con un TCA “dañado”. El primer “daño” ocurre en la enzima succinato deshidrogenasa que convierte el succinato en fumarato y sirve como el complejo II de la cadena transportadora de electrones. Este “daño” lleva a una acumulación de succinato, el cual se ha demostrado estabiliza HIF1 α induciendo a su vez, la expresión de IL-1 β , la cual es una citocina proinflamatoria. Por otro lado, la acumulación de succinato y su

oxidación, regula la producción de ROS y limita las citocinas antiinflamatorias IL-1RA e IL-10. El otro “daño” en el TCA ocurre después del citrato, en la enzima isocitrato deshidrogenasa, que transforma el citrato en α -ketoglutarato. La acumulación del citrato, así como el succinato ha sido relacionada con procesos proinflamatorios, principalmente relacionados con la producción de ROS e inflamación para la defensa del huésped. Sin embargo, las vías metabólicas precisas que afectan la funcionalidad mitocondrial y los mecanismos compensatorios que mantienen estables las funciones metabólicas básicas de la célula con un TCA “dañado” siguen sin ser comprendidos. En contraste, los macrófagos M2 se caracterizan por un TCA “intacto”, altos niveles de fosforilación oxidativa y oxidación de ácidos grasos, permitiéndoles una generación continua y eficiente de energía, necesaria para mantener sus funciones de reparación y remodelación del tejido. Estos macrófagos además producen bajas cantidades de ON, permitiendo que se mantenga la fosforilación oxidativa. Al contrario de los M1, los M2 no presentan una actividad glucolítica incrementada. [27, 79-81]

Como fue descrito, aunque existen diferencias entre el metabolismo de los diferentes tipos de macrófagos (sin estimular, M1, M2), los tres poseen una mitocondria sana, pues conservan el potencial de membrana incluso después de un estímulo, es decir, mientras que el M1 utiliza la mitocondria principalmente para la producción de ROS, el M2 la utiliza para producir ATP por medio de OXPHOS, por ello ambos presentan niveles similares de actividad mitocondrial.

Un efecto secundario de la respiración aeróbica es la generación de ROS, siendo el O_2^- el más común. Intracelularmente, existen varias fuentes de ROS, incluyendo la cadena transportadora de electrones en la mitocondria, el complejo NADPH oxidasa acoplado a membrana, el retículo endoplásmico, entre otros, siendo la mitocondria la principal fuente de ROS, debido a que durante la OXPHOS algunos electrones pueden escaparse de los complejos 1 y 3, interactuando con oxígeno y formando O_2^- , una vez formado, es transformado rápidamente en peróxido de hidrógeno por la superóxido dismutasa 1 en el citoplasma y superóxido dismutasa 2 en la mitocondria. Tanto el peróxido de hidrógeno como el O_2^- pueden ser

liberados de la mitocondria por medio de acuaporinas mediante transporte por difusión. Los niveles de los compuestos oxidantes producidos por estas vías están determinados por el balance entre su generación y la captura por un sistema de enzimas antioxidantes, entre las que se incluyen catalasas, peroxirredoxinas, tioredoxinas, y metionina sulfóxido reductasas. Aunado a esto, existen importantes reguladores del balance redox de la célula que son enzimas pertenecientes al ciclo redox del glutatión, que desintoxican el peróxido de hidrógeno utilizando como sustrato el glutatión reducido (por ejemplo, por medio de la glutatión peroxidasa) para formar agua y glutatión oxidado y usando este para generar (mediante la glutatión reductasa y NADPH) glutatión reducido nuevamente [82, 83]. Más allá de su rol como mediador de la respuesta inmune del huésped, se ha reportado que MIF posee funciones fuera del sistema inmune, entre las que destaca su actividad enzimática, tanto de tautomerasa como de proteína-tiol oxidorreductasa [84]. Más adelante, se demostró que la actividad enzimática de MIF utiliza el glutatión reducido como sustrato, indicando que MIF puede estar involucrado en la regulación de los procesos redox celulares [85]. Finalmente, la actividad redox de MIF fue comprobada *in vitro* en fibroblastos cardiacos expuestos a condiciones oxidantes, donde la ausencia de MIF resultó en un incremento de ROS intracelulares. *In vivo*, corazones de un modelo animal mostraron niveles más altos de glutatión oxidado, aumento en la oxidación de proteínas y daño mitocondrial, incluyendo liberación del citocromo c [86]. En contraste, también se ha reportado que MIF favorece la producción de ROS, tanto mitocondrial como citosólica. La unión de MIF con su receptor CD74 se internaliza por endocitosis llevando a la activación de la NADPH oxidasa, produciendo ROS, que al acumularse pueden inducir autofagia y la pérdida del potencial de membrana mitocondrial [87] Eso coincide con los resultados obtenidos en el presente trabajo, donde en las células *Mif*^{-/-} sin estimular presentan un mayor potencial de membrana en comparación con las WT, probablemente ocasionado por la falta de un mecanismo eficiente para transformar las ROS producidas, llevando a una acumulación citosólica inhibiendo el transporte de peróxido de hidrógeno y O₂ de la mitocondria hacia el citosol; al no haber liberación de estos de la mitocondria, se

favorece el aumento de las cargas negativas dentro de la mitocondria y a su vez, la cantidad de MitoTracker internalizado. Al añadir los estímulos (M1, M2) se aumenta el metabolismo mitocondrial y por ende la cantidad de cargas negativas; sin embargo, las células WT cuentan con un sistema redox más eficiente que favorece la continuidad del ciclo aún con un aumento metabólico. Por el contrario, las células *Mif*^{-/-} con mecanismos menos eficaces, probablemente hayan alcanzado niveles muy altos de ROS, favoreciendo el desacoplamiento parcial de la OXPHOS, el cual es un mecanismo que sirve para disminuir el potencial de membrana y a su vez, disminuir la generación de ROS, manteniendo una producción suficiente de ATP [88]. Finalmente, añadir rMIF a un cultivo deficiente, favorece la disminución del potencial de membrana hasta niveles similares a las células WT sin estimular. Por otro lado, las células WT con la recombinante de MIF aumentan la fluorescencia probablemente a que en este caso MIF funcionaría como estimulante de la producción de ROS más que como antioxidante. Sin embargo, son necesarios más experimentos para comprobar estas vías. Por último, al añadir la recombinante de MIF tanto a células WT como *Mif*^{-/-} no se favorece la polarización hacia M1 o M2, pues no hay diferencias significativas entre WT M1, M2 y MIF recombinante pero sí hay diferencias muy significativas entre *Mif*^{-/-} más la recombinante de MIF con WT M1 y M2, lo cual refuerza nuestra creencia que MIF, por si solo, no favorece algún perfil de polarización, solo mejora la respuesta típica de cada perfil. Tomando esto como base, es que proponemos el siguiente esquema de la actividad de MIF y su papel en el balance redox celular.

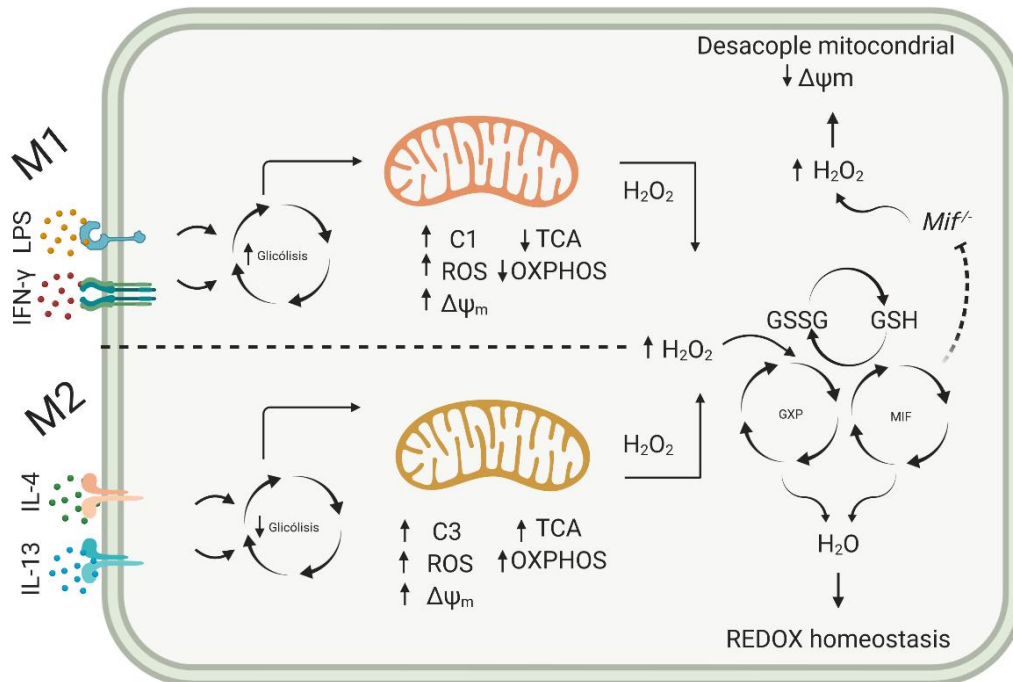


Figura 12. Propuesta del papel de MIF en la homeostasis celular. Los estímulos clásicos para M1 y M2 conllevan al aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, principalmente el peróxido de hidrógeno, como producto de la producción de energía dentro de la célula. MIF parece favorecer la conversión del peróxido de hidrógeno en agua y disminuyendo el desacople mitocondrial. GSH: glutatión reducido, GSSG: glutatión oxidado.

Además de la actividad mitocondrial, quisimos conocer el nivel metabólico celular, para lo cual medimos la capacidad de las células para reducir el MTT. El MTT pertenece a un grupo de sales de tetrazolio que se han vuelto útiles para medir la actividad metabólica, no solo la viabilidad celular, Esta técnica se basa en la reducción del MTT a formazán principalmente mediante la acción del NADH (originado citosólicamente en la glicólisis) y NADPH (obtenido de la fase oxidativa de la vía de las pentosas fosfato) evidenciando el estado redox celular, no limitándose solo a la mitocondria, sino involucrando el citoplasma y orgánulos como el endosoma/lisosoma. Por ello, evaluamos si MIF tenía alguna implicación en este mecanismo, tanto por sí solo como en conjunto con los estímulos para M1 y M2, e incluso al retar a las células a una infección bacteriana con *Pseudomonas aeruginosa*. Como es posible observar en los resultados sin infección, los

macrófagos *Mif*^{-/-} poseen una menor reducción del MTT, probablemente porque MIF posea un papel regulando la producción de NADH y/o NADPH mediante la modificación del metabolismo celular basal, lo cual se ha observado en ratones *Mif*^{-/-}, donde la deficiencia de *Mif* conlleva a una intolerancia a la glucosa [89]. Por otro lado, esa disminución de NADH y NADPH de manera basal resultan en una menor transformación de GSSG en GSH y esto se traduce en una menor transformación de H₂O₂ en H₂O [90] reforzando nuestra teoría de la acumulación de ROS discutida sobre el MitoTracker. Como fue mencionado anteriormente, MIF favorece la sobreexpresión de TLR4 que es el receptor donde será reconocido el LPS. La unión de TLR4 con su agonista favorece un aumento en la glicólisis y, por ende, mayor NADH, lo cual se traduce en la mayor reducción del MTT encontrada los macrófagos M1 WT en comparación con los demás tratamientos sin infección. De igual manera, la disminución en la glicólisis en los M2 se ve reflejada en el menor porcentaje de reducción del MTT, el cual, interesantemente es similar a los macrófagos sin estímulo. También resulta interesante que tanto los macrófagos M1 y M2 *Mif*^{-/-} presentan una reducción similar pero mayor al sin estímulo; es decir, el estímulo pareciera ser suficiente para modificar el metabolismo celular, y en el particular caso de los M1 *Mif*^{-/-}, se modifica el metabolismo, pero no se iguala al tipo silvestre. Contrastantemente, añadir la recombinante de MIF disminuye en mayor medida el porcentaje de reducción, esto probablemente debido a que su metabolismo no está mediado mayormente por glicólisis (como el caso de los M1) y porque MIF disminuye el NADPH disponible para reducir el MTT mediante la acumulación de la NADPH oxidasa que transforma el NADPH en NADP [87]. Respecto a los estímulos infectados con *P. aeruginosa* es importante notar que los macrófagos, para ambos casos, estuvieron en contacto con sus respectivos estímulos por 72 h, después de eso, el cultivo con *P. aeruginosa* solo duró dos horas. Primero que todo, es importante notar las diferencias entre tratamientos, donde es evidente que el estímulo previo a la infección jugó un papel importante para la reducción del MTT. Los macrófagos sin estimular, aunque aumentaron la reducción después de la infección, presentan un patrón similar obtenido a partir de la estimulación para M1, con una mayor reducción en los WT,

probablemente por el mismo fenómeno discutido anteriormente relacionado a la expresión de TLR4 y MIF. Al igual que con el estímulo para M1, se obtuvo una mayor reducción que el control al infectar a los macrófagos M1 con *P. aeruginosa* y contrastantemente con el resultado solo con estímulos, de igual manera, los cultivos M2 presentaron mayor reducción que los controles, probablemente relacionado con el cambio metabólico dado por el estímulo con IL-4 e IL-13, por otro lado las células *Mif*^{-/-} M1 y M2, presentaron un porcentaje ligeramente mayor de reducción en comparación con las WT probablemente por lo discutido anteriormente sobre MIF y la oxidación del NADPH, sin embargo, es necesario realizar más repeticiones para corroborar esta tendencia. Finalmente, aunque la infección con *P. aeruginosa* aumentó la actividad enzimática para los cultivos estimulados con la recombinante de MIF, esta actividad no fue similar a la obtenida con los estímulos para M1 y M2.

Posteriormente, evaluamos la capacidad de las células para fagocitar *P. aeruginosa* después de ser estimuladas con el fin de elucidar si MIF está involucrada en dicha capacidad. Esto, porque como ha sido mencionado antes, se ha reportado que los diferentes tipos de polarización poseen diferente capacidad para realizar fagocitosis. De igual manera que con las citometrías anteriores, lo primero que observamos fue la expresión de F4/80 donde encontramos que los tratamientos infectados mostraron una disminución tanto en el porcentaje de células que expresaban el antígeno tanto en la cantidad de moléculas F4/80 por célula; probablemente ocasionado por el IFN- γ como fue descrito anteriormente; por otro lado, se ha reportado que la infección de macrófagos con algunos patógenos puede modificar la expresión de algunos antígenos de membrana de los macrófagos en comparación con células sin estimular e incluso en células estimuladas con LPS, disminuyendo algunos antígenos, como F4/80 o el receptor Fc [91], sin embargo, el mecanismo que lleva a esta disminución es incierto. Curiosamente, las células estimuladas con MIF recombinante aumentan ligeramente la expresión de F4/80 en comparación con M1 y M2, a pesar de la infección, sugiriendo que MIF podría tener una participación en la expresión de dicho marcador. Sin embargo, son necesarios más experimentos para corroborar

esa tendencia. Respecto a la capacidad fagocítica, sorprendentemente las células sin estimular presentaron un porcentaje similar de células CFSE+ así como una IMF semejante, independientemente de si son WT o deficientes para *Mif*. Los cultivos WT M1 obtuvieron el mayor porcentaje de células que fueron capaces de fagocitar, esto debido a que hay reportes que mencionan que las células estimuladas con dosis no letales de LPS entran en un estado de tolerancia a endotoxinas como un mecanismo protector de una respuesta inflamatoria excesiva para el huésped. Las células en estado de tolerancia a endotoxinas presentan una capacidad fagocítica mayor en comparación con células sin estimular, además, conservan su capacidad de eliminar patógenos internalizados [92] por otro lado, pareciera que la ausencia de MIF disminuye esta capacidad fagocítica de las células diferenciadas a M1. En contraste, las células M2 obtuvieron los menores porcentajes de fagocitosis, sugiriendo que el preestímulo con IL-4 e IL-13 disminuyera la capacidad fagocítica, y disminuyendo aún más en los macrófagos *Mif*^{-/-}, proponiendo nuevamente un papel para MIF en la capacidad fagocítica, lo cual ha sido reportado anteriormente por Onodera en 1997, donde le otorgan a MIF un papel importante en la fagocitosis mediada por macrófagos. Al observar los porcentajes obtenidos de los macrófagos estimulados con MIF, donde WT y *Mif*^{-/-} presentan valores muy similares entre ellos y similares al porcentaje obtenido por M1 WT, se hace más evidente el papel de MIF en la capacidad fagocítica; esta mejora en la fagocitosis probablemente esté relacionada con el aumento en la expresión de TLR-4 favorecido por MIF (mencionado anteriormente). Contrastantemente, los resultados obtenidos en la intensidad media de fluorescencia son inversamente proporcionales; es decir, los macrófagos estimulados con rMIF, aunque más células fueron capaces de fagocitar, fagocitaron relativamente un menor número de bacterias. Lo mismo para los demás tratamientos: a mayor número de células positivas para CFSE, menor IMF. Esto podría deberse a una causa de disponibilidad de la bacteria durante el ensayo de fagocitosis: al haber más células fagocitando y al haber un número “limitado” de bacterias por pozo, la cantidad de bacterias que puede fagocitar cada célula es menor y viceversa.

MIF, desde su descripción ha sido considerado una citocina mayormente proinflamatoria, a excepción de un par de trabajos, lo cual nos llevaba a pensar que MIF favorecería el perfil M1 de polarización y he aquí el por qué de nuestra hipótesis. Esto, además, nos llevó a considerar medir más parámetros asociados a un perfil proinflamatorio que a su contraparte. Contrastante a lo que suponíamos al inicio, MIF demostró ser más un potenciador que un polarizador, refutando nuestra hipótesis inicial.

En general, estas observaciones demuestran que MIF tiene un papel importante sobre la funcionalidad de los macrófagos para favorecer la respuesta inmune del huésped, mejorando o incrementando la respuesta dada por estos; sin embargo, MIF por sí solo no favorece ninguno de los dos extremos de la polarización de los macrófagos, más bien, pareciera que la respuesta ocasionada por MIF está influenciada por los múltiples estímulos externos y dicha participación será variante según la función que estemos considerando, puesto que mientras en algunos ensayos pareciera que la ausencia de MIF no modifica la actividad celular, en otros parece ser de vital importancia.

Conclusiones

De acuerdo con los objetivos planteados en el presente proyecto, podemos concluir lo siguiente:

- La polarización de los macrófagos se realizó satisfactoriamente.
- MIF favorece la expresión de algunos marcadores de membrana asociados a la maduración del macrófago y a los tipos de polarización.
- Los cultivos WT producen más TNF- α y menos IL-10 que los *Mif*^{-/-}.
- MIF modifica la expresión de transcritos de genes asociados a perfiles M1 y M2.
- La ausencia de MIF favorece la producción de óxido nítrico.
- MIF juega un papel importante en la actividad mitocondrial asociada al estado redox celular.
- La presencia de MIF mejora la respuesta antioxidante celular; sin embargo, ante un proceso infeccioso, MIF no modifica la respuesta de las deshidrogenasas celulares.
- MIF favorece la actividad fagocítica ante una infección con *P. aeruginosa*.

Perspectivas

- Actualmente se ha sugerido que la caracterización de los perfiles M1 y M2 incluye nuevos marcadores celulares, ya sea de membrana o intracelularmente, por ello consideramos importante ampliar el panel de marcadores con el fin de identificar la expresión de otras moléculas por citometría de flujo.
- Además de transcritos, cuantificar la producción de las proteínas de interés.
- La producción de citocinas es fundamental para determinar el perfil de polarización de los macrófagos, por ello sugerimos determinar otras citocinas en sobrenadante y a nivel intracelular.
- Debido a que el papel de MIF en el sistema antioxidante celular no ha sido esclarecido completamente, es importante cuantificar a producción de mediadores del metabolismo celular y del sistema redox, para determinar el nivel al que actúa MIF.
- En el presente estudio determinamos características de la polarización M1, por esto, sugerimos evaluar una mayor cantidad de características típicas de una polarización M2, como la migración celular.

Bibliografía

1. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immunity*. N Engl J Med, 2000. **343**(5): p. 338-44.
2. Kumar, H., T. Kawai, and S.J.I.r.o.i. Akira, *Pathogen recognition by the innate immune system*. 2011. **30**(1): p. 16-34.
3. Abbas, A.K., A.H. Lichtman, and S. Pillai, *Cellular and molecular immunology E-book*. 2014: Elsevier Health Sciences.
4. Cruse, J., R. Lewis, and H. Wang, *Immunology guidebook*. 2004: Elsevier.
5. Sanz, J.M., et al., *Células presentadoras de antígeno*. 2013. **11**(28): p. 1720-1727.
6. Janeway Jr, C.A., et al., *The complement system and innate immunity*, in *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 5th edition. 2001, Garland Science.
7. López-Martínez, A., C. Chávez-Muñoz, and J.J.R.d.i.c. Granados, *Función biológica del complejo principal de histocompatibilidad*. 2005. **57**(2): p. 132-141.
8. Kambayashi, T. and T.M.J.N.R.I. Laufer, *Atypical MHC class II-expressing antigen-presenting cells: can anything replace a dendritic cell?* 2014. **14**(11): p. 719.
9. Lotfi-Emran, S., et al., *Human mast cells present antigen to autologous CD4+ T cells*. 2018. **141**(1): p. 311-321. e10.
10. Shi, C. and E.G.J.N.r.i. Pamer, *Monocyte recruitment during infection and inflammation*. 2011. **11**(11): p. 762.
11. Zhang, Y., et al., *Induction of autophagy is essential for monocyte-macrophage differentiation*. 2012. **119**(12): p. 2895-2905.
12. Okabe, Y. and R.J.N.i. Medzhitov, *Tissue biology perspective on macrophages*. 2016. **17**(1): p. 9.
13. Munro, D.A. and J.J.F.i.p. Hughes, *The origins and functions of tissue-resident macrophages in kidney development*. 2017. **8**: p. 837.
14. Italiani, P. and D.J.F.i.i. Boraschi, *From monocytes to M1/M2 macrophages: phenotypical vs. functional differentiation*. 2014. **5**: p. 514.
15. Davies, L.C., et al., *Tissue-resident macrophages*. 2013. **14**(10): p. 986.
16. Martinez, F.O., et al., *Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: new molecules and patterns of gene expression*. 2006. **177**(10): p. 7303-7311.
17. Van den Bossche, J., et al., *Mitochondrial dysfunction prevents repolarization of inflammatory macrophages*. 2016. **17**(3): p. 684-696.
18. Ding, A.H., C.F. Nathan, and D.J.T.J.o.I. Stuehr, *Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production*. 1988. **141**(7): p. 2407-2412.
19. Zhu, L., et al., *Cellular metabolism and macrophage functional polarization*. 2015. **34**(1): p. 82-100.
20. Fukuzumi, M., et al., *Endotoxin-induced enhancement of glucose influx into murine peritoneal macrophages via GLUT1*. 1996. **64**(1): p. 108-112.

21. Freemerman, A.J., et al., *Metabolic reprogramming of macrophages glucose transporter 1 (GLUT1)-mediated glucose metabolism drives a proinflammatory phenotype*. 2014. **289**(11): p. 7884-7896.
22. Kim, J.-w., et al., *HIF-1-mediated expression of pyruvate dehydrogenase kinase: a metabolic switch required for cellular adaptation to hypoxia*. 2006. **3**(3): p. 177-185.
23. Palsson-McDermott, E.M., et al., *Pyruvate kinase M2 regulates Hif-1 α activity and IL-1 β induction and is a critical determinant of the warburg effect in LPS-activated macrophages*. 2015. **21**(1): p. 65-80.
24. Semenza, G.L., et al., *Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1*. 1996. **271**(51): p. 32529-32537.
25. Viola, A., et al., *The metabolic signature of macrophage responses*. 2019. **10**.
26. Benmoussa, K., J. Garaude, and R.J.J.o.m.b. Acín-Pérez, *How Mitochondrial Metabolism Contributes to Macrophage Phenotype and Functions*. 2018.
27. Saha, S., I.N. Shalova, and S.K.J.I.r. Biswas, *Metabolic regulation of macrophage phenotype and function*. 2017. **280**(1): p. 102-111.
28. Sica, A., et al., *Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy*. 2006. **42**(6): p. 717-727.
29. Röszer, T.J.M.o.i., *Understanding the mysterious M2 macrophage through activation markers and effector mechanisms*. 2015. **2015**.
30. Novak, M.L. and T.J.J.J.o.l.b. Koh, *Macrophage phenotypes during tissue repair*. 2013. **93**(6): p. 875-881.
31. Correa, M.D. and M.R.J.I. López, *Activación alternativa del macrófago: La diversidad en las respuestas de una célula de la inmunidad innata ante la complejidad de los eventos de su ambiente*. 2007. **26**(2): p. 73-86.
32. Koscsó, B., et al., *Adenosine augments IL-10-induced STAT3 signaling in M2c macrophages*. 2013. **94**(6): p. 1309-1315.
33. Meriño, M., et al., *Rol de los receptores de adenosina en la interacción adipocito-macrófago durante la obesidad*. 2017. **64**(6): p. 317-327.
34. Colin, S., G. Chinetti-Gbaguidi, and B.J.I.r. Staels, *Macrophage phenotypes in atherosclerosis*. 2014. **262**(1): p. 153-166.
35. Rhee, I.J.A.o.p.r., *Diverse macrophages polarization in tumor microenvironment*. 2016. **39**(11): p. 1588-1596.
36. Lacey, D.C., et al., *Defining GM-CSF–and macrophage-CSF–dependent macrophage responses by in vitro models*. 2012. **188**(11): p. 5752-5765.
37. Draijer, C., L.R.K. Penke, and M.J.T.J.o.l. Peters-Golden, *Distinctive Effects of GM-CSF and M-CSF on Proliferation and Polarization of Two Major Pulmonary Macrophage Populations*. 2019. **202**(9): p. 2700-2709.
38. Fleetwood, A.J., et al., *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (CSF) and macrophage CSF-dependent macrophage phenotypes display differences in cytokine profiles and transcription factor activities: implications for CSF blockade in inflammation*. 2007. **178**(8): p. 5245-5252.

39. Ushach, I. and A.J.J.o.l.b. Zlotnik, *Biological role of granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and macrophage colony-stimulating factor (M-CSF) on cells of the myeloid lineage*. 2016. **100**(3): p. 481-489.
40. Murray, P.J., et al., *Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines*. 2014. **41**(1): p. 14-20.
41. Baugh, J.A. and R.J.C.c.m. Bucala, *Macrophage migration inhibitory factor*. 2002. **30**(1): p. S27-S35.
42. Sun, H.-W., et al., *Crystal structure at 2.6-Å resolution of human macrophage migration inhibitory factor*. 1996. **93**(11): p. 5191-5196.
43. Suzuki, M., et al., *Crystal structure of the macrophage migration inhibitory factor from rat liver*. 1996. **3**(3): p. 259.
44. Heinrichs, D., et al., *Protective role of macrophage migration inhibitory factor in nonalcoholic steatohepatitis*. 2014. **28**(12): p. 5136-5147.
45. Karsten, E., C.J. Hill, and B.R.J.C. Herbert, *Red blood cells: the primary reservoir of macrophage migration inhibitory factor in whole blood*. 2018. **102**: p. 34-40.
46. Denlinger, C.M., et al., *Macrophage migration inhibitory factor and its role in autoimmune diseases*. 2004. **52**(6): p. 389-400.
47. Mitchell, R.A.J.C.s., *Mechanisms and effectors of MIF-dependent promotion of tumourigenesis*. 2004. **16**(1): p. 13-19.
48. Sánchez-Zamora, Y.I. and M.J.J.o.d.r. Rodríguez-Sosa, *The role of MIF in type 1 and type 2 diabetes mellitus*. 2014. **2014**.
49. Crichlow, G.V., et al., *Structural and kinetic analyses of macrophage migration inhibitory factor active site interactions*. 2008. **48**(1): p. 132-139.
50. Grieb, G., et al., *Macrophage migration inhibitory factor (MIF): a promising biomarker*. 2010. **23**(4): p. 257.
51. Lue, H., et al., *Activation of the JNK signalling pathway by macrophage migration inhibitory factor (MIF) and dependence on CXCR4 and CD74*. 2011. **23**(1): p. 135-144.
52. Stoppe, C., et al., *The protective role of macrophage migration inhibitory factor in acute kidney injury after cardiac surgery*. 2018. **10**(441): p. ean4886.
53. Calandra, T. and T.J.N.r.i. Roger, *Macrophage migration inhibitory factor: a regulator of innate immunity*. 2003. **3**(10): p. 791.
54. Laird, P.W., et al., *Simplified mammalian DNA isolation procedure*. 1991. **19**(15): p. 4293.
55. Ruckdeschel, K., K.J.I. Richter, and immunity, *Lipopolysaccharide desensitization of macrophages provides protection against Yersinia enterocolitica-induced apoptosis*. 2002. **70**(9): p. 5259-5264.
56. Kroner, A., et al., *TNF and increased intracellular iron alter macrophage polarization to a detrimental M1 phenotype in the injured spinal cord*. 2014. **83**(5): p. 1098-1116.
57. Zeiner, P.S., et al., *MIF Receptor CD 74 is Restricted to Microglia/Macrophages, Associated with a M 1-Polarized Immune Milieu and Prolonged Patient Survival in Gliomas*. 2015. **25**(4): p. 491-504.
58. Chan, P.-C., et al., *Targeted inhibition of CD74 attenuates adipose COX-2-MIF-mediated M1 macrophage polarization and retards obesity-related*

- adipose tissue inflammation and insulin resistance*. 2018. **132**(14): p. 1581-1596.
59. Yaddanapudi, K., et al., *Control of tumor-associated macrophage alternative activation by macrophage migration inhibitory factor*. 2013. **190**(6): p. 2984-2993.
 60. Stanley, E.R., et al., *Biology and action of colony-stimulating factor-1*. 1997. **46**(1): p. 4-10.
 61. Austyn, J.M. and S.J.E.j.o.i. Gordon, *F4/80, a monoclonal antibody directed specifically against the mouse macrophage*. 1981. **11**(10): p. 805-815.
 62. Lin, H.-H., et al., *The macrophage F4/80 receptor is required for the induction of antigen-specific efferent regulatory T cells in peripheral tolerance*. 2005. **201**(10): p. 1615-1625.
 63. Chistiakov, D.A., et al., *CD68/macrosialin: not just a histochemical marker*. 2017. **97**(1): p. 4.
 64. Kurushima, H., et al., *Surface expression and rapid internalization of macrosialin (mouse CD68) on elicited mouse peritoneal macrophages*. 2000. **67**(1): p. 104-108.
 65. Gane, J.M., R.A. Stockley, and E.J.J.o.i.r. Sapey, *TNF- α autocrine feedback loops in human monocytes: the pro-and anti-inflammatory roles of the TNF- α receptors support the concept of selective TNFR1 blockade in vivo*. 2016. **2016**.
 66. Karsan, A. and K. Leong, *Signaling pathways mediated by tumor necrosis factor α* . *Histology and histopathology*, 2000. **15**(4): p. 1303-1325.
 67. DeFife, K.M., et al., *Interleukin-13 induces human monocyte/macrophage fusion and macrophage mannose receptor expression*. 1997. **158**(7): p. 3385-3390.
 68. Stein, M., et al., *Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation*. 1992. **176**(1): p. 287-292.
 69. McBride, W.H., et al., *Influences of interleukins 2 and 4 on tumor necrosis factor production by murine mononuclear phagocytes*. 1990. **50**(10): p. 2949-2952.
 70. Goh, J., et al., *Exercise, physical activity and breast cancer: the role of tumor-associated macrophages*. 2012. **18**.
 71. Nelms, K., et al., *The IL-4 receptor: signaling mechanisms and biologic functions*. 1999. **17**(1): p. 701-738.
 72. Jablonski, K.A., et al., *Novel markers to delineate murine M1 and M2 macrophages*. 2015. **10**(12): p. e0145342.
 73. Verreck, F.A., et al., *Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco) bacteria*. 2004. **101**(13): p. 4560-4565.
 74. Raes, G., et al., *Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages*. 2002. **71**(4): p. 597-602.
 75. Munder, M., K. Eichmann, and M.J.T.J.o.I. Modolell, *Alternative metabolic states in murine macrophages reflected by the nitric oxide synthase/arginase balance: competitive regulation by CD4+ T cells correlates with Th1/Th2 phenotype*. 1998. **160**(11): p. 5347-5354.

76. Fliggeri, J., T.W. Jungi, and J.J.I. Blum, *Induction of intracellular arginase activity does not diminish the capacity of macrophages to produce nitric oxide in vitro*. 1999. **200**(2): p. 169-186.
77. Martinez, F.O. and S.J.F.r. Gordon, *The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment*. 2014. **6**.
78. Tomkova, S., et al., *In vitro identification of mitochondrial oxidative stress production by time-resolved fluorescence imaging of glioma cells*. 2018. **1865**(4): p. 616-628.
79. Jha, A.K., et al., *Network integration of parallel metabolic and transcriptional data reveals metabolic modules that regulate macrophage polarization*. J Immunity, 2015. **42**(3): p. 419-430.
80. Mills, E.L. and L.A.J.E.j.o.i. O'Neill, *Reprogramming mitochondrial metabolism in macrophages as an anti-inflammatory signal*. 2016. **46**(1): p. 13-21.
81. O'Neill, L.A., *A broken krebs cycle in macrophages*. J Immunity, 2015. **42**(3): p. 393-394.
82. Bienert, G.P., J.K. Schjoerring, and T.P.J.B.e.B.A.-B. Jahn, *Membrane transport of hydrogen peroxide*. 2006. **1758**(8): p. 994-1003.
83. Vlaski-Lafarge, M. and Z.J.J.C.S. Ivanovic, *Reliability of ROS and RNS detection in hematopoietic stem cells– potential issues with probes and target cell population*. 2015. **128**(21): p. 3849-3860.
84. Kleemann, R., et al., *Disulfide analysis reveals a role for macrophage migration inhibitory factor (MIF) as thiol-protein oxidoreductase*. 1998. **280**(1): p. 85-102.
85. Kleemann, R., et al., *Specific reduction of insulin disulfides by macrophage migration inhibitory factor (MIF) with glutathione and dihydrolipoamide: potential role in cellular redox processes*. 1998. **430**(3): p. 191-196.
86. Koga, K., et al., *Macrophage migration inhibitory factor provides cardioprotection during ischemia/reperfusion by reducing oxidative stress*. 2011. **14**(7): p. 1191-1202.
87. Chuang, Y.-C., et al., *Macrophage migration inhibitory factor induces autophagy via reactive oxygen species generation*. 2012. **7**(5): p. e37613.
88. Mookerjee, S.A., et al., *Mitochondrial uncoupling and lifespan*. 2010. **131**(7-8): p. 463-472.
89. Serre-Beinier, V., et al., *Macrophage migration inhibitory factor deficiency leads to age-dependent impairment of glucose homeostasis in mice*. 2010. **206**(3): p. 297.
90. Díaz-Flores, M., et al., *Aspectos moleculares del daño tisular inducido por la hiperglucemia crónica*. 2004. **140**(4): p. 437-448.
91. Ezekowitz, A. and S.J.J.o.E.M. Gordon, *Down-regulation of mannosyl receptor-mediated endocytosis and antigen F4/80 in bacillus Calmette-Guérin-activated mouse macrophages. Role of T lymphocytes and lymphokines*. 1982. **155**(6): p. 1623-1637.
92. Biswas, S.K. and E.J.T.i.i. Lopez-Collazo, *Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance*. 2009. **30**(10): p. 475-487.

93. Onodera, S., et al., *Macrophage migration inhibitory factor induces phagocytosis of foreign particles by macrophages in autocrine and paracrine fashion*. 1997. **92**(1): p. 131-137.

Anexo técnico.**Anexo 1:****Buffer de lisis para obtención de DNA (500 ml)**

Reactivo	Volumen
Tris HCl 1 M; pH 8.5 (Sigma)	50 ml
EDTA 0.5 M (J. T. Baker)	5 ml
SDS 20 % (J. T. Baker)	5 ml
NaCl 1 M (J. T. Baker)	100 ml

Mezclar las soluciones y aforar a 500 ml con agua destilada.

Anexo 2:**Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Reactivo	Volumen	Concentración por Rx
Buffer	2.5 µl	1x
MgCl ₂	1.2 µl	50 mM
dNTP's	0.4 µl	10 mM
F NEO	1 µl	15 pM
R NEO	1 µl	15 pM
F MIF	1 µl	15 pM
R MIF	1 µl	15 pM
Enzima (Thermo Fisher Scientific)	0.25 µl	2.5 U/µl
DNA	2 µl	100 ng
H ₂ O	9.65 µl	cbp 20 µl

Los cebadores específicos utilizados para cada gen fueron los siguientes:

mif-F: 5'-AGA CCA CGT TAG CTG AG-3'

mif-R 3'-GCA TCG CTA CCG GTG GAT AA-5'

neo-F 5'-ATT GAA CAA GAT GGA TTG CAC-3'

neo-R 3'-CGT CCA GAT CAT CCT GAT C-5

Anexo 3

Amortiguador TBE 10 X

Reactivo	Volumen
Tris base (Sigma)	108 g
Ácido bórico (J. T. Baker)	55 g
EDTA 0.5 M (J. T. Baker)	40 ml

Mezclar los reactivos y aforar a 10 litros con agua destilada.

Anexo 4

PBS

Reactivo	Cantidad
NaCl (J. T. Baker)	80 g
NaH ₂ PO ₄ (J. T. Baker)	11.6 g
KH ₂ PO ₄ (J. T. Baker)	2 g
KCl (J. T. Baker)	2 g

Mezclar los reactivos y aforar a 10 litros con agua destilada.

Buffer de Facs

Reactivo	Cantidad
PBS	500 ml
Suero Fetal Bovino (Gibco)	25 ml

Mezclar ambos reactivos y añadir una pizca de NaN₃. Almacenar a 4 °C.

Paraformaldehído 4 %

Reactivo	Cantidad
PBS	40 ml
Paraformaldehído (Sigma)	2 g

Mezclar ambos reactivos y calentar hasta 60 °C en campana de extracción de vapores. Añadir gotas de NaOH 1 M hasta que la solución se haga transparente y esté completamente disuelto el paraformaldehído. Dejar enfriar. Ajustar pH a 7.4 y aforar a 50 ml. Almacenar a 4 °C máximo dos días. Filtrar con 0.45 µm antes de usar.

Anexo 5

PBS-Tween 0.05 %

Reactivo	Cantidad
Tween 20 (Sigma)	500 µl
PBS	10 L

Mezclar los reactivos por al menos 30 min.

ABTS

Reactivo	Cantidad
ABTS (PeproTech)	150 mg
Ácido cítrico	9.6 g
H ₂ O	500 ml

Disolver el ácido cítrico en el agua y ajustar pH a 5.35. Cubrir de la luz y añadir el ABTS. Hacer alícuotas y almacenar a -70 °C

Anexo 6

Primers:

gapdh-F 5'-CTC ATG ACC ACA GTC CAT GC-3'

gapdh-R 3'-CAC ATT GGG GGT AGG AAC AC-5'

tnfa-F 5'-GGC AGG TCT ACT TTG GAG TCA TT-3'

tnfa-R 3'-ACA TTC GAG GCT CCA GTG AAT TC-3'

inos-F 5'-CTG GAG GAG CTC CTG CCT CAT G-3'

inos-R 3'-GCA GCA TCC CCT CTG ATG GTG-5'

arginasa-F 5'-CAG AAG AAT GGA AGA GTC AG-3'

arginasa- R 3'- CAG ATATGCAGGGAGTCACC-5'

relma- F 5'-GGT CCC AGT CGA TAT GGA TGA GA-3'

relma-R 3'CAC CTC TTC ACT CGA GGG ACA GT-5'

ym1-F 5'-TCA CAG GTC TGG CAA TTC TTC TG-3'

ym1-R 3'-TTT GTC CTT AGG AGG GCT TCC TC-5'