



Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"Zaragoza"

Evaluación de la Respuesta Inmune en un Modelo Experimental de Diabetes Mellitus en Ratas.

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P r e s e n t a n :

José Luis Alfredo Mora Guevara

Oscar Ortíz Pérez

Juan Francisco Sánchez Ruíz

México, D. F.

1982





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

C O N T E N I D O

INTRODUCCION Y ANTECEDENTES DEL TEMA

FUNDAMENTOS DE LA ELECCION DEL TEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

OBJETIVOS

HIPOTESIS

MATERIAL Y METODOS DE TRABAJO

PROTOCOLO DE TRABAJO

ANIMALES DE TRABAJO

REACTIVOS

MATERIAL Y EQUIPO

PREPARACION DE SOLUCIONES

RESULTADOS

DISCUSION DE RESULTADOS

GRAFICAS

CONCLUSIONES

BIBLIOGRAFIA

INTRODUCCION Y ANTECEDENTES DEL TEMA

Los datos más antiguos sobre la Diabetes se remontan a principios de la era cristiana, cuando Aréteé de Cappadoce llama a esta enfermedad "Diabetes" (del verbo griego Diabainein: pasar a través de) yá que se pensaba que el cuerpo humano semejaba un tubo a través del cual pasaban los líquidos.

En efecto, entre los síntomas de la Diabetes Juvenil se observa un notable aumento en la eliminación de orina que puede llegar a veces hasta más de 1.5 l/24 hrs.

En el siglo XVII un médico británico Thomas Willis nota que en algunos de los enfermos con Diabetes la orina contenía azúcar y la llama Diabetes Sacarina para distinguirla de otras donde no había presencia de azúcar, a pesar de haber grandes emisiones de orina, como en el caso de la Diabetes Insípida.

En 1815 el químico francés Chevreul identifica a la glucosa como el azúcar presente en la orina y hacia 1850 Claude Bernard desarrolla un método para cuantificar la glucosa en sangre. En 1889 Oscar Minkowski produce una Diabetes de tipo Juvenil removiendo el páncreas en el perro, un poco más tarde Laguesse localiza con mayor precisión los elementos celulares del páncreas que vierten a la sangre la hormona que normaliza la glucemia.

Por otra parte Best y Banting en 1882 trataron a un joven diabético de 14 años impidiéndole un coma diabético gracias a la utilización de insulina de páncreas de ternero. Hacia el año de 1956 Sanger y colaboradores establecen la fórmula química de la insulina y la síntesis se realiza en 1964 (1,2).

La insulina actualmente disponible proviene de páncreas de puerco o de ternera y puede ser el origen de incidentes de tolerancia por el enfermo. (1).

A partir de 1978 las manipulaciones genéticas han hecho posible producir insulina humana por bacterias, de manera que la producción industrial, purificación y alta especificidad es una posibilidad a futuro cercano. (1)

Clínicamente la palabra Diabetes representa un síndrome con desórdenes en el metabolismo y una hiperglucemia debida a una deficiencia absoluta de secreción de insulina o una reducción de sus efectividades biológicas o ambos fenómenos.

La Diabetes Mellitus la podemos dividir en 2 grandes grupos. Tipo I.- Diabetes Mellitus dependiente de insulina (DMDI). Esta forma se asocia con cetosis en un estado clínico no tratado y se presenta comúnmente en jóvenes no obesos; la insulina circulante está virtualmente ausente, el glucagon está elevado, las células pancreáticas beta fallan para responder a todos los estímulos insulinogénicos y se requiere insulina exógena para corregir el estado catabólico, prevenir la cetosis, reducir la hiperglucogemia y normalizar la glucemia. (3)

Ciertos antígenos HLA (B 8, BW 15, DW 3 y DRW 4) se asocian fuertemente con el desarrollo de diabetes Tipo I (3,4,5).

Hay una asociación clínica en este tipo de Diabetes y procesos autoinmunes, por ejemplo, se sabe que los anticuerpos hacia el factor intrínseco gástrico son almenos 4 veces más comunes en

diabéticos que en la población sana (5), y que los anticuerpos -
contra las glándulas adrenales, los cuales son raros en ausencia
de enfermedad de Adisson se hayan con mayor frecuencia en pacient
tes diabéticos (1).

Histológicamente se observa un infiltrado linfocítico en -
los islotes pancreáticos de un gran número de diabéticos Tipo I
que no han recibido tratamiento alguno con insulina, así como -
también en el suero de estos pacientes se demuestra la presencia
de anticuerpos dirigidos contra islotes del páncreas detectados
por inmunofluorescencia (7).

Debido a estas características inmunes, la diabetes Tipo I
parece ser el resultado de un ambiente infeccioso o tóxico que -
ataca a las células pancreáticas beta de personas con disposi--
ción genética (8). Nothkins apoyó esta hipótesis demostrando la
acción destructiva del virus Coxsackie B-4 sobre las células be-
ta de los Islotes de Langerhans en ratones genéticamente suscep-
tibles (9).

Existe al menos un caso reportado de una diabetes provocada
por el Coxsackie B-4. Se trata de un niño de 10 años que murió
al principio del año 1978 de un coma diabético que sobrevino al-
gunos días después de una infección grave por Coxsackie B-4 (10).
Otros virus que se encuentran involucrados son el virus de la -
gripe (6) y el virus de las paperas (6), también algunos agentes
químicos tóxicos como el alloxán y la estreptozotocina, los cua-
les dañan específicamente las células beta (11).

La estreptozotocina dada a ratones en repetidas dosis subdiabetogénicas produce infiltración mononuclear así como una -- gran destrucción de células beta, similar a la observada en muchos casos de diabetes Tipo I y se ha sugerido que la droga actúa facilitando la infección de un virus endógeno o estimulando el proceso autoinmune (1).

Diabetes Tipo II.- Diabetes Mellitus no dependiente de insulina (DMNDI). Aquí encontramos un grupo heterogéneo de formas de diabetes que se presentan predominantemente en los adultos, no hay demostración de autoanticuerpos, ni evidencias de ligazón con HLA, aunque si hay evidencias de predisposición genética (1). Los pacientes son comúnmente obesos y mejoran grandemente con un régimen alimenticio adecuado y drogas hipoglucemiantes; pero las inyecciones de insulina en estos enfermos son ineficientes e inútiles; ya que en muchos de ellos la insulina se encuentra a niveles normales o elevados. Al parecer no se trata de una carencia de insulina, sino más bien de un problema en la acción de la insulina.

El defecto puede estar a nivel de receptores para la insulina en la célula, como lo sugieren ciertos autores (12) o bien que en muchos tipos de diabetes la insulina producida sea defectuosa e incapáz de unirse a un receptor como lo sugieren ciertos trabajos (8,13).

Se sabe que uno de los problemas más graves de la diabetes mellitus es la elevada susceptibilidad para las infecciones mi-

crobianas, tales como la tuberculosis, pielonefritis, neumonías bacterianas; así como dermatomycosis y candidiasis, que provocan en conjunto un poco más del 5% de muertes en diabéticos (14)

FUNDAMENTOS DE LA ELECCION DEL TEMA

FUNDAMENTOS DE LA ELECCION DEL TEMA

La diabetes mellitus es una enfermedad que aparece con relativa frecuencia. La O.M.S. calcula que la enfermedad se presenta entre los 20 y 60 años y principalmente de los 45 a 60 años, sin embargo ocurre en niños en un porcentaje del 3 al 5%: al final de cuentas se calcula que el 1.4-1.7% de la población mundial es diabética, prevaleciendo en el mundo occidental esta enfermedad (13).

Los datos estadísticos demuestran que en México una de las enfermedades no infecciosas con mayor número de muertes es la diabetes mellitus, dentro de este número de muertes de pacientes diabéticos el 60-80% mueren por infecciones recurrentes ocasionadas por bacterias, virus, hongos y parásitos (13).

Dada la estrecha relación que guarda el sistema inmune competente con la eliminación de estos agentes, hemos elegido este proyecto como tema de tesis para tratar de dilucidar una posible ineficiencia del mencionado sistema inmune en un modelo de diabetes mellitus experimental inducido por Alloxan en ratas cepa Wistar.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Como se sabe en la diabetes mellitus Tipo I, existe una deficiencia parcial o total de insulina, hormona que facilita el paso de glucosa al interior de la célula y a su vez la glucosa es la principal materia prima para la obtención de energía en el organismo, evidentemente al verse mermado el suministro de esta hormona, todas las células insulino-dependientes tendrán que modificar su esquema cotidiano de obtención de energía para poder sobrevivir, algunas de estas células insulino-dependientes son las del Sistema Inmune.

Para muchos de los eventos que se suceden en la respuesta inmune celular y respuesta inmune humoral la energía requerida se obtiene únicamente por oxidación de glucosa.

La primera manifestación del proceso inmunitario es la fagocitosis del antígeno, la síntesis de enzimas lisosomales y la producción de antígeno modificado, eventos intracelulares de las células fagocíticas que requieren energía de la oxidación exhaustiva de glucosa por las vías de la hexosa monofosfato y glucólisis (5).

La realización de los procesos anteriores desencadena el primer paso de la activación del sistema inmune.

El siguiente evento dentro del proceso inmunitario es la activación de las células Linfoides T y B, las primeras encargadas de efectuar la respuesta inmune celular y las segundas de

la ejecución de la respuesta inmune humoral.

Tanto la producción de anticuerpos como de linfocinas es un ejemplo clásico de síntesis protéica, así pues la energía necesaria para este delicado proceso requiere de un adecuado suministro de glucosa.

De una manera muy general podemos plantear que la falta de insulina es uno de los factores que pueden mermar deficiencia en la respuesta inmune.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

El presente trabajo pretende cubrir primeramente tres objetivos:

a),- Realizar una comparación de la eficiencia fagocítica de los neutrófilos polimorfonucleares y macrófagos en ratas diabéticas experimentalmente, con aquéllas sin alteración experimental.

b).- Demostrar si existe o no una disminución de la producción de anticuerpos en animales de experimentación en los que se les ha inducido diabetes mellitus, comparándolas contra la producción de inmunoglobulinas en animales testigo.

c).- Verificar si la respuesta inmune celular se vé modificada durante el trastorno metabólico que desencadena la hiperglucemia ocasionada por Alloxán.

En caso de cubrir alguno o todos los objetivos anteriores el siguiente paso en base a los resultados obtenidos, es el proponer y demostrar el sitio de la falla y el mecanismo por el cuál el evento inmunitario se encuentra perturbado.

Obviamente estos objetivos finales se encuentran condicionados a que se cumplan los tres primeros.

HIPOTESIS

HIPOTESIS

La mayoría de la energía requerida para el proceso inmune tanto humoral como celular proviene principalmente de glucólisis (24) en base a ésto cabe la posibilidad de emitir varias hipótesis de trabajo:

a).- Al verse las células inmunocompetentes privadas de la hormona que permite la utilización de glucosa, su reserva energética disminuirá y consecuentemente su eficiencia.

b).- Otra hipótesis sería que las células inmunocompetentes de animales hiperglucémicos mantuvieran una eficiencia igual o similar a la de los controles debido a la obtención de energía -- por rutas alternas a la glucólisis.

c) Dada la importancia que reviste la producción de factores entre linfocito-linfocito, linfocito-macrófago, se puede manejar la posibilidad de que el evento inmunitario esté perturbado debido a la falta de estos factores, cuyas células productoras - pueden ser sensibles a la deficiencia de insulina. Tal vez la ausencia de estos factores sea la causa de que el sistema inmune esté parcialmente deprimido y no la deficiencia de insulina sobre las células efectoras.

Cabe advertir que al ser éste un estudio IN VITRO, la extrapolación a seres humanos se encuentra dada en función de las condiciones experimentales bajo las cuales se trabajó.

Los datos obtenidos servirán para crear un MODELO que nos -
brinde información sobre el funcionamiento de las células que par-
ticipan en la respuesta inmune y en consecuencia tratar de expli-
car el comportamiento del sistema inmune en un humano aquejado --
con Diabetes Mellitus.

MATERIAL Y METODOS DE TRABAJO

PROTOCOLO DE TRABAJO

DETERMINACION DE LA DL_{50} Y DE_{50} DE ALLOXAN (17)

DL_{50}

- 1.- Tomar un lote de 40 ratas macho, pesarlas y rotularlas adecuadamente.
- 2.- Dividir en 4 lotes de 10 ratas cada uno e inocular por vía subcutánea una dosis única
 - a) 175 mg/kg de peso
 - b) 170 mg/kg de peso
 - c) 165 mg/kg de peso
 - d) 160 mg/kg de peso
- 3.- Valorar la glucemia a los 5 días por el método de la o-Toluidina así como la mortalidad diaria.
- 4.- Determinar la DL_{50} según el método de DL_{50} y protección de Reed y Muench.

DE_{50} DE ALLOXAN

- 1.- Tomar un lote de 40 ratas pesarlas y rotularlas adecuadamente.
- 2.- Dividir en 4 sublotes de 10 ratas cada uno e inocular por vía subcutánea una dosis única:
 - a) 160 mg/kg de peso
 - b) 155 mg/kg de peso
 - c) 150 mg/kg de peso
 - d) 145 mg/kg de peso
- 3.- Valorar la glucemia a los 5 días por el método de la o-To-

luidina.

4.- Calcular la DE_{50} de Alloxán en base al método de DL_{50} y pro
tección de Reed y Muench.

DL₅₀ Y PROTECCION SEGUN REED Y MUENCH (17)

- 1.- Hacer una suspensión de 10¹¹ bacterias de Listeria monocytógenes / ml. ajustadas por Nefelometría.
- 2.- Tomar 5 lotes de 6 ratas e inocularlas con 1 ml de la suspensión anterior procediendo de la siguiente manera:

Lote	Dilución
1-----	original
2-----	1:10
3-----	1:100
4-----	1:1000
5-----	1:10000

- 3.- Calcular la proporción de la mortalidad para cada lote.
- 4.- Observar la dosis entre las cuales se encuentran aquéllas - que mata al 50% de los individuos.
- 5.- La DL₅₀ se calcula mediante el siguiente procedimiento:

$$DP = \frac{X - 50}{X - Y}$$

DP: Distancia proporcional entre la dilución inmediata superior e inmediata inferior a la que mata al 50% de los individuos.

X: Mortalidad por ciento de la dilución inmediata superior a la que mata al 50% de los animales.

Y: Mortalidad por ciento en la dilución inmediata inferior a la que mata al 50% de los animales.

$$\text{Log DL}_{50} = A - (DP \times B)$$

A: Log Negativo de la dilución inmediata superior a la que mata al 50% de los animales.

B: Log del factor de dilución

INDUCCION DE DIABETES MELLITUS (19)

- 1.- Pesar las ratas y etiquetarlas adecuadamente para evitar confusiones.
- 2.- Preparar una solución de Alloxán de 60 mg/ml. en agua destilada fría, protegiéndola de la luz.
- 3.- Anestesiarse las ratas en una cámara de éter etílico.
- 4.- Administrar por vía subcutánea la cantidad correspondiente al alloxán.
- 5.- Cuantificar a los 5 días la glucemia por el método de la o-Toluidina.

Otra forma de inducir la Diabetes Mellitus es la siguiente:

- 1.- Inocular alloxán por vena de pene, 43 mg/kg de peso en solución salina isotónica.
- 2.- Este método vuelve hiperglucémicas las ratas en 48 hrs.

CUANTIFICACION DE GLUCOSA (16)

- 1.- Anestesiarse al animal en una cámara de éter.
- 2.- Obtener por punción cardíaca 2 ml. de sangre en un tubo de ensaye de 13 x 100.
- 3.- Dejar coagular la sangre y centrifugar a 5,000 revoluciones por minuto (rpm) por 5 min.
- 4.- Extraer con una pipeta Pasteur el suero, pasarlo a otro tubo de ensaye de 13 x 100 limpio y seco.
- 5.- Poner en otro tubo de ensaye 13 x 100 0.1 ml de suero y adicionarle 5 ml. de solución de o-Toluidina.
- 6.- Colocar en otro tubo de ensaye de las mismas dimensiones -- 0.1 ml de solución patrón de concentración conocida de 100 mg/-100 ml, agregar 5 ml de solución de o-toluidina, este tubo se rotula como patrón.
- 7.- Preparar un blanco de reactivo.
- 8.- Colocar los tubos perfectamente rotulados en un baño de agua a ebullición durante 10 min.
- 9.- Desarrollando el color enfriar al chorro de agua.
- 10.- Leer las absorciones del patrón y de los problemas contra - el blanco de reactivo a 640 nm.
- 11.- Cálculos: $(\text{Absorción del problema} / \text{Absorción del patrón}) 100 = C$
C = Concentración de glucosa en mg/100 ml de suero.

OBTENCION DE CELULAS DE EXUDADO PERITONEAL (17)

C E P

- 1.- Inocular 1 ml. de aceite mineral USP vía intraperitoneal única dosis en las ratas problema y en sus respectivas normales 3 -- días antes de su uso.
- 2.- Anestesiar las ratas en cámara de éter.
- 3.- Extraer 2 ml. de sangre por punción cardíaca para cuantificación de glucosa.
- 4.- Sacrificar las ratas e inocularles a cada una 40 ml. de solución salina citratos fría por vía intraperitoneal, agitar levemente el animal.
- 5.- Cosechar con una pipeta Pasteur las C.E.P.
- 6.- Centrifugar y lavar en 2 ocasiones con solución salina citratos fría.
- 7.- Resuspender el precipitado en 2 minutos de solución de Krebs Henseleit.
- 8.- Ajustar a 20×10^6 células / ml.
- 9.- Su utilización es inmediata.

PREPARACION DE PARTICULAS OПСONIZADAS (20)

- 1.- Preparar una solución de Zymosán de 10 mg/ml. en agua destilada.
- 2.- Centrifugar a 2000 rpm por 5 min. desechando el sobrenadante por dos ocasiones.
- 3.- Resuspender en 2 ml. de agua destilada.
- 4.- Opsonizar con suero humano fresco en relación 1:1 v/v.
- 5.- Incubar 20 min. a 37°C en baño maría.
- 6.- Centrifugar a 2500 rpm por 5 min. desechando el sobrenadante,
- 7.- Resuspender en 3 ml. de agua destilada.
- 8.- Lavar en 2 ocasiones centrifugando a 2500 rpm por 5 min. desechando el sobrenadante.
- 9.- Resuspender en 5 ml. de agua destilada.
- 10.- Esta solución es estable durante una semana a 4°C.

DETERMINACION DE LA INGESTA DE PARTICULAS COLOREADAS
CON ROJO OLEOSO POR MACROFAGOS (22)

(ROJO OLEOSO)

1.- Disolver 2 grs. de rojo oleoso en 50 ml. de aceite mineral en un mortero.

2.- La suspensión se centrifuga a 10 000 rpm por 15 min. para eliminar las partículas insolubles, el colorante disuelto es estable indefinidamente a temperatura ambiente.

3.- Debido a que la concentración de Rojo Oleoso en aceite varía de muestra en muestra se toma en cuenta el siguiente factor que -- convierte la absorción en miligramos de aceite que a su vez permite la normalización y comparación de resultados.

4.- Agregar 10 microlitros de la solución anterior en 10 ml. de -- dioxano y leer a 525 nm., la siguiente fórmula es el factor de corrección:

$$\frac{0.89}{\text{Abs.}} = Fc$$

0.89 es la densidad del
aceite mineral

5.- Resuspender 50 mg. de lipopolisacárido de Escherichia coli en 3 ml. de agua destilada.

6.- Sonicar la suspensión anterior con 1 ml. de solución de rojo oleoso, las condiciones de sonicación no son importantes, ya que -- al final la solución solo debe de tener el aspecto de malteada de fresa.

- 7.- Opsonizar con un volúmen igual de suero fresco humano a 37 ° C por 30 min.
- 8.- Para el ensayo de la ingestión se utilizan una serie de tubos de 13 x 100 siliconizados .
- 9.- Agregar a cada tubo 0.6 ml de solución de Krebs-Henseleit -- y 0.2 ml de la suspensión de lipopolisacárido de E. coli con el - rojo oleoso .
- 10.- Preincubar 15 minutos a 37°C .
- 11.- Adicionar 0.1 ml de C.E.P. ajustadas a 20×10^6 células / ml.
- 12.- Incubar a 37°C durante 5 minutos .
- 13.- Parar la reacción con 3 ml de Krebs-Henseleit fría .
- 14.- Centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos desechando el sobrenadante .
- 15.- Lavar en 2 ocasiones con solución de Krebs-Henseleit fría.
- 16.- Limpiar perfectamente las paredes del tubo y drenarlos por 5 minutos.
- 17.- Agregar 2 ml de Dioxano y agitar en el vortex para extraer el colorante .
- 18.- Centrifugar a 5000 rpm durante 15 minutos .
- 19.- Leer el sobrenadante contra un blanco de Dioxano a 525 nm.

METODO ESPECTROFOTOMETRICO PARA LA REDUCCION DEL
NITROAZUL DE TETRAZOLIO (21)

(NAT)

1.- Preparar una solución de Nitroazul de tetrazolio (NAT) en solución salina amortiguada a pH = 7.4 de 2 mg/ ml , filtrar para eliminar el material insoluble .

2.- Proceder de acuerdo al siguiente cuadro , para cada muestra se hace duplicado :

SOLUCIONES	PROBLEMAS		NORMALES	
	F	R	F	R
Sol. de Krebs-Henseleit	0.3 ml	0.4 ml	0.3 ml	0.4 ml
Partícula opsonizadas	0.1 ml	-	0.1 ml	-
KCN 0.1 N	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
Sol. de NAT	0.4 ml	0.4 ml	0.4 ml	0.4 ml

3.- Incubar todos los tubos a 37°C por 15 minutos .

4.- Agregar a todos los tubos 0.1 ml de C.E.P. ajustadas a 20×10^6 células / ml , incubar 20 minutos a 37°C .

5.- Parar la reacción con 2 ml de HCl 2.5 N .

6.- Centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos , desechar el sobrenadante .

7.- Agregar 4 ml de Piridina a cada tubo y poner en baño María a ebullición por 20 minutos .

8.- Centrifugar a 5000 rpm durante 5 minutos , leer a 515 nm el sobrenadante contra un blanco de Piridina

Nota

F fagocitando

R reposando

ACTIVIDAD DE ION SUPER OXIDO (23)

- 1.- Preparar en el momento una solución de 59 mg. de citocromo C en 5 ml. de agua destilada.
- 2.- Proceder de acuerdo al siguiente cuadro, tanto problema y normal se hacen por duplicado:

Soluciones	Fagocitando	Reposando
	(37°C)	(0°C)
Sol de Citocromo	0.05 ml.	0.05 ml.
Partículas opsonizadas	0.05 ml.	0.05 ml.
C.E.P. 10^6 células / ml.	1.5 ml.	1.5 ml.

Incubar los tubos durante 20 minutos a las temperaturas correspondientes.

- 3.- Centrifugar los tubos a 5 000 rpm/30 min.
- 4.- Leer contra blanco de agua destilada a 550 nm.
- 5.- La disminución de la absorción es directamente proporcional a la actividad de ión Super óxido.

CAPACIDAD DE HALOGENACION (24)

1.- Preparar las siguientes soluciones:

- a).- Amortiguador de Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4 pH = 7.4
- b).- NaCl 1.28 M
- c).- KCl 0.12 M
- d).- CaCl_2 0.01 M
- e).- MgCl_2 0.002 M
- f).- Glucosa 0.02 M
- g).- NaI^{125} 50 000 cpm

Mezclar 1 ml. de cada solución y rotularla como solución de yodación.

2.- Proseguir de acuerdo al siguiente cuadro, todas las muestras se hacen por duplicado, rotular perfectamente normal y problema:

Soluciones	F	R	B	E
Sol. de Yodación	350 μ l	350 μ l	350 μ l	350 μ l
partículas opsonizadas	50 μ l	---	50 μ l	---
agua destilada	---	50 μ l	---	50 μ l

preincubar 15 min. a 37°C

C.E.P.	0.01 ml.	0.01 ml.	---	---
25 x 10 ⁶ células/ml.				

incubar 30 min. a 37°C

Tiosulfato de sodio	0.1 ml.	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml.
TCA 10%	1 ml.	1 ml	1 ml	1 ml.

F= Fagocitando

B= Blanco

R= Reposando

E= Estándar

3.- Centrifugar todos los tubos a 4 000 rpm por 15 min., desechar-
do el sobrenadante.

4.- Lavar el precipitado 3 veces con TCA al 10%

5.- Leer en un contador de centelleo para partículas Gamma.

CELULAS FORMADORAS DE PLACA (18)

- 1.- Inocular las ratas con 1 ml. de eritrocitos de carnero al 10% en la vena del pene 4 días antes del experimento.
- 2.- Extraer el vaso y colocarlo en una caja de petri con 10 ml. - de MEM frío, disgregar perfectamente el contenido esplénico, pa-- sar a tubos de hemólisis y dejar sedimentar.
- 3.- Pasado un minuto de sedimentación tomar el sobrenadante y ha- cer diluciones 1:10. Contar blancos con alícuotas.
- 4.- Tomar 0.1 ml. de esta solución y mezclarla con 0.2 ml. de gló- bulos rojos de carnero (GRC) en un caja de petri de aproximadamente 5 cm. de diámetro.
- 5.- Añadir a la solución anterior 2 ml. de agarosa al 0.6 % en -- MEM que sea mantenido a 45°C.
- 6.- Homogenizar perfectamente e incubar 45 min. a 37°C.
- 7.- Agregar 2 ml. de complemento, diluido 1:10 en solución salina.
- 8.- Incubar nuevamente a 37°C durante 30 min.
- 9.- Eliminar el suero y agregar 2 ml. de MEM frío para parar la - reacción.
- 10.- Contar el número de placas de hemólisis.

RESISTENCIA BACTERIANA (25,26)

Nota: TODO EL PROCESO SE HACE EN CONDICIONES DE ESTERILIDAD.

- 1.- Inocular 5 ml. de sol salina citratos fría en la cavidad peritoneal de la rata.
- 2.- Agitar en forma homogénea todas las ratas, rotular perfectamente problemas y normales.
- 3.- Obtener 3 ml. de exudado en la cavidad peritoneal.
- 4.- Tomar 0.3 ml. de la suspensión anterior y aforar a 3 ml. centrifugar a 1500 rpm por 5 min., tomar 0.05 ml. de sobrenadante y sembrarlo en una caja de petri con hagar soya tripticasa, rotular la como la Ia. lavada.
- 5.- eliminar el sobrenadante y resuspender el botón celular en 3 ml. de solución salina.
- 6.- Centrifugar a 1500 rpm por 5 min., del sobrenadante tomar 0.05 ml. y sembrarlo como el paso anterior, rotulando 2a. lavada.
- 7.- Eliminar el sobrenadante y repetir el paso 5 y 6, solo que - ahora se rotula la caja como 3a. lavada.
- 8.- Congelar y descongelar el botón celular sucesivamente por 5 - ocasiones, hacer diluciones 1:20 y 1:200, sembrar en respectivas cajas de petri con hagar soya tripticasa, rotulando cada una de - las diluciones.
- 9.- Tomar el Bazo y homogenizarlo en 4 ml. de solución salina.

10.- Pasarlo a un tubo de ensaye de 13 x 100 y dejar reposar un -
min.

11.- Tomar 0.3 ml. del sobrenadante y aforar a 3 ml. con solución
salina.

12.- De la dilución anterior tomar 0.05 ml. y sembrarlo en una -
placa de agar soya tripticasa, rotularlo como la 1a. lavada di-
lución 1:20.

13.- Hacer diluciones sucesivas 1:200 y 1:2000 y sembrarlos como
en el paso anterior, rotular perfectamente la dilución respecti-
va.

14.- Eliminar el sobrenadante del tubo que contiene el botón ce-
lular, resuspenderlo, y aforar a 3 ml. de solución salina.

15.- Centrifugar a 1500 rpm durante 5 min del sobrenadante hacer
diluciones sucesivas 1:20, 1:200 , 1:2000 y sembrar como en el pa-
so anterior, rotulando como la 2a. lavada y la dilución respecti-
va.

16.- Repetir los pasos 14 y 15 rotulando como la 3a. lavada.

FORMACION DE ROSETAS POR MACROFAGOS DE LA CAVIDAD
PERITONEAL

- 1.- Obtener C.E.P.
 - 2.- Suspender en 3 ml. de Medio Esencial Mínimo(MEM).
 - 3.- Colocar la suspensión anterior en tubos para cultivo de tejidos e incubarla a 37°C durante media hora.
 - 4.- Tirar con sumo cuidado el sobrenadante y lavar en 2 ocasiones con MEM a 37°C
 - 5.- Suspender en un ml de MEM frío.
 - 6.- Agitar para despegar los macrófagos adheridos a las paredes del tubo.
 - 7.- Ajustar a 10^6 células/ml.
 - 8.- Colocar en placas para microtitulación de 0.025 de la solución anterior.
 - 9.- Colocar 0.1 ml. de Glóbulos Rojos de Carnero GRC al 10% de MEM, opsonizados con IgG en unidades subaglutinantes.
 - 10.- Incubar la placa de microtitulación tapada por espacio de 45 min. a 37°C con agitación cada 5 min.
 - 11.- Colocar 1 gota con una pipeta Pasteur en un porta objetos limpio y seco y taparlo con un cubreobjetos.
 - 12.- Leer al microscopio 100 células y reportar el porcentaje de células que forman rosetas.
- Nota: Se considera roseta a 3 o más eritrocitos pegados a 1 macrófago.

CUANTIFICACION DE PROTEINAS TOTALES SEGUN EL METODO
DE BIURET (16)

1.- Para el ensayo de proteínas totales, según el Método de Biuret, proceder de acuerdo al siguiente cuadro; para cada suero hacerse - por duplicado, rotular perfectamente problemas y normales.

Solución	Problema	Blanco Problema	Patrón	Blanco patrón
suero problema	0.1 ml	0.1 ml	---	---
patrón de proteínas	---	---	0.1 ml	0.1 ml.
reactivo de Biuret	5 ml	---	5 ml	---
reactivo de referencia	---	5 ml	---	5 ml

2.- Mezclar suavemente y dejar reposar 30 min. a temperatura ambiente.

3.- Medir la absorción de problema y de patrón contra el reactivo de Biuret solo y la de los blancos contra agua.

4.- La concentración de proteínas se obtiene según la fórmula sig.:

$$\frac{A_{\text{problema}} - A_{\text{blanco problema}}}{A_{\text{patrón}} - A_{\text{blanco patrón}}} \times 6 = \text{g/100 ml.}$$

5.- La longitud de onda empleada es de 546 nm.

DETERMINACION CUANTITATIVA DEL COMPLEMENTO EN UNIDADES
DES 50% HEMOLITICAS (27,28)

Von Krogh propuso que la relación entre la concentración de complemento o hemolisina y el grado de hemólisis se podría calcular mediante la siguiente fórmula:

$$Y = X^n / X^n + K^n$$

De donde:

Y = grado de hemólisis

X = concentración o hemolisina

n y K son constantes (necesarias para el ajuste a la ecuación de la recta).

Para aplicar la ecuación anterior a la titulación del complemento o a la hemolisina deberá despejarse la X quedando:

$$X = K (Y/1-Y)$$

Debido a que la ecuación anterior nos representa a una curva sigmoide en la cual no se pueden hacer cálculos precisos. Pero - si dicha ecuación se transforma logarítmicamente la relación entre la concentración de X y el grado de hemólisis se hace línea - 1.

$$\text{Log } X = \text{Log } K + 1/n (\text{log } Y/1-Y)$$

Esta ecuación corresponde a una línea recta que es igual a -
 $Y = mx + b$.

$$Y = \text{Log de } X$$

$$m = 1/n$$

$$b = \text{Log de } K$$

$$x = \text{Log } (Y/1-Y)$$

La titulación de la actividad 50% hemolítica se define como la cantidad de suero necesaria para lisar al 50% de un número de eritrocitos dados. Esta es una definición arbitraria ya que la magnitud dependerá de la fragilidad de los eritrocitos usados, número de eritrocitos, cantidad de hemolisina usada, pH, temperatura. Debido a ésto todos los factores anteriores deben ser cuidadosamente regulados.

PROCEDIMIENTO

1.- Lavar 3 veces los glóbulos rojos de carnero y preparar una suspensión 2% en solución amortiguadora de trietanolamina (TBS).

2.- Ajustar la suspensión en una celda de espectrofotómetro de la siguiente manera: Mezclar 0.6 ml. de la suspensión de eritrocitos al 2% y 3.4 ml. de agua destilada. Leer la absorción a 550 nm. utilizando un blanco de agua destilada, leer el 100% de hemólisis que debe dar una absorción de 0.5, si no se obtiene esta lectura se corrige el volúmen mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Absorción}_1 \times \text{vol}_1 = \text{Absorción}_2 \times \text{vol}_2$$

$$\text{de donde Vol}_2 = \text{absorción}_1 \times \text{vol}_1 / 0.5$$

3.- Se toma un volúmen de la suspensión anterior y se le adiciona un volúmen igual de la hemolisina previamente titulada (2U50%H) en TBS. Mezclar bien e incubar a 37°C por 30 min. en agitación frecuente. transcurrido el tiempo se saca el matraz del baño y de esta manera tenemos los eritrocitos sensibilizados en una suspensión del 1%.

4,- Se hacen 2 diluciones del suero problema (1:10, 1:20) en TBS

de la manera siguiente:

A 0.6 ml. de suero + 5.4 ml. de TBS = 1:10

B 2.0 ml. de A + 2.0 ml. de TBS = 1:20

Se coloca en baño de hielo 14 tubos 13 X 100 usando 4 tubos para cada dilución de suero (8 tubos) y 2 para cada uno de los testigos de la prueba. v. gr.

Tabla I

TUBO	DILUCION SUERO (X)	ERITROCITOS SENSIBILIZADOS	TBS
1	1.0 ml	1.2 ml	0.8 ml
2	0.7 ml	1.2 ml	1.1 ml
3	0.5 ml	1.2 ml	1.3 ml
4	0.3 ml	1.2 ml	1.5 ml
T pos.	--	1.2 ml	--
T neg.	--	1.2 ml	1.8 ml

5.- Se mezclan los 10 tubos y se incuban a 37°C durante 30 min. con agitación constante.

6.- Sacar los tubos y adicionarles a todos 1.0 ml. de TBS frío, excepto al testigo positivo al cual se le pone 2.8 ml de agua destilada, agitar los tubos.

7.- Centrifugar los tubos a 1500 rpm durante 5 min.

8.- Leer los sobrenadantes a 550 nm. usando como blanco el tubo testigo negativo.

9.- Calcular para cada tubo el porcentaje de hemólisis en relación

con el testigo positivo, como se ejemplifica en la siguiente tabla:

TUBO	VOLUMEN	1:10		1:20	
		Absorción	% Hemólisis	Abs.	% H
1	0.15 ml	0.35	70	0.1	20
2	0.25 ml	0.43	85	0.2	40
3	0.35 ml	0.46	92	0.3	58
4	0.50 ml	0.48	96	0.37	74

testigo positivo 0.5 de absorción para 100% Hemólisis.

Nota: Cuando contamos con un espectrofotómetro en el que se puedan medir volúmenes pequeños, los reactivos en la tabla I se colocan justamente a la mitad (como se realiza en la técnica original pero en nuestro caso, donde contamos con un espectral 20 Bauch & Lomb, en el cual las cubetas requieren un mínimo de 3 ml para poder ser leídas, se colocan los reactivos al doble, como la proporción de los reactivos se conserva, el grado de hemólisis en ambas técnicas debe ser la misma, Debido a esto nótese que en la tabla - II para hacer los cálculos se toma la mitad de los volúmenes de la dilución del suero que realmente se usó.

Cálculos.

$$\text{Log } X = \text{Log } K + 1/n \text{ Log } Y/1-Y$$

Aplicando esta ecuación a los datos de la dilución 1:20 tenemos:

$$-0.8240 = \text{Log } K + 2.5798/n \text{ (para tubo 1) } \text{-----}1$$

$$-0.6020 = \text{Log } K + 3.1930/n \text{ (para tubo 2) } \text{-----}2$$

$$-0.4559 = \text{Log } K + 3.5192/n \text{ (para el tubo 3) } \text{---}3$$

$$-0.3010 = \text{Log } K + 3.7325/n \text{ (para tubo 4) } \text{-----}4$$

Agrupando 1 y 2 tenemos:

$$-1.4260 = 2\text{Log } K + 5.7728/n \text{-----}I$$

Y agrupando 3 y 4 tenemos:

$$-0.7569 = 2 \text{Log } K + 7.2517/n \text{-----}II$$

Resolviendo las ecuaciones I y II tenemos que:

$$n = 2.21 \text{ y } \text{log } K = -2.019$$

Sustituyendo en la ecuación:

$$\text{Log } X = \text{Log } K + 1/n \text{Log } Y/1-Y$$

$$\text{Log } X = -2.019 + 1/2.21 \text{Log } 50/1-50$$

$$X = 0.3270$$

En un volúmen de 0.3270 tenemos 1 U. de Hemólisis al 50%/ml. tendremos 3.058 unidades y en el suero sin diluir se tendrán 61.16 U de Hemólisis al 50%.

El cálculo lo podemos realizar también sobre papel semilogarítmico de probitas, tomando para las abcisas el porcentaje de hemólisis y para las ordenadas el volúmen usado (ml) de la dilución del suero. Una vez que se ha construído la gráfica se localiza el volúmen que se requiere para producir el 50% de hemólisis, con este volúmen se calcula cuantas unidades hemolíticas al 50% hay por mililitro de suero diluído, después se multiplica por el factor de dilución, para obtener el valor de unidades hemolíticas al 50% que tiene el suero sin diluir.

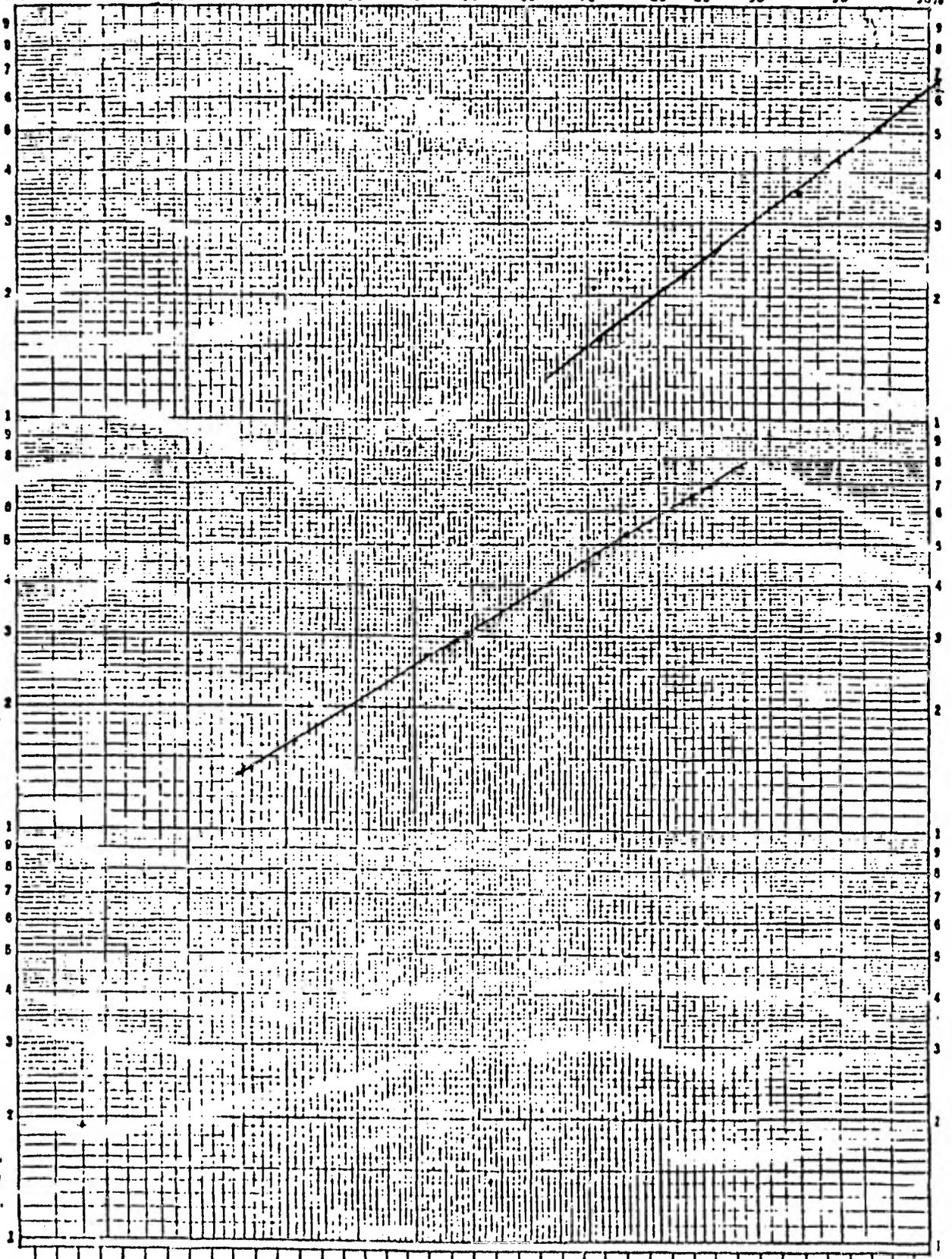
Cálculo de U de hemólisis al 50% mediante el uso de probitas con el ejemplo de la tabla II.

El valor que se obtiene en la gráfica en el eje de las abscisas es de 0.3 que corresponde al U de Hemólisis al 50%, aquí tenemos una unidad hemolítica y en un mililitro se tendrán 3.225 y multiplicando por la dilución (1:20) se tiene 63.4 unidades hemolíticas al 50% en un mililitro de suero sin diluir. (ver gráfica anexa).

En este trabajo se calcularon todos los valores mediante el uso de papel semilogarítmico de probitas.

PERCENTAGE

2% 5 10 15 20 30 40 50 60 70 80 85 90 95 98%



PROBITS

1.0 1.5 2.0 2.5 3.0 3.5 4.0 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 7.0

ANIMALES DE TRABAJO

ANIMALES DE TRABAJO

Animales usados en todos los experimentos.

1).- Ratas macho, cepa Wistar, cuya edad oscilaba entre 4 y 6 me ses y por ninguna razón debe de variar de éstos límites.

2).- Cobayos de 4 meses sin importar el sexo.

REACTIVOS

REACTIVOS

Reactivo	Cantidad	Marca
Aceite mineral	1 l	USP
Acido Tricloroacético	100 g	Merck
Acido Clorhídrico	1 l	Merck
Agar soya tripticasa	454 g	Difco
Agarosa	454 g	Difco
Alcohol Etfílico absoluto	1 l	Sigma
Alloxán grado reactivo	100 g	Sigma
Cianuro de Potasio	30 g	Baker
Citrato de Sodio	100 g	Baker
Cloruro de Calcio	100 g	Merck
Cloruro de Magnesio	100 g	Merck
Cloruro de Sodio	100 g	Merck
Cloruro de Potasio	100 g	Merck
Eritrocitos de carnero	100 ml	
Hidróxido de Sodio	100 g	Merck
Nitroazul de Tetrazolio	10 g	Sigma
Rojo Oleoso	10 g	Sigma
Sacarosa	100 g	Baker
Tiosulfato de Sodio	10 g	Sigma
ZYmosan	10 g	Sigma

MATERIAL Y EQUIPO

MATERIAL Y EQUIPO

Materiales usados:

Equipo

Contador de centelleo para radiación gama

Estufa de temperatura controlada 60x60x60 cm. marca Mapasa.

Refrigerador de 12 pulgadas.

Centrífuga clínica de 8 camisas, marca Solvat

Autoclave vertical de 60x25 cm. cap. 15.87 cm³

Balanza analítica Mettler mod. H-80

Potenciómetro marca Sargent Welch mod. PBL 400

Espectrofotómetro marca zeizz mod. PM 2 DL

Microscopio compuesto American Optical mod. One-Ten

Balanza granataria marca Ohaus cap. max. 1 Kg.

Baño María de temperatura controlada marca Riosa mod B-5

Material:

Cámaras de Hematocrito (5) marca BrightLina cat. 4011

Tubos capilares marca Hyland (500)

Porta objetos marca Ave 76x26 mm una caja

Pipetas para glóbulos blancos marca Propper Trophy

Cajas de petri (50) 15x150 mm. marca Corning.

Tubos de centrifuga (20) 13x100 mm. marca Pyrex

Tubos de ensaye (100) 13x100 mm. marca Pyrex

Matraces Elenmeyer (4) cap. 1 l. marca Pyrex

Matraces Erlenmeyer (14) cap. 500 ml. marca Pyrex

Matraces Erlenmeyer (10) cap. 250 ml. marca Pyrex

Matraces Erlenmeyer (5) cap. 100 ml. marca Pyrex

Matraces Erlenmeyer (5) cap. 50 ml. marca Pyrex

Matraces aforados (5) cap. 100 ml. marca Pyrex

Matraces aforados (5) cap. 250 ml. marca Pyrex

Matraces aforados (5) cap. 1000 ml. marca pyrex

Matraces aforados (5) cap. 500 ml. marca pyrex

Jeringas desechables (100) 10 ml. Beckton Dickinson

Jeringas desechables (100) 1 ml. Beckton Dickinson

Agujas desechables (100) No. 20 Beckton Dickinson

Mechero bunsen (3) Fisher

Papel aluminio

Pipetas graduadas (10) 10 ml. marca Pyrex

Pipetas graduadas (20) 5 ml. marca Pyrex

Pipetas graduadas (50) 1 ml. marca Pyrex

Vasos de precipitados (20) 500 ml. marca Pyrex

Vasos de precipitados 2 100 ml. marca Pyrex

Vasos de precipitados (2) 50 ml. marca Pyrex

Espátulas de acero inoxidable (5)

Estuche de disección (1) Stainless D-12

Jaula metabólica (6) 40x60 cm.

PREPARACION DE SOLUCIONES

PREPARACION DE SOLUCIONES

ALLOXAN.- Se disuelve la cantidad necesaria (151 mg/ Kg de peso) en agua destilada, para vía subcutánea. En caso de administrar por vía intravenosa se preparan 43 mg. por Kg. de peso en solución salina estéril, se protege de la luz y se mantiene en hielo.

SUSPENSION DE ERITROCITOS DE CARNERO: Se prepara a partir de sangre fresca de carnero, se lavan en 2 ocasiones con solución salina isotónica fría; una vez lavados, se resuspenden en solución salina, el paquete celular con 9 veces su volúmen. Se puede conservar a 4°C por una semana.

MEDIO MINIMO ESENCIAL DE EAGLE (MEM): Se disuelven 9.6 g de medio en un litro de agua destilada.

AGAROSA.- Se disuelven 0.6 g de Agarosa en agua destilada.

COMPLEMENTO.- Se utiliza suero fresco de cobayo como fuente de complemento.

SOLUCION SALINA ISOTONICA.- Se disuelven 8.5 g de cloruro de sodio en 1 litro de agua destilada.

SOLUCION SALINA CITRATOS.- Disolver 0.04 g de citrato de sodio en 100 ml de solución isotónica.

SOLUCION DE KREBS HENSELEIT pH = 7.4: Consta de la siguiente mezcla de soluciones:

a).- NaCl	(0.154 M)	100 partes
b).- KCl	(0.154 M)	4 partes
c).- CaCl ₂	(0.11 M)	3 partes
d).- KH ₂ PO ₄	(0.154 M)	1 partes
e).- MgSO ₄	(0.154 M)	1 parte

- f).- Glucosa 260 mg/130 ml de la mezcla
g).- NaHCO_3 (3.23 mg/250 ml de agua destilada)
h).- Na HCO_3 (3.23 mg/250 ml de agua destilada)
burbujeado con CO_2 durante 30 min

Mezclar las soluciones a, b, c, d, e, f,

Ajustar a pH 7.4 con la solución y completar a 21 partes de NaHCO_3 con solución h.

ROJO OLEOSO: Disolver en 50 ml de aceite mineral 2 g de Rojo Oleoso, centrifugar a 10 000 rpm por 15 min, extraer el sobrenadante el cual se utiliza como como partículas coloridas y es estable indefinidamente a temperatura ambiente.

NITROAZUL DE TETRAZOLIO (NAT): Disolver 20 mg en ml de agua destilada, ajustar con cloruro de sodio la isotonicidad.

ACIDO TRICLORO ACETICO (ATC): Disolver 10 g en 100 ml de agua destilada.

TIOSULFATO DE SODIO: Disolver 10 g en 100 ml de agua destilada.

YODO RADIOACTIVO I^{125} : Ajustar a 0.05 μCi / tubo de un vial que contiene 1.7 - mCi/mg.

SUPER OXIDO: De acuerdo a la pureza del reactivo pesar la cantidad necesaria de Citocromo C para que quede en una concentración de 59 mg por 5 ml de agua destilada.

AGAR SOYA TRIPTICASA: Pesar 59.4 g en 1 l de agua destilada y calentar al autoclave durante 15 min a 1 kg de presión/cm².

SOLUCION DE HALOGENACION: Consta de la siguiente mezcla de soluciones:

a).- NaCl	(0.128 M)	1 parte
b).- KCl	(1.2×10^{-2} M)	1 parte
c).- CaCl_2	(10^{-3} M)	1 parte
d).- NaI^{125}	(0.05 micro Ci)	1 parte
e).- Glucosa	(2×10^{-3} M)	1 parte
f).- Amortiguador de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$	(4×10^{-4} M)	1 parte

RESULTADOS

CALCULO DE U SEGUN EL METODO DE MANN WHITNEY (15)

Ejemplificaremos la obtención de U para los datos de Rojo oleoso.

1.- Ordenar los datos en grupos afines (problemas y normales).

2.- Enlistar indistintamente los grupos asignándoles números progresivos de los valores más bajos a los más altos.

3.- En caso de existir dos o más valores iguales se procederá a enumerarlos en números progresivos hasta agotar la cantidad de muestras semejantes, sumar el valor numérico asignado y dividirlo entre la cantidad de muestras.

4.- Seguir enumerando en orden progresivo hasta agotar las muestras.

5.- Sumar en cada grupo todos los valores asignados a cada muestra, a este nuevo valor se le llamará R.

6.- Aplicar la siguiente fórmula para encontrar el valor de U:

$$U_1 = n_1 n_2 + 1/2 n_2 (n_2 + 1) - R_2$$

$$U_2 = n_1 n_2 + 1/2 n_1 (n_1 + 1) - R_1$$

De donde n_1 y n_2 son el número de muestras.

7.- Seleccionar el valor absoluto más pequeño para U.

8.- Referirlo a las tablas de probabilidad de Mann Whitney.

mg. de Rojo oleoso en ambos grupos.

N	D
0.84 - 12	0.91 - 18
0.70 - 5	0.70 - 5
0.70 - 5	0.73 - 9
0.84 - 12	0.70 - 5
0.87 - 16	0.87 - 16
0.84 - 12	0.84 - 12
0.70 - 5	0.73 - 9
0.70 - 5	0.70 - 5
0.84 - 12	0.87 - 16
0.63 - 1	
$R_1 = 85$	$R_2 = 65$
$n_1 = 10$	$n_2 = 9$

Aplicando la fórmula anterior:

$$U_1 = 70$$

$$U_2 = 80$$

Referir a la tabla para encontrar los niveles de significancia, en este ejemplo el valor tabulado es 20.

Si el valor tabulado es \leq al más pequeño de U de cualquier población, - podemos encontrar estadísticamente diferentes los grupos analizados con una - $P < 0.05$.

TABLA DE PROBABILIDADES DE MANN-WHITNEY

n_1, n_2	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1																				
2				0				0	0	0	0	1	1	1	1	1	2	2	2	2
3					0	1	1	2	2	3	3	4	4	5	5	6	6	7	7	8
4	0		0	1	2	3	3	4	4	5	6	7	8	9	10	11	11	12	13	13
5		0	1	2	3	5	5	6	7	8	9	11	12	13	14	15	17	18	19	20
6		1	2	3	5	6	8	10	10	11	13	14	16	17	19	21	24	24	25	27
7		1	3	5	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24	26	28	30	32	34	
8	0	2	4	6	8	10	13	15	17	19	22	24	26	29	31	34	36	38	41	
9	0	2	4	7	10	12	15	17	20	23	26	28	31	34	37	39	42	45	48	
10	0	3	5	8	11	14	17	20	23	26	29	33	36	39	42	45	48	52	55	
11	0	3	6	9	13	16	19	23	26	30	33	37	40	44	47	51	55	58	62	
12	1	4	7	11	14	18	22	26	29	33	37	41	45	49	53	57	61	65	69	
13	1	4	8	12	16	20	24	28	33	37	41	45	50	54	59	63	67	72	76	
14	1	5	9	13	17	22	26	31	36	40	45	50	55	59	64	67	74	78	83	
15	1	5	10	14	19	24	29	34	39	44	49	54	59	64	70	75	80	85	90	
16	1	6	11	15	21	26	31	37	42	47	53	59	64	70	75	81	86	92	98	
17	2	6	11	17	22	28	34	39	45	51	57	63	67	75	81	87	93	99	105	
18	2	7	12	18	24	30	36	42	48	55	61	67	74	80	86	93	99	106	112	
19	2	7	13	19	25	32	38	45	52	58	65	72	78	85	92	99	106	113	119	
20	2	8	13	20	27	34	41	48	55	62	69	76	83	90	98	105	112	119	127	

DOSIS LETAL MEDIA DE ALLOXAN

LOTE	NUMERO DE RATAS	DOSIS DE ALLOXAN	FACTOR DE DELUCION
1	6	175 mg / kg	1:1.03
2	6	170 mg / kg	1:1.03
3	6	165 mg / kg	1:1.03
4	6	160 mg / kg	1:1.03
5	6	155 mg / kg	1:1.03
6	6	150 mg / kg	1:1.03
7	6	145 mg / kg	1:1.03
8	6	140 mg / kg	1:1.03

MORTALIDAD

LOTE	RATAS MUERTAS	MORTALIDAD %
1	6	100
2	6	100
3	3	50
4	2	33
5	0	0
6	0	0
7	0	0
8	0	0

$$\text{Log DL}_{50} = A - (\text{DP} \times B)$$

$$A = \log 170 = 2.23$$

$$\text{D.P.} = 100 - 50 / 100 - 33 = .746$$

$$B = \text{Log } 1.03 = 0.013$$

$$\text{Log DL}_{50} = 2.23 - (.746 \times 0.013)$$

$$\text{Log DL}_{50} = 2.220$$

$$\text{DL}_{50} = 10^{2.220}$$

$$\text{DL}_{50} = 166 \text{ mg/ kg de peso.}$$

DOSIS EFECTIVA MEDIA DE ALLOXAN

NOTA: Consideramos como ratas hiperglucémicas susceptibles de utilizarse en -
el experimento aquéllas cuya glucemia sea superior a 550 mg/100ml.

LOTE	5	Glucemia		
Rata	1	875	mg / 100 ml	
Rata	2	850	mg / 100 ml	
Rata	3	725	mg / 100 ml	
Rata	4	775	mg / 100 ml	Proporción
Rata	5	900	mg / 100 ml	de hiperglu
Rata	6	880	mg / 100 ml	cémicos 100%
LOTE	6			
Rata	1	700	mg / 100 ml	
Rata	2	560	mg / 100 ml	
Rata	3	800	mg / 100 ml	
Rata	4	730	mg / 100 ml	Proporción
Rata	5	850	mg / 100 ml	de hiperglu
Rata	6	760	mg / 100 ml	cémicos 100%
LOTE	7			
Rata	1	560	mg / 100 ml	
Rata	2	230	mg / 100 ml	
Rata	3	190	mg / 100 ml	
Rata	4	220	mg / 100 ml	Proporción
Rata	5	660	mg / 100 ml	de hiperglu
Rata	6	360	mg / 100 ml	cémicos 33.3 %

LOTE 8

Rata 1
Rata 2
Rata 3
Rata 4
Rata 5
Rata 6

GLUCINIA

220 mg/ 100 ml
330 mg/ 100 ml
190 mg/ 100 ml
220 mg/ 100 ml
360 mg/ 100 ml
570 mg/ 100 ml

Proporción de hiperglucémicos
16 %

$$\text{LOG DE}_{50} = A - (DP \times B)$$

$$A = \text{Log } 155 = 2.19$$

$$DP = 100 - 50 / 100 - 33 = .75$$

$$B = \text{Log } 1.03 = 0.013$$

$$\text{LOG DE}_{50} = 2.19 - (0.75 \times 0.013)$$

$$= 2.19 - 0.0097$$

$$\text{LOG DE}_{50} = 2.1803$$

$$\text{DE}_{50} = 10^{2.1803}$$

$\text{DE}_{50} = 151 \text{ mg/Kg de peso por vía subcutánea .}$

INCORPORACION DE PARTICULAS COLOREADAS CON
ROJO OLEOSO POR CELULAS DEL EXUDADO PERITONEAL

RATA	GLUCEMIA mg/100 ml	ABSORCION	mg DE ROJO OLEOSO
N ₁	110	0,24	0.84
D ₁	620	0.26	0.91
N ₂	140	0.20	0.70
D ₂	550	0.20	0.70
N ₃	120	0.20	0.70
D ₃	730	0.21	0.73
N ₄	125	0.24	0.84
D ₄	679	0.20	0.70
N ₅	115	0.25	0.87
D ₅	660	0.25	0.87
N ₆	119	0.24	0.84
D ₆	590	0.24	0.84
N ₇	125	0.20	0.70
D ₇	710	0.21	0.73
N ₈	131	0.20	0.70
D ₈	635	0.20	0.70
N ₉	117	0.24	0.84
D ₉	585	0.25	0.87
N ₁₀	102	0.18	0.63

$P > 0.05$ N.S. (MANN WHITNEY)

GLUCEMIA N= 120.4 ± 10.7 mg/ 100 ml

D= 651 ± 65 mg/ 100 ml.

Para calcular los miligramos de Rojo Oleoso se multiplica la Absorción por el factor de conversión:

$$10 \mu\text{l} / 10 \text{ ml} = \text{una absorción de } 0.255$$

$$\text{Factor de conversión} = 0.89 / 0.255$$

Miligramos de rojo oleoso

$$N = 0.76 \pm 0.087$$

$$D = 0.78 \pm 0.090$$

REDUCCION DEL NITROAZUL DE TETRAZOLIO
POR CELULAS DE LA CAVIDAD PERITONFAL.

RATA	GLUCEMIA mg/ 100 ml	A B S O R C I O N E S			
		Fagocitando - Descansando			
D ₁	550	0.37	0.09	0.28	0.275
D ₁		0.36	0.09	0.27	
N ₁	143	0.43	0.07	0.36	0.335
N ₁		0.40	0.09	0.31	
D ₂	604	0.35	0.10	0.25	0.255
D ₂		0.34	0.08	0.26	
N ₂	99	0.46	0.06	0.40	0.370
N ₂		0.43	0.09	0.34	
D ₃	594	0.35	0.09	0.26	0.255
D ₃		0.33	0.08	0.25	
N ₃	143	0.46	0.07	0.39	0.375
N ₃		0.45	0.09	0.36	
D ₄	638	0.30	0.06	0.24	0.240
D ₄		0.32	0.08	0.24	
N ₄	121	0.45	0.09	0.36	0.360
N ₄		0.46	0.10	0.36	
D ₅	560	0.37	0.10	0.27	0.270
D ₅		0.36	0.09	0.27	

RATA	GLUCEMIA mg/ 100 ml	A B S O R C I O N E S		
		Fagocitando- Descansando		
N ₅	95	0.42	0.10	0.32
D ₆	650	0.34	0.09	0.25
N ₆	125	0.46	0.10	0.36
N ₆		0.46	0.10	0.36
D ₇	631	0.34	0.11	0.23

GLUCEMIA :

D= 603.85 ± 38.63 mg/ 100 ml

N= 121.00± 20.70 mg/ 100 ml

REDUCCION DEL NAT

D = 0.2536 ± 0.016

N = 0.3500 ± 0.021

P < 0.05 (Mann Whitney)

ACTIVIDAD DEL ION SUPER OXIDO

GENERADO

RATA	GLUCEMIA mg/100ml	A B S O R C I O N E S		= ACTIVIDAD
		DESCANSANDO	- FAGOCITANDO	
D1	620	0.69	0.43	0.26
N ₁	110	0.65	0.34	0.31
D ₂	730	0.68	0.41	0.27
N ₂	115	0.68	0.39	0.29
D ₃	670	0.67	0.43	0.24
N ₃	125	0.65	0.35	0.30
D ₄	710	0.69	0.45	0.24
N ₄	116	0.64	0.38	0.26
D ₅	610	0.65	0.42	0.23
N ₅	90	0.65	0.34	0.31
D ₆	630	0.68	0.44	0.24
N ₆	125	0.62	0.33	0.29
D ₇	595	0.66	0.46	0.20
N ₇	95	0.69	0.35	0.34
D ₈	707	0.68	0.45	0.23
N ₈	105	0.69	0.33	0.36
D ₉	605	0.69	0.45	0.24
N ₉	102	0.65	0.33	0.32
D ₁₀	590	0.65	0.42	0.23
N ₁₀	125	0.68	0.33	0.35

RATA	GLUCEMIA mg/ 100 ml	A B S O R C I O N		
		DESCANSANDO	- FAGOCITANDO	= ACTIVIDAD
D ₁₁	710	0.69	0.44	0.25
N ₁₁	117	0.69	0.35	0.34
D ₁₂	635	0.66	0.43	0.23
D ₁₃	585	0.68	0.45	0.23

GLUCEMIA mg/ 100 ml

D = 645.9 ± 52.46

N = 111.36 ± 12.15

ACTIVIDAD PROMEDIO

D = 0.238 ± 0.017

N = 0.315 ± 0.030

P < 0.05 (Mann Whitney)

HALOGENACION DE CELULAS DEL EXUDADO PERITONEAL

(2×10^6 células / 30 min)

RATA	(FAGOCITANDO - REPOSANDO) - BLANCO	GLUCEMIA
D ₁	3105 - 890 = 2215	770
N ₁	5432 - 890 = 4542	122
D ₂	3286 - 890 = 2396	670
N ₂	6839 - 890 = 5949	122
D ₃	3469 - 890 = 2579	556
N ₃	4838 - 890 = 3948	155
D ₄	3729 - 890 = 2839	550
N ₄	5571 - 890 = 4681	125
D ₅	3605 - 890 = 2715	570
N ₅	6619 - 890 = 5729	125
D ₆	3267 - 890 = 2367	800
N ₆	8167 - 890 = 7378	125
N ₇	6838 - 890 = 5948	100

$$D = 2518 \pm 234$$

$$N = 5439 \pm 1124$$

P < 0.05 (Mann Whitney)

GLUCEMIA (mg / 100 ml)

$$D = 652 \pm 111$$

$$N = 124.8 \pm 15$$

CELULAS FORMADORAS DE PLACA

RATA	GLUCEMIA mg / 100 ml	NUMERO DE PLACAS	PROMEDIO	CELULAS NUCLEADAS POR ml (x 10 ⁶)	CELULAS NUCLEADAS POR BAZO (x 10 ⁶)
D ₁	615	5 - 4 - 6	50	10.6	1060
N ₁	110	32-32-30	310	12.2	1220
D ₂	595	5 - 8 -6	70	10.4	1040
N ₂	115	37-38-32	360	15.0	1500
D ₃	620	2 -9	60	11.3	1120
N ₃	125	31-38-30	330	16.6	1660
D ₄	558	10-9 - 9	90	13.2	1320
N ₄	140	30-30-35	320	11.3	1130
D ₅	645	8 -10-9	90	13.0	1300

Los Bazos se homogeneizaron en 10 ml de M.E.M. y se hizo una dilución 1 : 10 de donde se colocó 0.1 ml en cada placa

RATA	CFP / 10 ⁶ CELULAS NUCLEADAS	CFP/ BAZO
D ₁	5	5000
N ₁	25	31 000
D ₂	7	7 000
N ₂	24	36 000
D ₃	5	6 000
N ₃	20	33 000

RATA	CFP/ 10 ⁶ CELULAS NUCLEADAS	CFP/ BAZO
D ₄	7	9 000
N ₄	28	32 000
D ₅	7	9 000

N = 24.24 ± 3.3 CFP / 10⁶ CELULAS NUCLEADAS

D = 6.2 ± 1.09 CFP / 10⁶ CELULAS NUCLEADAS

P = 0.05 (Mann Whitney)

N = 33 000 ± 2160 CFP / BAZO

D = 7 200 ± 1789 CFP / BAZO

P < 0.05 (Mann Whitney)

GLUCEMIA

N = 122.5 ± 13.22 mg / 100 ml

D = 612.6 ± 22.5 mg / 100 ml

CELULAS FORMADORAS DE PLACA 2o. EXPERIMENTO

RATA	GLUCEMIA mg/ 100 ml	NÚMERO DE PLACAS			PROMEDIO	CELULAS	CELULAS
						NUCLEADAS por ml (x 10 ⁶)	NUCLEADAS por BAZO (x 10 ⁶)
N ₁	143	25	12	18	180	9.15	915
D ₁	550	1	0	2	10	7.6	760
N ₂	95	25	19	17	200	11.5	1150
D ₂	704	3	7	2	40	10.85	1085
N ₃	105	45	40	36	400	11.6	1160
D ₃	631	0	4	2	20	7	700
N ₄	121	15	21	10	150	10.35	1035
D ₄	595	1	0	0	3	11.25	1125
D ₅	605	2	3	6	47	6.55	655

Los Bazos se resuspenden en 10 ml de M.E.M. y se hizo una dilución 1 : 10 de donde se tomó 0.1 ml para cada placa .

RATA	CFP/ 10 ⁶ CELULAS	CFP/ BAZO
	NUCLEADAS	
N ₁	20	18 000
D ₁	1	1 000
N ₂	17	20 000
D ₂	4	4 000
N ₃	34	40 000
D ₃	3	2 000
N ₄	15	15 000
D ₄	0.3	300
D ₅	7	4 700

N = 21.5 ± 8.6 CFP / 10⁶ CELULAS NUCLEADAS

D = 3.06 ± 2.66 CFP/ 10⁶ CELULAS NUCLEADAS

P < 0.05 (Mann Whitney)

N = 23 250 ± 11 354 CFP / BAZO

D = 2 400 ± 1 896 CFP / BAZO

P < 0.05 (Mann Whitney)

GLUCEMIA

N = 116 ± 20.9 mg / 100 ml

D = 617 ± 56.7 mg / 100 ml

FORMACION DE ROSETAS E A POR MACROFAGOS DE LA CAVIDAD

PERITONEAL

RATA	GLUCEMIA mg/ 100 ml	R O S E T A S			PROMEDIO
		R ₁	R ₂	R ₃	
D ₁	800	42	38	37	39
N ₁	130	61	58	63	61
D ₂	860	37	34	27	33
N ₂	140	64	67	60	64
D ₃	725	35	37	29	34
N ₃	128	61	66	50	59
D ₄	710	34	30	36	34
N ₄	119	66	60	59	62
D ₅	640	35	39	30	35
N ₅	125	58	60	55	58
D ₆	550	35	40	33	36
N ₆	110	65	55	60	60
D ₇	605	31	39	34	35
N ₇	98	55	62	65	61
D ₈	590	36	44	39	40
N ₈	121	59	68	65	64
D ₉	665	38	42	44	41

GLUCEMIA mg/ 100 ml

D = 680.55 ± 104.7

N = 121.37 ± 12.87

ROSETAS

$$D = 36.33 \pm 2.92$$

$$N = 61.12 \pm 2.17$$

$P < 0.05$ (Mann Whitney)

DOSIS LETAL MEDIA Y PROTECCION

(*Listeria monocytogenes*)

LOTE	Número de ratas	DOSIS	MORTALIDAD	PORCENTAJE DE MORTALIDAD
1	6	10^9 bacterias	6	100
2	6	10^8 bacterias	6	100
3	6	10^7 bacterias	0	0
4	6	10^6 bacterias	0	0
5	6	10^5 bacterias	0	0

$$\text{Log DL}_{50} = A - (DP \times B)$$

$$A = 9$$

$$DP = 100 - 50 / 100 = 0.5$$

$$B = \text{Log } 10 = 1$$

$$\text{Log DL}_{50} = 9 - (0.5 \times 1)$$

$$\text{Log DL}_{50} = 8.5$$

$$\text{DL}_{50} = 10^{8.5} \text{ bacterias / vía intravenosa .}$$

Listeria Monocytogenes .
BACTERIAS ENCONTRADAS EN BAZO .

PRIMERA LAVADA

	1:20	1: 200	1: 2000
N ₁	incontables	69	15
N ₂	incontables	63	10
N ₃	incontables	124	24
N ₄	incontables	incontables	31
N ₅	incontables	incontables	18
N ₆	incontables	incontables	15
N ₇	incontables	101	86
N ₈	incontables	97	11
D ₁	incontables	incontables	175
D ₂	incontables	163	106
D ₃	incontables	154	85
D ₄	incontables	140	94
D ₅	incontables	150	63
D ₆	incontables	incontables	255
D ₇	incontables	95	145
D ₈	incontables	incontables	137

SEGUNDA LAVADA

	1: 20	1: 200	1: 2000
N ₁	incontables	75	8
N ₂	incontables	74	8
N ₃	incontables	39	14
N ₄	incontables	79	12
N ₅	incontables	85	9
N ₆	incontables	23	3
N ₇	incontables	incontables	27
N ₈	incontables	52	10
D ₁	incontables	incontables	131
D ₂	incontables	incontables	225
D ₃	incontables	290	113
D ₄	incontables	120	90
D ₅	incontables	300	120
D ₆	incontables	255	64
D ₇	incontables	incontables	200
D ₈	incontables	incontables	220

TERCERA LAVADA

	1:20	1: 200	1: 2000
N ₁	incontables	117	4
N ₂	incontables	150	16
N ₃	incontables	135	14
N ₄	incontables	250	44
N ₅	incontables	151	39
N ₆	incontables	134	13
N ₇	incontables	170	17
N ₈	incontables	165	37
D ₁	incontables	incontables	220
D ₂	incontables	321	155
D ₃	incontables	254	60
D ₄	incontables	incontables	137
D ₅	incontables	incontables	198
D ₆	incontables	incontables	117
D ₇	incontables	incontables	100
D ₈	incontables	incontables	207

CALCULOS:

Para encontrar el número de bacterias, multiplicar el número de colonias por la dilución por 4 ml / .3 ml. De donde se puede encontrar el siguiente factor:

$$\text{factor de bacterias} = 2000 \times 4/.3 = 26.666 \times 10^3$$

Los 4 ml es el volúmen en que se homogeneizó el bazo, los .3 ml son el volúmen inicial.

	1a lavada	2a lavada	3a lavada
N ₁	399.99 x 10 ³	213.333 x 10 ³	106.66 x 10 ³
N ₂	266.66 x 10 ³	213.333 x 10 ³	426.66 x 10 ³
N ₃	639.99 x 10 ³	373.333 x 10 ³	373.333 x 10 ³
N ₄	826.66 x 10 ³	319.99 x 10 ³	1173.333 x 10 ³
N ₅	479.99 x 10 ³	329.99 x 10 ³	1039.99 x 10 ³
N ₆	399.99 x 10 ³	79.99 x 10 ³	346.99 x 10 ³
N ₇	2.29 x 10 ⁶	719.99 x 10 ³	455.33 x 10 ³
N ₈	283,33 x 10 ³	266.66 x 10 ³	986.66 x 10 ³
D ₁	1.666 x 10 ⁶	3.49 x 10 ⁶	5.86 x 10 ⁶
D ₂	2.82 x 10 ⁶	5.99 x 10 ⁶	4.07 x 10 ⁶
D ₃	2.26 x 10 ⁶	3.01 x 10 ⁶	1.56 x 10 ⁶
D ₄	2.50 x 10 ⁶	2.39 x 10 ⁶	3.65 x 10 ⁶
D ₅	1.67 x 10 ⁶	3.19 x 10 ⁶	5.27 x 10 ⁶
D ₆	7.73 x 10 ⁶	1.70 x 10 ⁶	3.119 x 10 ⁶
D ₇	3.86 x 10 ⁶	5.33 x 10 ⁶	2.66 x 10 ⁶
D ₈	3.65 x 10 ⁶	5.86 x 10 ⁶	5.51 x 10 ⁶

Sumar el número de bacterias de cada lavada:

$$N_1 = 719.99 \times 10^3$$

$$N_2 = 906.66 \times 10^3$$

$$N_3 = 1013.33 \times 10^3$$

$$N_4 = 2323.66 \times 10^3$$

$$N_5 = 1749.99 \times 10^3$$

$$N_6 = 932.99 \times 10^3$$

$$N_7 = 3463.33 \times 10^3$$

$$N_8 = 1546.99 \times 10^3$$

$$D_1 = 14.016 \times 10^6$$

$$D_2 = 12.88 \times 10^6$$

$$D_3 = 6.86 \times 10^6$$

$$D_4 = 8.54 \times 10^6$$

$$D_5 = 10.13 \times 10^6$$

$$D_6 = 12.149 \times 10^6$$

$$D_7 = 11.85 \times 10^6$$

$$D_8 = 15.02 \times 10^6$$

$$N_{\text{promedio}} = 1.5819 \times 10^6 \pm 930.5 \times 10^3$$

$$D_{\text{promedio}} = 11.431 \times 10^6 \pm 2.76 \times 10^6$$

$P < 0.05$ (Mann Whitney)

LISTERIA MONOCITOGENES EN CELULAS
DE EXUDADO PERITONEAL.

Factor de conversión para encontrar el número de bacterias = $10/0.05 = 200$.

donde 10 es el volúmen inoculado en cavidad peritoneal, 0.05 ml - es el volúmen sembrado.

D ₁	1800	n ₁	1200
D ₂	2400	N ₂	2000
D ₃	3000	N ₃	0
D ₄	8200	N ₄	2000
D ₅	4600	N ₅	1000
D ₆	4200	N ₆	800
D ₇	14200	N ₇	600

$$D = 5485.71 \pm 4378.5$$

$$N = 1085 \pm 729$$

$$P < 0.05 \quad (\text{Mann Whitney})$$

CUANTIFICACION DE PROTEINAS TOTALES

SEGUN EL METODO DE BIURET

CONCENTRACIONES		RATAS
6.7	g/ 100 ml	N ₁
6.89	g/ 100 ml	N ₂
6.9	g/ 100 ml	N ₃
6.7	g/ 100 ml	N ₄
7.7	g/ 100 ml	N ₅
7.3	g/ 100 ml	N ₆
7.16	g/ 100 ml	N ₇
7.15	g/ 100 ml	N ₈
7.3	g/ 100 ml	N ₉
7.16	g/ 100 ml	N ₁₀
7.7	g/ 100 ml	D ₁
6.89	g/ 100 ml	D ₂
6.38	g/ 100 ml	D ₃
6.89	g/ 100 ml	D ₄
7.7	g/ 100 ml	D ₅
7.4	g/ 100 ml	D ₆
7.3	g/ 100 ml	D ₇
7.3	g/ 100 ml	D ₈

$$\bar{N} = 7.096 \pm .3$$

$$\bar{D} = 7.19 \pm .45$$

P > 0.05 N.S. (Mann Whitney)

GLUCIMIA - PROTEINAS TOTALES

RATA	CONC. mg / 100 ml
N ₁ -----	110
N ₂ -----	95
N ₃ -----	120
N ₄ -----	98
N ₅ -----	134
N ₆ -----	121
N ₇ -----	115
N ₈ -----	92
N ₉ -----	130
N ₁₀ -----	98
D ₁ -----	606
D ₂ -----	710
D ₃ -----	625
D ₄ -----	645
D ₅ -----	590
D ₆ -----	704
D ₇ -----	580
D ₈ -----	601

$$\bar{N} = 111.3 \pm 19.06$$

$$\bar{D} = 632.62 \pm 50.12$$

RESULTADOS DE COMPLEMENTO CON HEMOLISIS AL 50%

Rata		Dilución			
		1: 10		1 : 20	
		Absorción	Porcentaje de Hemólisis	Absorción	porcentaje de Hemólisis
D ₁	1.-	0.45	99	0.44	97
	2.-	0.46	100	0.44	88
	3.-	0.42	92	0.34	75
	4.-	0.36	79	0.22	49
N ₁	1.-	0.45	99	0.43	95
	2.-	0.45	99	0.39	86
	3.-	0.43	95	0.34	75
	4.-	0.35	77	0.18	40
D ₂	1.-	-	-	0.39	86
	2.-	-	-	0.33	73
	3.-	-	-	0.25	55
	4.-	-	-	0.10	22
N ₂	1.-	0.47	100	0.40	88
	2.-	0.46	100	0.36	79
	3.-	0.41	90	0.25	55
	4.-	0,35	77	0.14	31
D ₃	1.-	0.45	99	0.44	97
	2.-	0.46	100	0.40	88
	3.-	0.42	92	0.32	70

RATA	Dilución 1 : 10		Dilución 1 : 20		
	Absorción	Porcentaje de Hemólisis	Absorción	Porcentaje de Hemólisis	
	4.-	0.39	86	0.22	48
N ₃	1.-	0.46	100	0.45	99
	2.-	0.44	97	0.41	90
	3.-	0.43	95	0.28	62
	4.-	0.34	75	0.15	33
D ₄	1.-	0.45	99	0.39	86
	2.-	0.41	90	0.34	75
	3.-	0.38	84	0.20	44
	4.-	0.29	64	0.13	29
N ₄	1.-	0.49	100	0.43	95
	2.-	0.44	97	0.39	86
	3.-	0.40	88	0.28	62
	4.-	0.35	77	0.16	35
D ₅	1.-	0.45	88	0.40	88
	2.-	0.44	97	0.35	77
	3.-	0.35	77	0.27	69
	4.-	0.26	57	0.20	45
N ₅	1.-	0.46	100	0.46	100
	2.-	0.46	100	0.43	95
	3.-	0.45	99	0.35	77
	4.-	0.44	97	0.26	57

RATA	DILUCION 1 : 10		DILUCION 1: 20		
	Absorción	Porcentaje de Hemólisis	Absorción	Porcentaje de Hemólisis	
D ₆	1.-	0.45	99	0.45	77
	2.-	0.40	88	0.32	70
	3.-	0.35	77	0.20	45
	4.-	0.29	64	0.15	33
N ₆	1.-	0.43	95	0.38	84
	2.-	0.42	92	0.33	73
	3.-	0.30	86	0.24	53
	4.-	0.31	68	0.12	26
D ₇	1.-	0.46	100	0.38	84
	2.-	0.43	95	0.32	70
	3.-	0.36	79	0.23	51
	4.-	0.27	59	0.16	35
N ₇	1.-	0.45	99	0.44	97
	2.-	0.44	97	0.42	92
	3.-	0.41	90	0.30	66
	4.-	0.32	70	0.12	28
D ₈	1.-	0.46	100	0.45	99
	2.-	0.43	95	0.42	92
	3.-	0.42	92	0.37	81
	4.-	0.40	88	0.24	55

RATA	DILUCION 1 : 10		Dilución 1 : 20		
	Absorción	Porcentaje de Hemólisis	Absorción	Porcentaje de Hemólisis	
N ₈	1.-	0.45	99	0.44	97
	2.-	0.45	99	0.42	92
	3.-	0.44	97	0.36	79
	4.-	0.40	88	0.22	48
D ₉	1.-	0.46	100	0.42	95
	2.-	0.46	100	0.36	86
	3.-	0.45	99	0.24	53
	4.-	0.34	75	0.14	31
N ₉	1.-	-	-	0.35	77
	2.-	-	-	0.30	66
	3.-	-	-	0.22	48
	4.-	-	-	0.08	18

Testigo positivo (promedio) = 0.455

RATA	Glucemia mg/ 100 ml	Unidades de Hemólisis al 50 % de Complemento .
D ₁	770	129.03
N ₁	122	114.2
D ₂	670	83.3
N ₂	122	95.23
D ₃	536	125.14
N ₃	155	108.1
D ₄	550	86.95
N ₄	125	105.26
D ₅	570	117.64
N ₅	125	153.84
D ₆	800	83.33
N ₆	100	86.95
D ₇	825	90.9
N ₇	125	100
D ₈	850	142.85
N ₈	120	132.33
D ₉	645	95.24
N ₉	125	80

Unidades de Hemólisis al 50 % de Complemento

N = 108.64 ± 22.98

P > 0.05 N.S.

D = 106.04 ± 22.70

(Mann Whitney)

Glucemia mg / 100 ml

N = 124.33 ± 13.98

D = 690.66 ± 123.72

DISCUSION DE RESULTADOS

DISCUSION DE RESULTADOS

Se ha demostrado clínicamente la susceptibilidad del diabético hacia las infecciones recurrentes (1) . Dada la imposibilidad de mantener condiciones reproducibles de hiperglucemia en pacientes diabéticos , se presenta el problema de analizar de manera precisa las condiciones operantes del sistema inmune . Esto es lo que ha originado que existan valores tan diferentes y contradictorios sobre ciertos parámetros medidos en seres humanos (29, - 30, 31) .

En nuestro modelo podemos encontrar que el evento de incorporación de partículas opsonizadas no está aparentemente perturbado por la deficiencia de insulina , ya que como se observa en la gráfica 1 los valores son estadísticamente similares ($p > 0.05$) . Cabe aclarar que no es necesario la incorporación de sustancias para que puedan ser medidas por éste método , - sino que solo basta que se adhieran a la superficie de toda célula que tenga receptores para C_3b .

La evaluación de algunos parámetros oxidantes lisosomales nos sugieren ya alguna perturbación del evento fagocítico en la parte citopéptica .

En el caso de la generación del ión super óxido encontramos que existe una diferencia estadística entre el grupo de los controles y de las ratas hiperglucémicas como se puede apreciar en la gráfica 2 ($P < 0.05$), donde se observa mayor generación del ión en los controles .

Se ha propuesto que uno de los sistemas que no dependen de Mieloperoxidasa (32) y que explican el poder letal de las células fagocíticas es la generación del ión super óxido cuya producción obedece a una reducción univalente del oxígeno molecular . Esta disminución de la generación de ión super oxido explica una posible deficiencia en la capacidad destructiva de

aquellas células que no poseen capacidad de halogenación , como las células fagocíticas mononucleares . Sin embargo se ha encontrado que éstas células poseen un mecanismo similar de halogenación al que realiza la Mieloperoxidasa (MPO) , solamente que es llevado a cabo por la Catalasa (33) .

La prueba de la reducción del Nitroazul de Tetrazolio (NAT) es otro parámetro que nos va a evaluar el arsenal lisosomático de los fagocitos(5) , como podemos observar en la gráfica 3 , existe una disminución cuantitativa de éste colorante por su menor conversión a formazán en las ratas hiperglucémicas que en las normales .

Uno de los sistemas oxidantes más importantes para la destrucción de antígenos es el sistema de Mieloperoxidasa (MPO) o Catalasa en las células mononucleares , (24) como se puede apreciar en la gráfica 4 existe una menor capacidad de halogenación en los problemas que en las ratas normoglucémicas .

Se ha relacionado la activación de macrófagos con la aparición en membrana para receptores de Fc de IgG (34) , en la gráfica 5 podemos analizar que existe una disminución de macrófagos que forman rosetas en los problemas , es decir hay una disminución de la proporción de macrófagos activados en condiciones basales en las ratas hiperglucémicas en relación al grupo control .

Al medir la respuesta inmune humoral (RIH) por el método de las células formadoras de placa (CFP) (18) se encontró que las células formadoras de anticuerpos en las ratas hiperglucémicas está disminuida estadísticamente como se muestra en la gráfica 6 .

Dada la importancia biológica del sistema de complemento , se ha evaluado por el método de Von Krogh (27) , que es una determinación cuantitativa

de este sistema en unidades de hemólisis al 50 % . En la gráfica 7 se observa que no hay diferencia significativa en los valores de actividad del complemento .

Se ha medido en el sistema hiperglucémico inducido por Alloxán , las condiciones basales de proteínas totales en el suero de animales normales e hipoinsulínicos sin encontrar variaciones significativas ($P > 0.05$).

Una prueba que nos demuestra in vivo la acción del sistema inmune en concordancia es la resistencia bacteriana , que nos presenta la capacidad del animal para manejar una infección intracelular (25, 26) . Al analizar los datos encontramos suprimida casi 10 veces la capacidad de manejar la *Listeria monocytogenes* en las ratas hiperglucémicas en comparación a las normales , gráfica 8 .

Es un hecho de aceptación general que la glucosa juega un papel importante en la obtención de energía para los sistemas oxidantes de las células fagocíticas (5, 15) .

Al seguir como marco de referencia el esquema I podemos decir que en la generación del ión super óxido no existe una explicación aceptable entre la hipoinsulinemia y la actividad del mencionado anión , ya que su formación , hasta ahora , no se ha demostrado que sea dependiente de la degradación de glucosa .

Al respecto de la prueba de reducción de NAT , la producción de formazán depende de la capacidad reductora del citoplasma por la utilización de la glucosa por la vía alterna de la degradación de las pentosas conocido como la vía de la hexosa monofosfato (5) , aquí el papel de la insulina puede menar la entrada de glucosa a la célula y disminuir la capacidad reductiva del citoplasma , debido a la poca producción de $\text{NADH} + \text{H}^+$ y $\text{NADPH} + \text{H}^+$

citoplasmático mediado por la utilización anaerobia del metabolito , por lo --
cual se puede relacionar la poca reducción del NAT en las ratas hiperglucémicas
en relación al grupo normal .

La prueba de la capacidad de halogenación , como dijimos anteriormente , se
encuentra estadísticamente disminuida .

Siguiendo nuevamente el esquema I podemos proponer que la variación quizá -
se deba a una deficiencia de la cantidad de enzima halogenante o a una disminu-
ción de la generación de peróxido de hidrógeno como consecuencia de la poca --
entrada de glucosa a la célula y su consecuente degradación por la vía alterna .

La explicación más tentadora quizás sea esta última ya que dado el tiempo -
que se mantuvo la hiperglucemia no fué suficiente para haya una disminución del
contenido normal del arsenal lisosomático .

Se ha demostrado que la hipoinsulinemia en ratones conduce a una pérdida --
significativa del tejido linfático (29, 35) y que en animales diabéticos -
no se puede desarrollar sensibilidad de contacto (30) , así como rechazo efi-
caz de injertos (31, 32) y que la administración de insulina restaura estas -
respuestas (30,31) , causando también un aumento en el peso del Timo y Bazo
(30). Recientemente se ha propuesto que existen en las diferentes subpobla--
ciones de linfocitos T variaciones para los receptores de insulina , debido a -
que se encuentra elevada la actividad de la subpoblación T supresora en un mode
lo de diabetes inducida por Alloxán (31 , 38) . Algunos autores proponen que
esto se debe a una mayor cantidad de receptores para insulina en la subpobla--
ción de linfocitos T cooperadores ,consecuentemente son más susceptibles a la
deficiencia de insulina (35) . De ser aplicable a nuestro sistema las conje--
turas anteriores se puede explicar el porqué algunos eventos independientes de
la utilización de glucosa se encuentran mermados al disminuir la insulina cir-
culante , por lo tanto los linfocitos T cooperadores podrían ser los primeros

en resentir la disminución de la hormona haciéndose patente la acción de los linfocitos T supresores , ésto podría explicar el porqué de la poca generación del ión super óxido .

Al evaluar la RIH debemos tomar en cuenta la cooperación entre células T - B y T - Macrófago , quizás la poca activación de las células B no puede ser debida únicamente a la hipoinsulinemia , sino a la supresión por parte del linfocito T supresor que podría ser el menos vulnerable a la disminución de insulina .

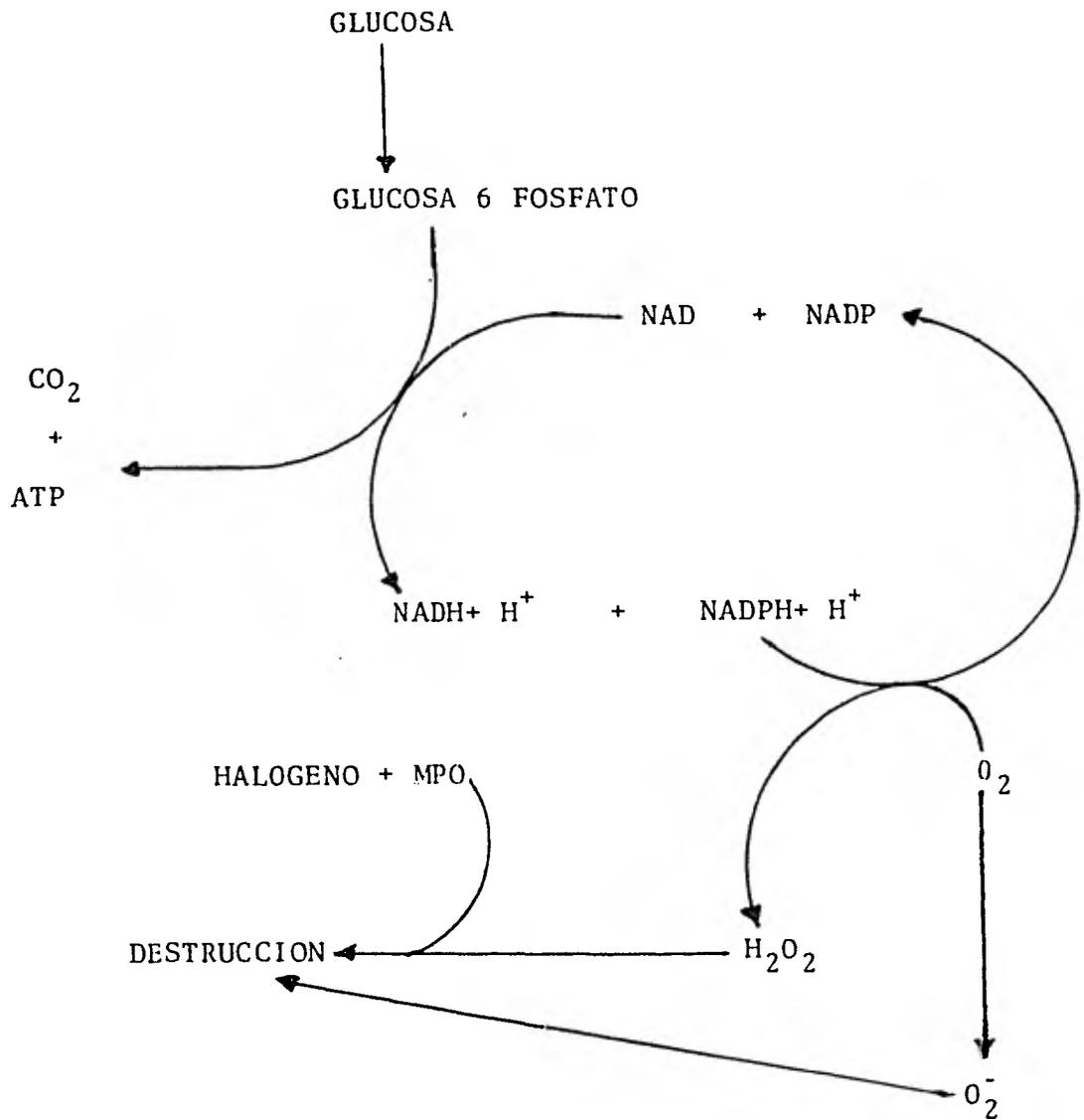
Actualmente se conoce que existen factores cooperadores de los linfocitos T hacia los Macrófagos ; si el linfocito T cooperador está deprimido en su acción por la falta de insulina , he aquí la posible explicación por la poca aparición de receptores para Fc de IgG en nuestro experimento .

Podemos decir en base a nuestros resultados que la deficiencia en los eventos inmunológicos evluados no depende únicamente de la hiperglucemia ; sino que involucra directamente otros procesos como la hipoinsulinemia sostenida -- en el animal , ya que se ha demostrado que la administración de insulina provoca una remisión del sistema inmune (30,31), sin embargo parece existir un efecto desencadenante de la hipoinsulinemia que actúa directamente sobre la cooperación T - B y T - Macrófago , lo que puede traer como consecuencia -- desacoplamiento en la actividad normal de cooperación en aquellos eventos inmunológicos que para su realización no dependen de glucosa .

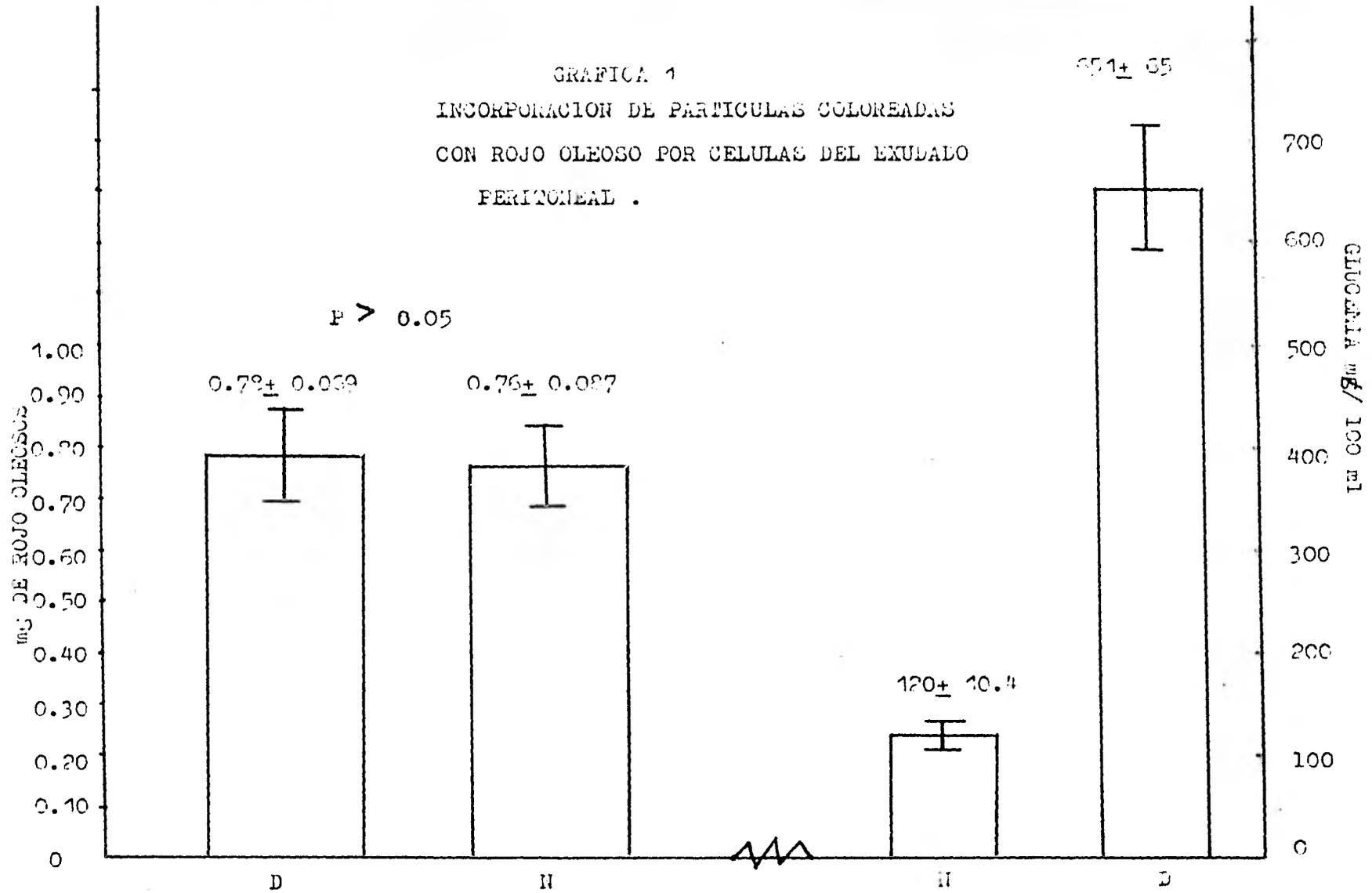
GRAFICAS

ESQUEMA I

(33)

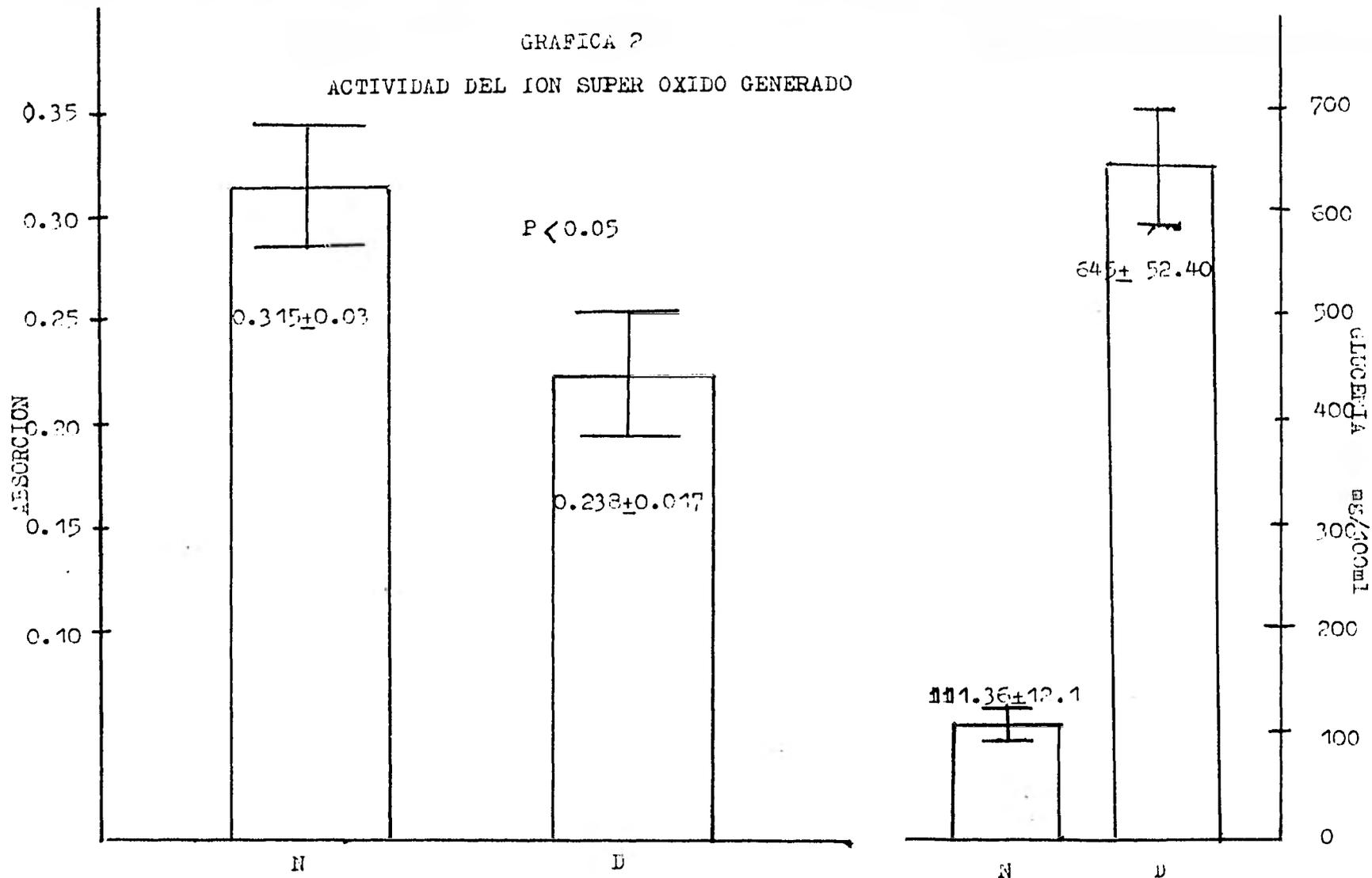


GRAFICA 1
INCORPORACION DE PARTICULAS COLOREADAS
CON ROJO OLEOSO POR CELULAS DEL EXUDADO
PERITONEAL .

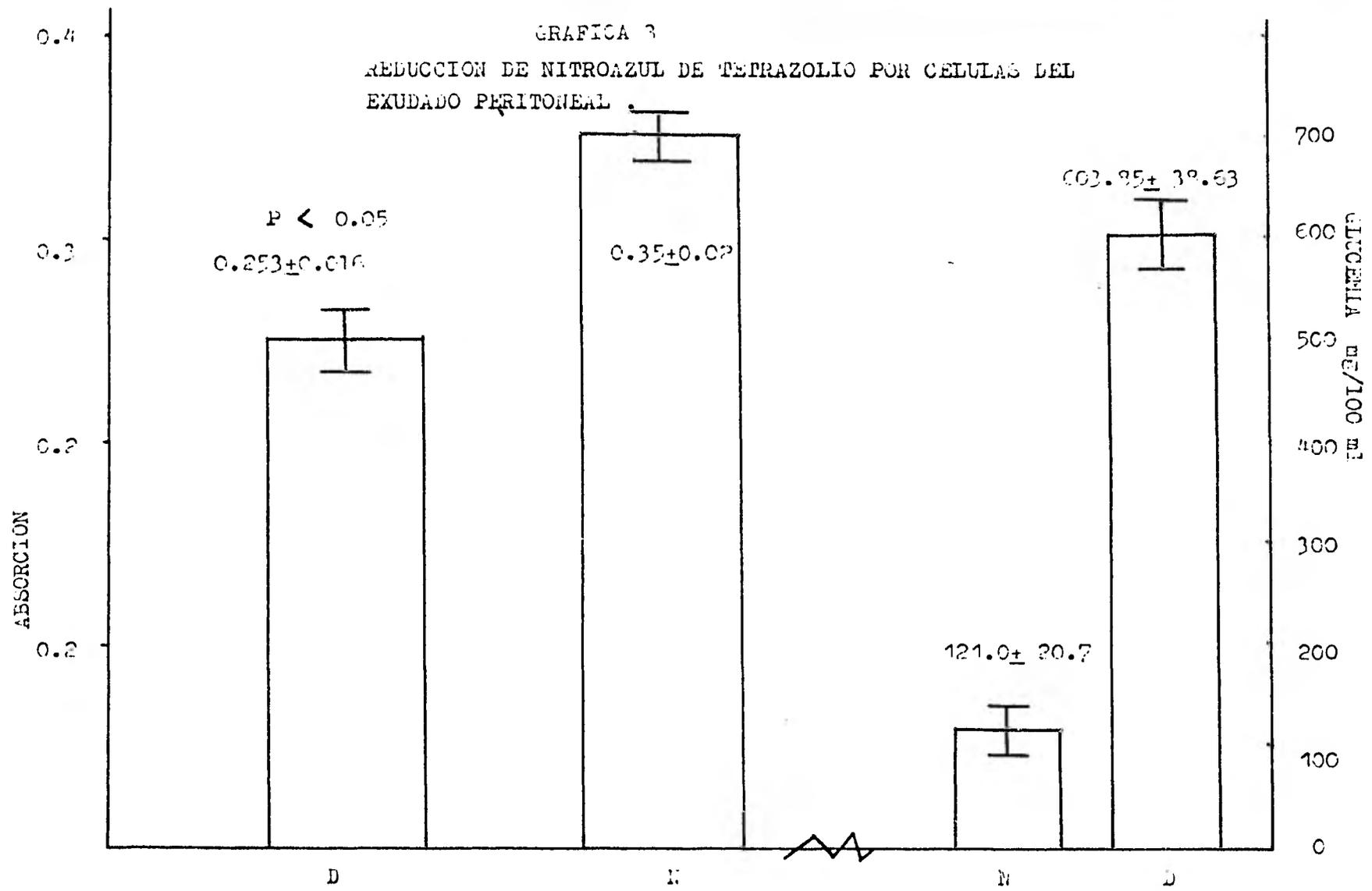


GRAFICA 2

ACTIVIDAD DEL ION SUPER OXIDO GENERADO

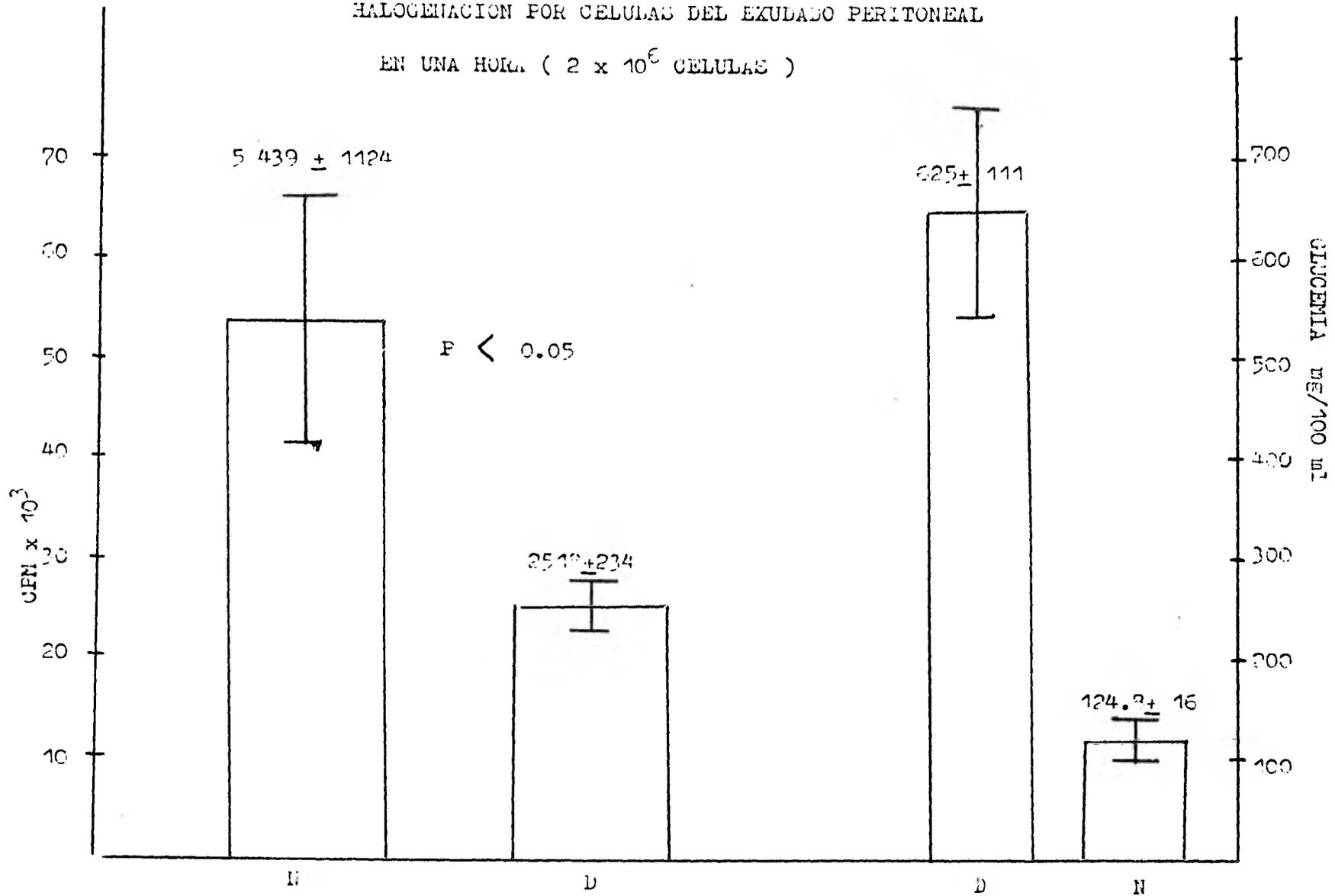


GRAFICA 3
 REDUCCION DE NITROAZUL DE TETRAZOLIO POR CELULAS DEL
 EXUDADO PERITONEAL



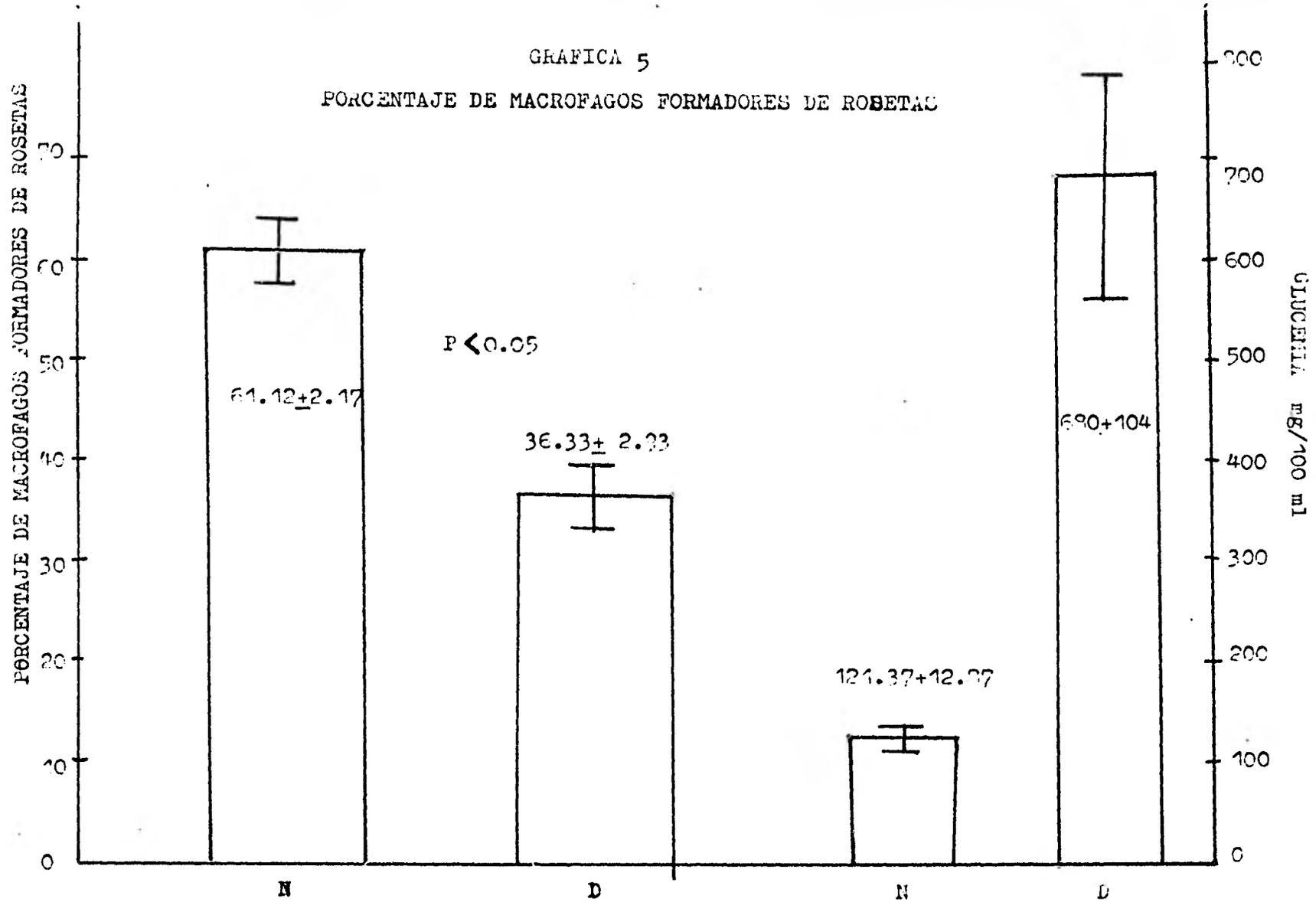
GRAFICA 4
HÁLOGENACION POR CELULAS DEL EXUDADO PERITONEAL

EN UNA HORA (2×10^6 CELULAS)

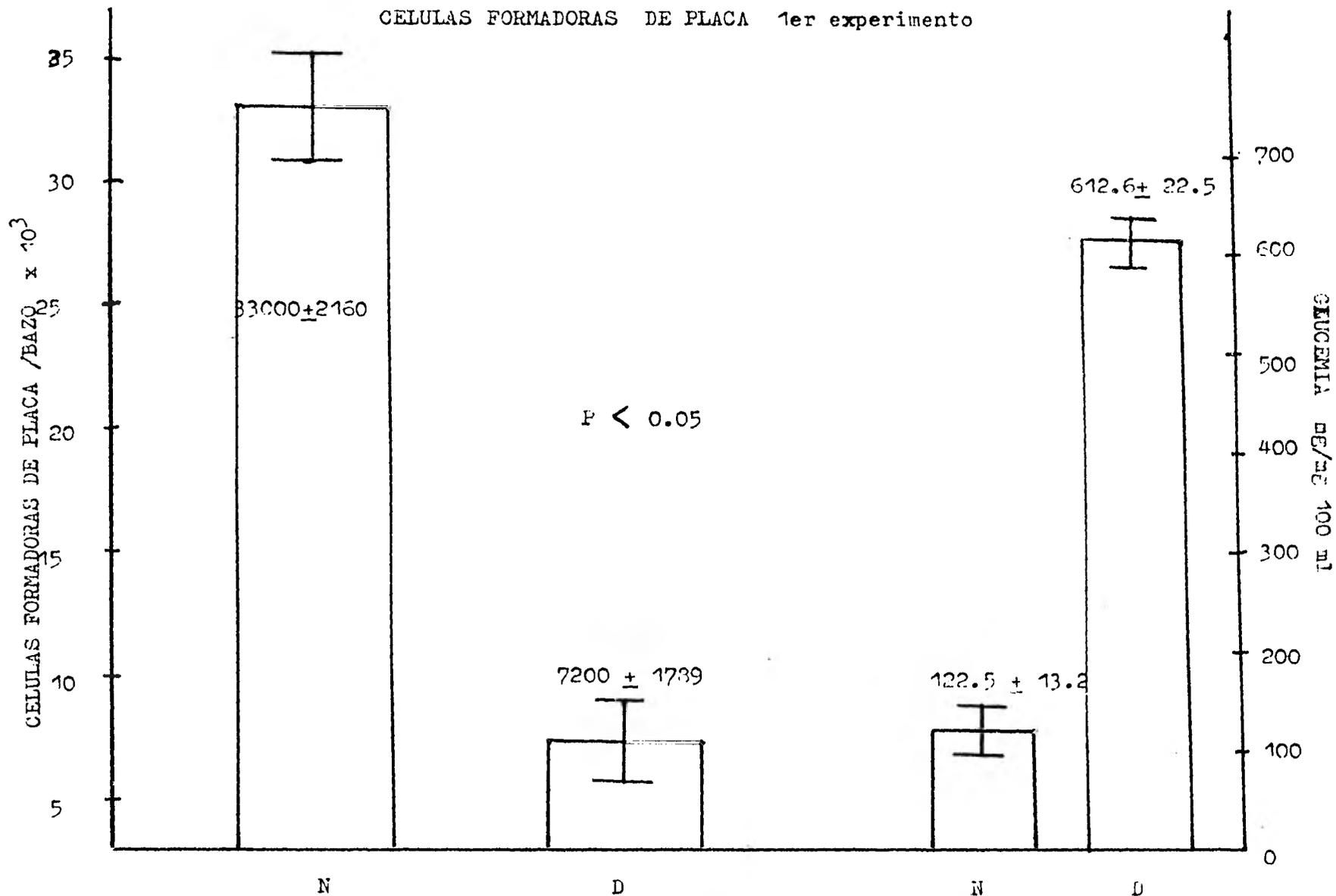


GRAFICA 5

PORCENTAJE DE MACROFAGOS FORMADORES DE ROSETAS



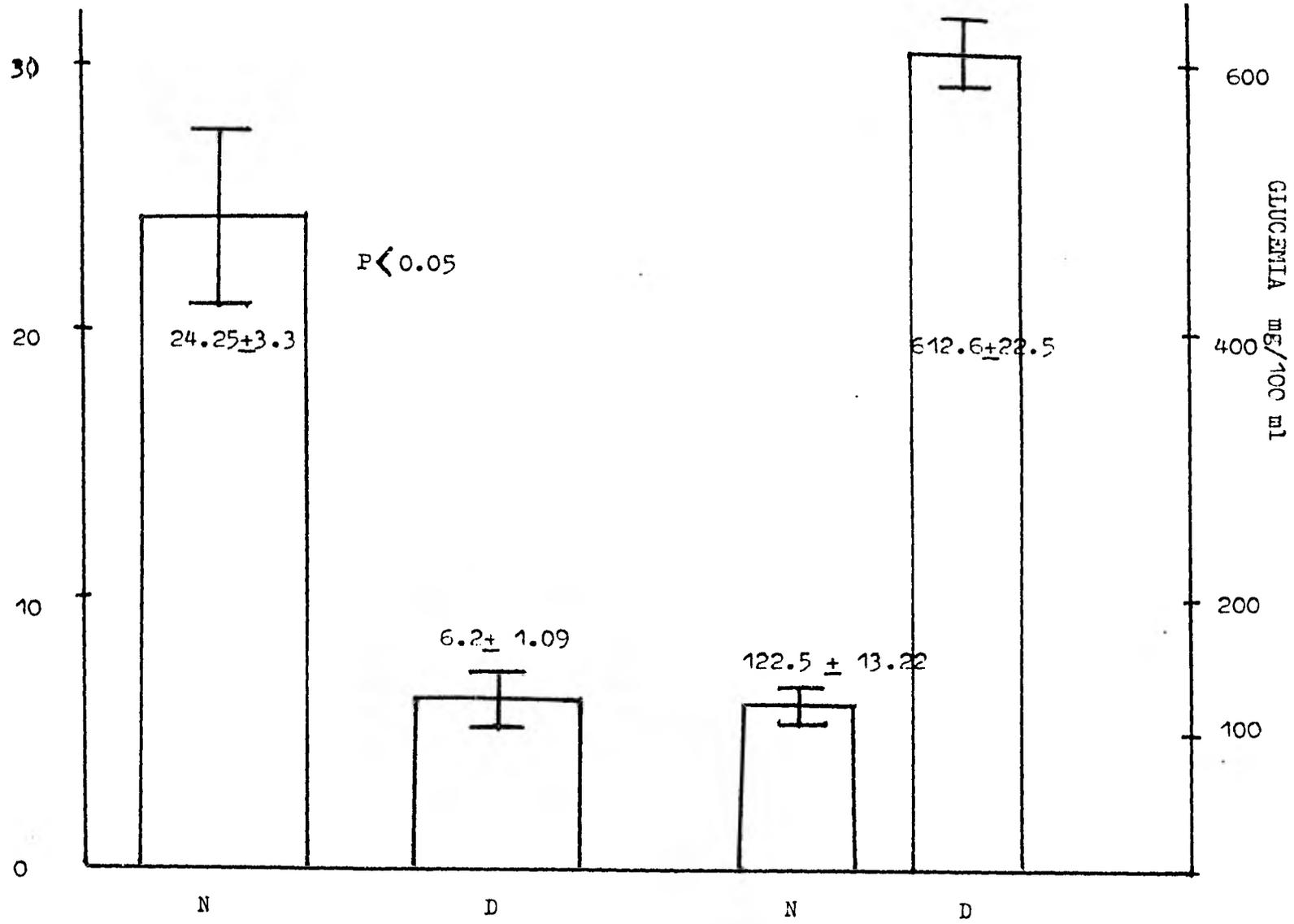
GRAFICA 6
CELULAS FORMADORAS DE PLACA 1er experimento



GRAFICA 6

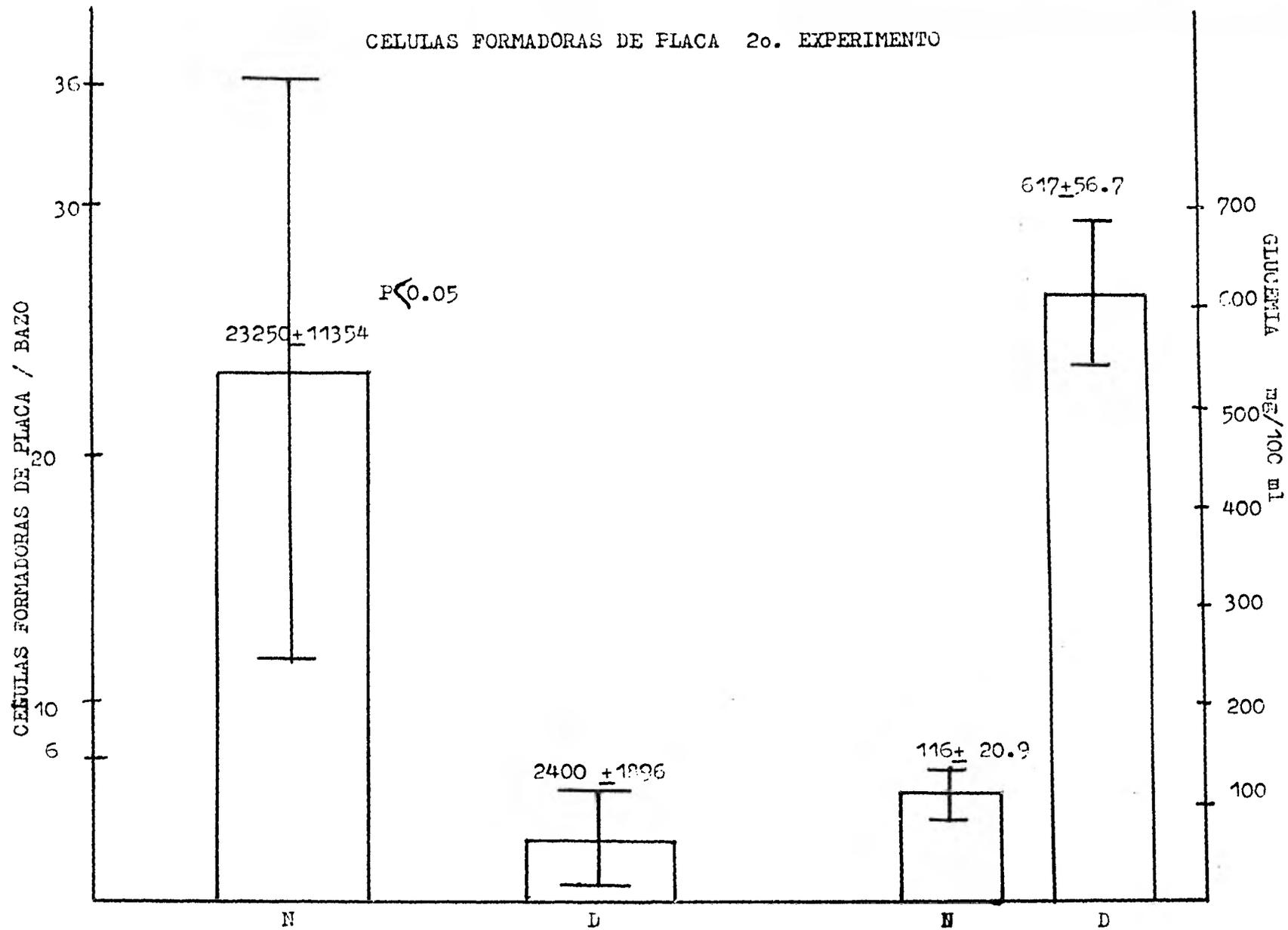
CELULAS FORMADORAS DE PLACA 1er EXPERIMENTO

CELULAS FORMADORAS DE PLACA / MILLON DE CELULAS NUCLEADAS

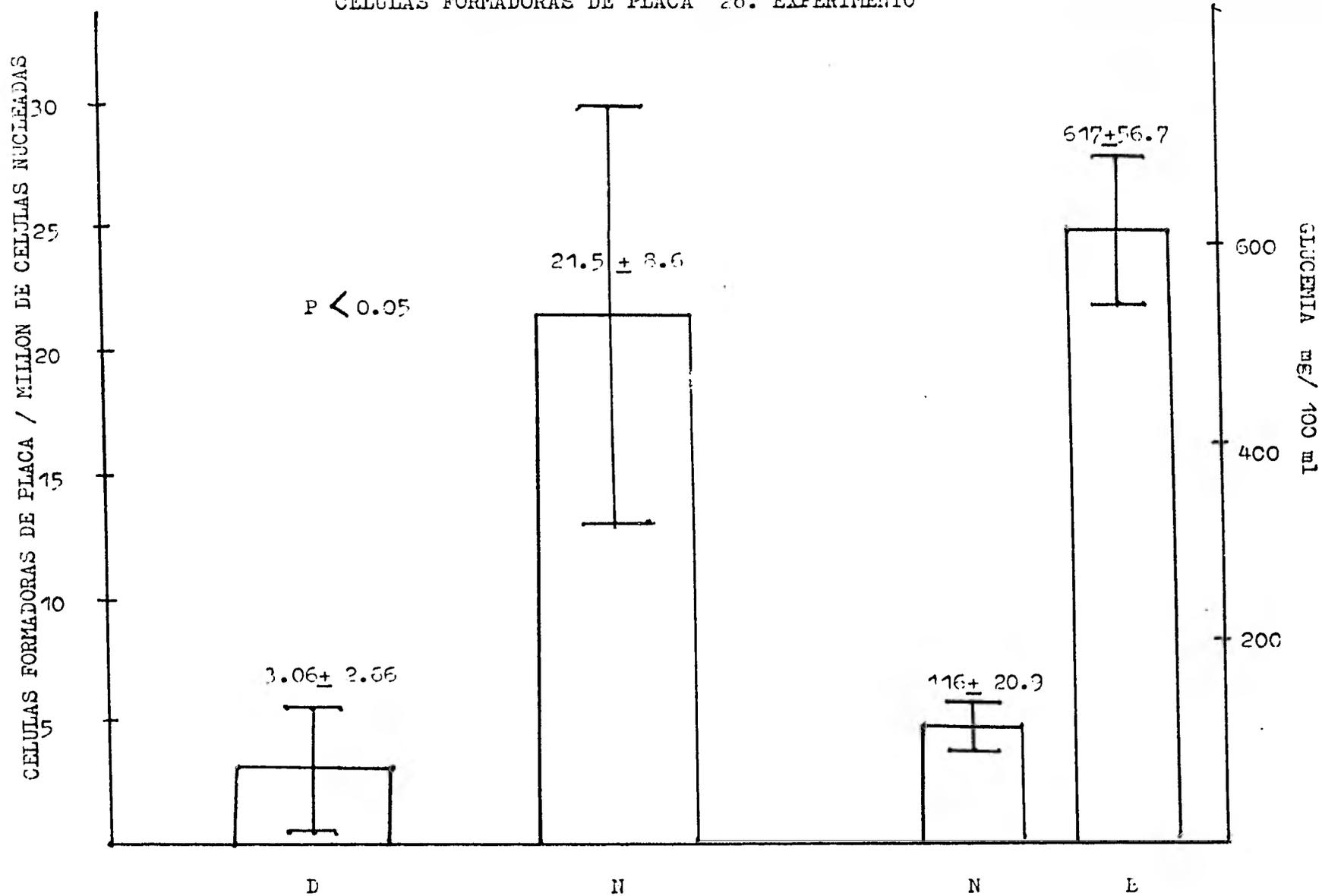


GRAFICA 6

CELULAS FORMADORAS DE PLACA 2o. EXPERIMENTO

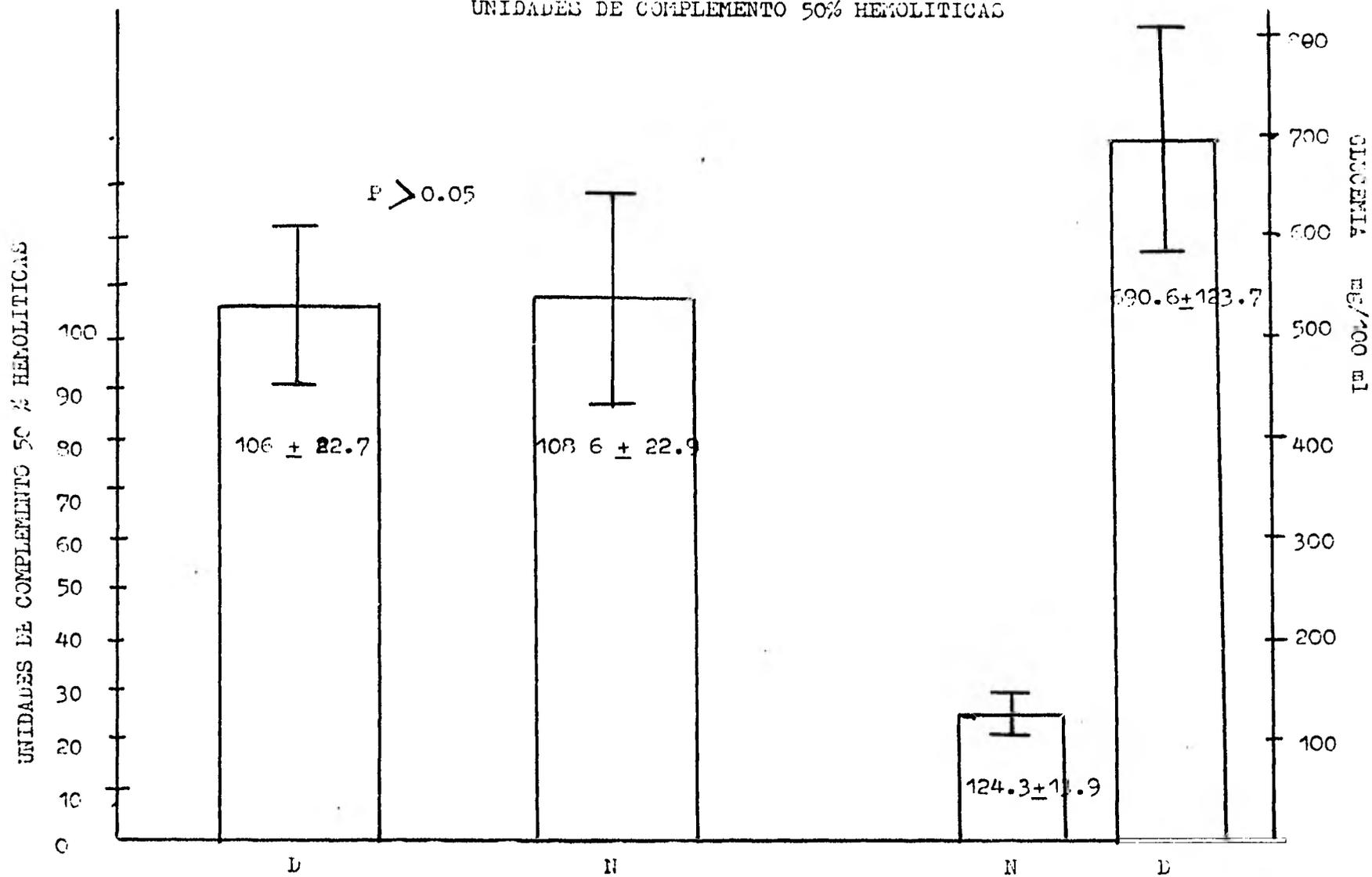


GRAFICA 6
CELULAS FORMADORAS DE PLACA 2o. EXPERIMENTO



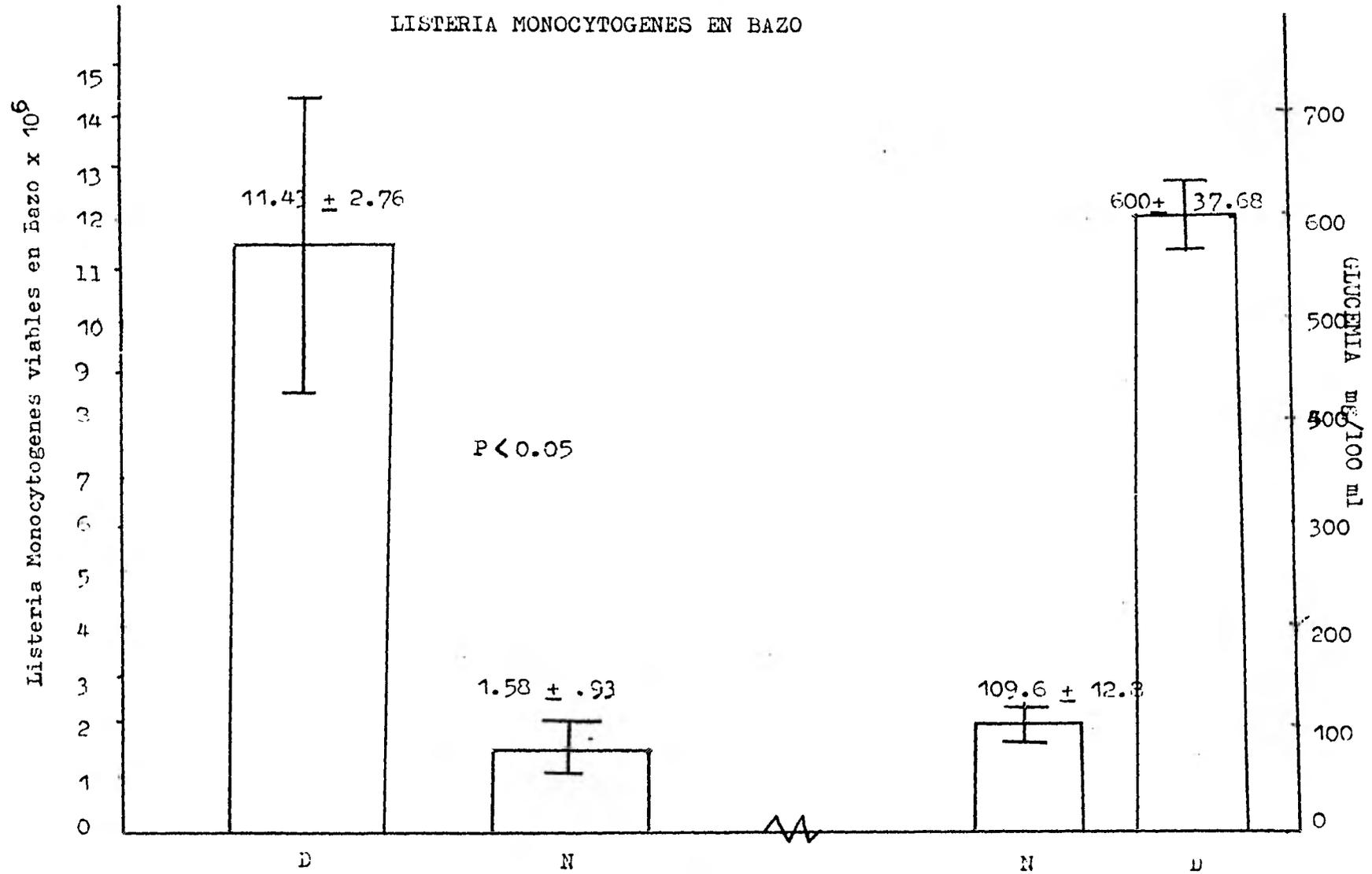
GRAFICA 7

UNIDADES DE COMPLEMENTO 50% HEMOLITICAS

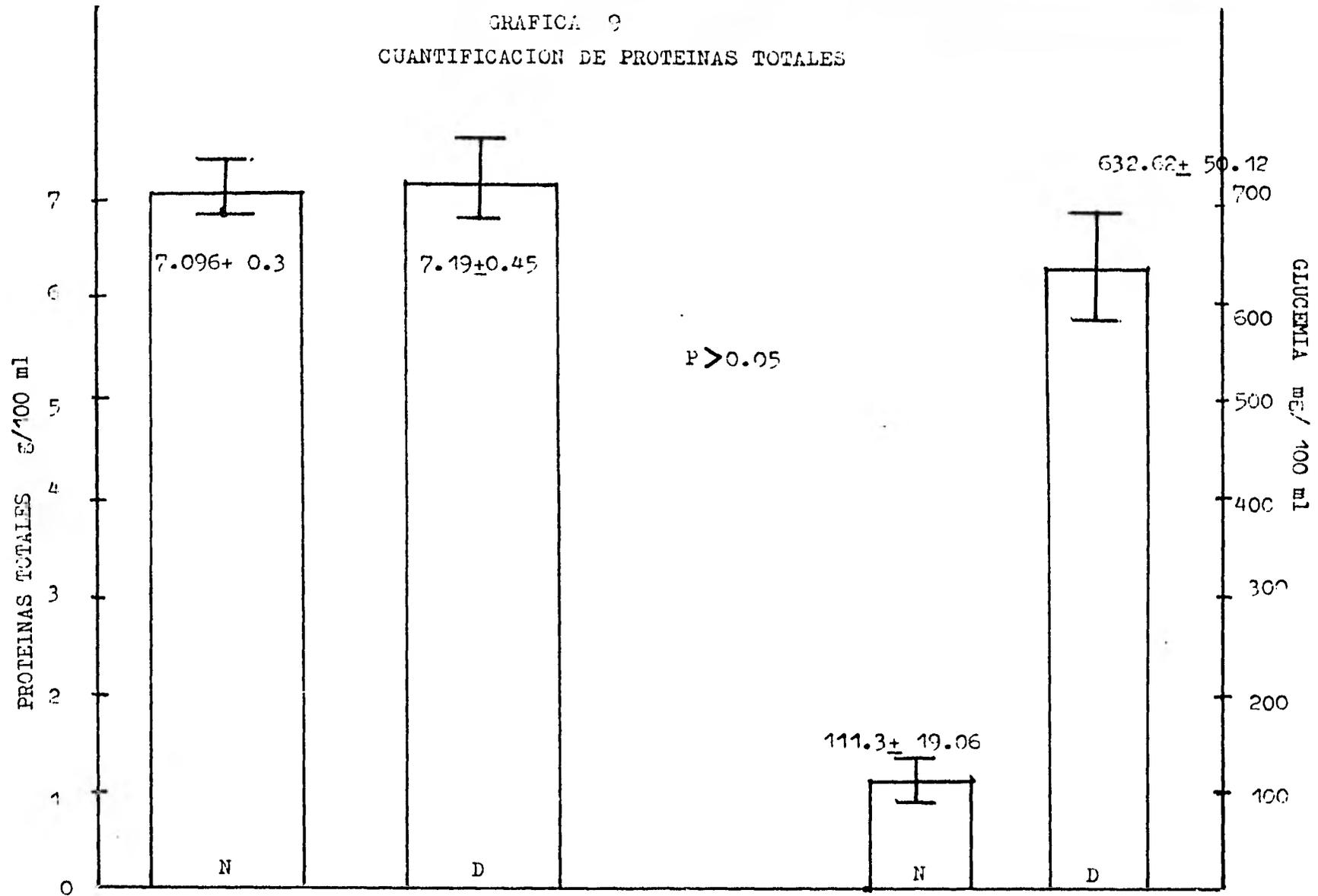


GRAFICA 2

LISTERIA MONOCYTOGENES EN BAZO



GRAFICA 9
CUANTIFICACION DE PROTEINAS TOTALES



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

I.- Los principales eventos oxidantes lisosomales han sido evaluados y resultaron estar disminuidos en las ratas hiperglucémicas en relación a los controles .

II.- La Respuesta Inmune Humoral está parcialmente deprimida en las ratas hiperglucémicas en comparación con las normales .

III.- Existe una menor proporción de Macrófagos activados en las ratas hipoinsulinémicas .

IV.- No existe diferencia apreciable en las concentraciones circulantes de complemento y de proteínas totales entre los grupos de experimentación .

V.- Las ratas con diabetes mellitus tipo I presentaron una menor capacidad para el manejo de infecciones intracelulares lo que nos indica una falta de acoplamiento de la fagocitosis , Respuesta Inmune Humoral y Respuesta Inmune Celular .

VI.- Parece existir un efecto desencadenante de la hipoinsulinemia sostenida que afecta directamente la cooperación linfocito T - B , y T - Macrófagos .

Este efecto puede explicarse en función a la distinta cantidad de receptores para insulina de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T , así el posible desacoplamiento se deba a la actividad de los linfocitos T supresores que pueden resultar ser menos sensibles a la falta de insulina , ello debido a la menor cantidad de receptores para ésta hormona .

Otra posible causa sería la disminución de la secreción de factores cooperadores entre linfocito - linfocito y macrófago - linfocito .

Dada la dinámica de comunicación entre las diversas células del Sistema Inmune es factible pensar como explicación de nuestros resultados en nuestro modelo los comentarios anteriores y no propiamente la ausencia de Insulina sobre las células células efectoras .

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Vigne J . : Le diabete , La Recherche , 115 : 1130-39 oct. (1980).
- 2.- Williams R.H. ; Textbook of endocrinology , Saunders Co. Filadelfia . 5a edición : 553 - 554 ; (1974).
- 3.- Krupp M. A. ; Chatton M. J. ; Current Medical Diagnosis and treatment , Lange medical ; Los Altos California E.U.A. . : 735 - 40 . (1981) .
- 4.- Inglis J. R. ; Histocompatibility , Immunology Today Lange Medical Public . Nueva York . E.U.A. : 1 - 20 (1980) .
- 5.- Fudenberg H.H. et al . ; Basic and Clinical Immunology Lange medical Public ; cap . : I , II , IV , X ,XX, - XXXV . (1980).
- 6.- Boucher D.W. ; Nothkins A.L. ; Virus induced diabetes-Mellitus 1.- Encephalomyocarditis virus ; J.Exp. Med. 137 : 1226 - 27 . (1973) .
- 7.- Stefan Y.M. ; Nothkins A.L. ; Virus induced diabetes in mice : a quantitative evaluation of islet cell population by immunofluorescence technic . ; Diabetology 15 - 5 nov. : 395 -401 . (1978) .
- 8.- Tager H. ; Givenb M . : Structurally abnormal insulin causing human diabetes ; Nature 281 - 5727 : - 122 - 5 , sept (1979) .

- 9.- Nothkins a.l. ; Yoon J.N. ; Beta cells damage antiin-
sulin dependent hiperglycemia in mice infected with -
Coxsackie virus B- 4 . ; J.Exp. Med. ; 148 - 4 : 1068
- 80 . (1978) .
- 10.-Austin M. E. ; Nothkins A.L. Isolation of a virus -
from the pancreas of a child with diabetic ketoacido-
sis . ; N. Engl. J. Med. ; 300 - 21 ; 1163 - 64 . .
(1979) .
- 11.-Guyton A. C. ; Tratado de fisiología médica ; 5a . -
edición . Editorial Interamericana : 973 . (1972).
- 12.-Cuatrecasas P. A. Insulin receptors ; Ann. Rev. --
Biochem . 43 : 169 (1974) .
- 13.-Garza E. I. ; Fernández R. A. ; Manifestaciones -
orales de la diabetes mellitus ; Tesis profesional
U.N.A.M. E.N.E.P. Zaragoza : 5 - 11 (1980) .
- 14.-Campbell R.I. ; Statistics for biologist . 2a edi-
ción , Cambridge . E.U.A. (1977) .
- 15.-Davis B. D. ; Dulbecco R. ; Microbiology . 2a Edi-
ción , Harper and Row , Hagerstown E.U.A. : 302 -
706 (1973) .
- 16.-Lynch J. M. : et al . ; Métodos de laboratorio , 2a.
edición . Editorial Interamericana : 225, 558- 560
(1972) .

- 17.- Manual de prácticas de postgraduados del Departamento de Inmunología de la E.N.C.B., I.P.N. : 20-25, 90-95, 104-114 (1978).
- 18.- Jerne N.M.; Plaque formation in agar by single antibody - production cells. Science : 140-145. (1963).
- 19.- Mitruka B.; Animal for medical research models for the -- study of human disease. Ad-Wiliy medical. 2a. edición; -- 279-84 (1973).
- 20.- Stossel T.P.; Evaluation of opsonic and leukocyte function with a spectrophotometric test in patients with phagocitic disorder.; Blood 42: 121-130 (1973).
- 21.- Bachner R.R.; Nathan D.G.; Quantitative Nitroblue Tetrazolium test in chronic granulomatous disease; N.Engl. J.Med. 278 : 981-986. (1968).
- 22.- Rose R.S.; Manual of Clinical immunology; American society for microbiology; Capítulo Fagocitosis (1976).
- 23.- Babior W.; et al.; Oxidative bactericidal mechanisms of polymorphonuclear leukocytes.; J.Clin. Invest. 52 ; 741-743 (1973).
- 24.- Klebanoff J.H.; Biochemical aspects of phagocytosis; Nature 192: 535-541 (1968).
- 25.- Larsen A.S.; Wiggens L.G. ; Immune response to Listeria-monocytogenes. Manual of Clinical Immunology. American Society for Microbiology. Capítulo 43: 320-323 (1977).
- 26.- Mackaness G.B.; Resistance to intra celular infection.J.. Infect. Res. 123: 439-44 (1971).

- 27.- Kent J. F. ; Precise standarization of reagent for complement fixation.; Amer. J.Trop. Med. Hyg. 12: 103 --- (1965).
- 28.- Campbell D.H.; Garvey J.S.; Method immunology. 2a edición. W.A. Benjamin inc. Nueva York.(1970).
- 29.- Bagdag B.C,; et al.; Impaired granulocyte adherence a reversible defect in host defense in patients with poorly controlled diabetes.; Diabetes 27-8.; 677-681 Enero (1978).
- 30.- Ptak W.; Czarnik Z,; Contact sensibility in Alloxan diabetic mice.; Clin. Exp. Immun. 19-2 ; 319-325 (1975).
- 31.- Mahmoud A.A.; et al.; Induced and spontaneous diabetes mellitus and suppression of cells mediated immunology response; J.Clin. Invest. 57-2; 362-367. (1976).
- 32.- Bellanti J.A.; Inmunología Clínica, editorial Interamericana, México 3a. edición: 40-61 (1980).
- 33.- Karnowski R.I; Cytochemical demonstration of hydrogen peroxide in polymorphonuclear leukocytes phagosomes; J.--Cell. Biol.64-1 ; 254-260, Enero (1965).
- 34.- Rhodes J.; Macrophage heterogeneity in receptor activity; the activation of macrophage Fc receptor function-- in vivo and in vitro.; J. Immun. 114:3 : 976-981, Marzo (1975).
- 35.- Lehninger A.L.; Biochemistry. 2a. edición, Worth inc.-- (1977).
- 36.- Nichols W.K.; Spellman J.B.; Immune responses of diabetic animals. Comparison of genetically obese and streptozocin diabetic mices.; Diabetology. 14-5; 343-349---

(1978).

37.- Pierpaoli W.; Fabrisa. Celular interations in immune response. 2a. edición, Buffalo Nueva York (1970).

38.- Ptak W.; Rewicka M.; Development of specific supressor -- cells in hypoinsulineamic mice.; Nature. 283-5743 : 199-200 (1980).