

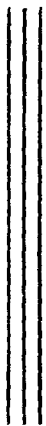
24.2



Universidad Nacional Autónoma de México

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"

**VALORACION DE LA RESPUESTA
INMUNE CELULAR EN RATAS CON
DIABETES MELLITUS EXPERIMEN-
TALMENTE INDUCIDA CON ALOXANA**



Tesis Profesional

Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a n :

Francisco Javier Andrés López

Víctor Manuel Deloya Parra



México, D. F.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1988



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 está 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.

I N D I C E

	PAGINA
Introducción	1
Planteamiento del Problema	14
Objetivos e Hipótesis	16
Material y Equipo	17
Preparación de soluciones	20
Metodología	21
Resultados	32
Análisis de Resultados	44
Conclusiones	45
Bibliografía	46

I N T R O D U C C I O N

El dato más antiguo en la historia de la Diabetes, se encuentra en el papiro de Ebers (1500 A.C.), donde se describe -- una enfermedad en la cual los enfermos adelgazan, tienen hambre continua, orinan y se sienten atormentados por una gran sed. (1)

En el año 70 de nuestra era, el médico griego Areteo, utiliza el nombre de "DIABETES" para describir una enfermedad que vacía el organismo como un sifón y sus características son iguales a las descritas en el papiro de Ebers (la palabra diabetes en griego significa sifón). En 1679, el médico inglés Thomas - Willis determinó que la orina de algunos enfermos con diabetes contenía azúcar y denominó a la enfermedad como Diabetes Mellitus (en latín mellitus significa miel), para diferenciarla de - la Diabetes Insípida, donde hay gran emisión de orina sin presencia de azúcar. (25)

En 1869, Langerhans descubre los islotes del páncreas y en 1870, el francés Claude Bernard descubre la función glucogénica del hígado y la hiperglucemia del diabético. (24)

En 1889, los fisiólogos Von Mering y Minkowsky extirparon el páncreas a un perro produciéndole una diabetes experimental. Se dedujo entonces que el páncreas producía una substancia indispensable para el aprovechamiento de los azúcares. Basados -

en estos estudios, Charles Best y Frederick G. Banting, trataron a perros con diabetes experimental con extractos obtenidos de páncreas y observaron que su estado de salud mejoró notablemente. (17)

Estudios posteriores, demostraron que las células beta de los islotes de Langerhans del páncreas producían la sustancia indispensable para el aprovechamiento de los azúcares y la cual denominaron insulina, y no fué hasta 1953 cuando Sanger y colaboradores establecen la estructura de la insulina, la cual está formada por 51 aminoácidos, agrupados en dos cadenas unidas por dos puentes de azufre. (1)

Los principales efectos de la insulina son:

a) Facilita la entrada de la glucosa al interior de la célula.

b) Promueve la formación de glucógeno y la oxidación de --carbohidratos en músculo e hígado.

c) Reprime a las principales enzimas gluconeogénicas: piruvato carboxilasa, fructosa 1,6-difosfatasa y glucosa-6-fosfatasa, reduciendo así la formación de glucosa a partir de lípidos y proteínas.

d) Aumenta la utilización de glucosa, por su función inductora sobre la glucocinasa (hígado).

e) Estimula la vía HMP (hexosa monofosfato) y la lipogénesis.

El mecanismo de acción de la insulina no se ha aclarado -- completamente. La hipótesis más aceptada en la actualidad, es de que la insulina se une a receptores específicos de la membrana de las células insulino-dependientes activando la liberación de péptidos bioactivos por un mecanismo proteolítico, produciendo la abertura para el paso de la glucosa al interior de la célula. (21)

En la actualidad la insulina que se encuentra en el mercado proviene del páncreas de puerco y de ternera. Estudios recientes han permitido obtener por síntesis bacteriana insulina humana; siendo su industrialización y utilización una posibilidad en un futuro cercano. (25)

La Diabetes mellitus se define como una serie de trastornos metabólicos originados por factores genéticos y ambientales, caracterizados en sus formas desarrolladas por hiperglucemia, - glucosuria, polifagia, poliuria y un síndrome vascular que adopta la forma de arterioesclerosis. (4)

Esta se puede clasificar en 2 grupos:

Tipo I.- Insulino-dependientes.

Tipo II.- Insulino-independientes.

Tipo I.- Se presenta comúnmente en jóvenes (diabetes juvenil). La insulina circulante está ausente, el glucagón está -- elevado, las células beta del páncreas no responden a estímulos

insulinogénicos y por lo tanto se requiere insulina exógena para corregir la glucemia y prevenir la cetosis que es común en este tipo de diabetes. (2)

Ciertos procesos inmunológicos se asocian a la aparición de la diabetes juvenil, existe una mayor incidencia en sujetos portadores de grupos de histocompatibilidad HLA 8, D 15. También existen evidencias de que algunas infecciones víricas como la causada por el virus coxsakie B-4, ataca células beta del páncreas de personas genéticamente susceptibles. (4)

Tipo II.- Se presenta predominantemente en los adultos, se asocia muy a menudo con personas obesas, su comienzo es lento e impreciso, hay evidencias de predisposición genética (25), así como un posible defecto a nivel de receptores para la insulina en la célula (2) o bien que la insulina producida sea defectuosa e incapaz de unirse a su receptor (23). Este tipo de diabetes sólo requiere para su tratamiento un régimen alimenticio adecuado y fármacos hipoglucemiantes. (1)

La falta de insulina en el organismo provoca una disminución en la utilización de la glucosa por los tejidos, principalmente músculo y tejido adiposo, apareciendo así el estado hiperglucémico. La carencia de glucosa en el interior de las células de los tejidos, provoca que se generen estímulos nerviosos y hormonales para la liberación del glucagón que aumenta la gluco~~g~~ogénolisis en el hígado. Como otra alternativa, el diabético

utiliza su reserva de grasas (lipólisis) para generar glucosa, pero de nada le sirve, ya que las células siguen careciendo de glucosa en su interior, por lo que el organismo se ve forzado a catabolizar las proteínas actuando inicialmente en tejidos insulinodependientes, como lo es el músculo. Los ácidos aminados - producidos por la proteólisis tisular, difunden a la sangre y - llegan al hígado, ahí sufren desaminación oxidativa y sus cade- nas carbonadas contribuyen a la formación de nueva glucosa (glu- coneogénesis), aumentando aún más el estado hiperglucémico. La concentración de la glucosa sanguínea excede el umbral renal, - por lo que se elimina por la orina para mantener el equilibrio en la concentración de glucosa sanguínea.

La hiperglucemia y la glucosuria que se asocian con dismi- nución de glucógeno hepático parecen estimular la movilización de grasa en forma de ácidos grasos y la formación de cuerpos - cetónicos en el hígado. Debido al aumento de cuerpos cetónicos y a su naturaleza ácida es necesario que el riñón los elimine - combinados con bases. En diabetes mal reguladas el riñón pier- de glucosa, cuerpos cetónicos, bases y agua; por lo que el esta- do clínico del paciente se agrava y puede llegar al grado de -- ocasionar el coma diabético, el cual se cree es debido al efec- to directo de la acidosis y deshidratación sobre los sistemas nervioso central y vascular. Una característica muy común en - diabéticos declarados es su susceptibilidad a infecciones recu- rrentes por microorganismos. (21)

La inmunidad mediada por células juega un papel importante

en el control y eliminación de los microorganismos. La primera manifestación del proceso inmunitario es la fagocitosis del antígeno, la síntesis de enzimas lisosomales y la modificación -- del antígeno, eventos intracelulares de las células fagocíticas que requieren energía de la oxidación exhaustiva de glucosa por las vías de la hexosa monofosfato y la glucólisis. (17)

El siguiente evento dentro del proceso inmunitario es la - activación de las células linfoides T y B, las primeras encarga das de efectuar la respuesta inmune celular y las segundas de - la ejecución de la respuesta inmune humoral. (3)

Al proceso mediante el cual son eliminados los microorga-- nismos se le denomina fagocitosis, la cual se lleva a cabo por dos tipos de células:

a) Los polimorfonucleares, que son células circulantes que migran a los sitios de inflamación y están relacionados princi palmente con la destrucción de los microorganismos de tipo ex-- tracelular que al ser ingeridos, por lo general perecen.

b) Monocitos y macrófagos, estas células están relaciona-- das con el control de microorganismos capaces de sobrevivir in-- tracelularmente y contra los cuales los polimorfonucleares son ineficaces. Los monocitos son formas inmaduras de macrófagos - que se encuentran en circulación y cuando la abandonan, maduran y se convierten en macrófagos en los tejidos (histiocitos). Es

tas células se encuentran distribuidas ampliamente en los órganos del cuerpo, integran el sistema retículo endotelial.

La fagocitosis comprende varias fases:

INGESTION.- Al ponerse en contacto con las bacterias, los pseudópodos del macrófago se extienden fusionándose sobre el lado distal del material que va a ser ingerido; la partícula queda englobada en una vacuola fagocítica o fagosoma.

El fagosoma se separa de la periferia celular por gemación y se desplaza hacia el centro, al parecer por mediación de microtúbulos.

DEGRANULACION.- Una vez que se forma el fagosoma los gránulos de la célula fagocitaria adquieren una gran movilidad, se aproximan y vierten en él su contenido enzimático.

MUERTE Y DIGESTION.- Los microorganismos fagocitados son atacados por una serie de procesos enzimáticos que impiden su reproducción, alteran su metabolismo y producen su muerte degradándolos a partículas pequeñas. Entre los principales tenemos:

1) Sistema Mieloperoxidasa - Superóxido- H_2O_2 -Halógeno.

Constituye el mecanismo de mayor poder bactericida en la fagocitosis humana contra bacterias, hongos, virus y micoplasma.

La mieloperoxidasa, es una enzima que cataliza la oxidación de una serie de substratos donadores de electrones o radicales de hidrógeno por la reacción del peróxido de hidrógeno. Esta se encuentra contenida en los gránulos de los polimorfonucleares y de los monocitos, ya que en los macrófagos maduros no existe y se cree que es sustituida por la catalasa. (5)

La interacción entre el H_2O_2 y la mieloperoxidasa da lugar a la formación de un complejo con gran actividad oxidativa, que obra sobre distintos halógenos, dando lugar a la producción de sustancias de gran poder bactericida. Se producen compuestos halogenados tóxicos a base de cloro, yodo y bromo, siendo los yodados los más activos.

2) Lisozima, es una proteína de bajo peso molecular que presenta acción bactericida en virtud de su capacidad para hidrolizar algunos componentes de la membrana bacteriana, tales como los mucopolisacáridos y los mucopéptidos.

3) Otras enzimas tales como: arilsulfatasa, elastasa, fosfatasa ácida, B-glucoronidasa y lipasa, cooperan en la degradación de los microorganismos. (5, 20, 3)

Las células de mayor significado en la inmunidad son los linfocitos. Estos provienen de la médula ósea a partir de una célula pluripotencial que se diferencia en una célula unipotencial llamada linfoblasto, que por influjos hormonales da origen

a dos grupos distintos de células. Uno de estos grupos son los linfocitos T, encargados de la inmunidad celular y el otro grupo son los linfocitos B, que al madurar y recibir un estímulo adecuado se transforman en células plasmáticas responsables de la producción de anticuerpos (inmunidad humoral). (20)

Los linfocitos T son células que derivan del linfoblasto de la médula ósea que por influjo de la timopoyetina, hormona producida por las células epiteliales del timo, transforma la constitución protéica de la membrana celular de éstos y desencadena la aparición de grupos antigénicos especiales que los llevan a diferenciar de los linfocitos B; siendo éstos los responsables de que los linfocitos T adquieran funciones específicas. Las terminaciones antigénicas son variadas y se designan con la letra T seguida de un número, actualmente se conocen del T_1 al T_{11} y pueden detectarse por anticuerpos monoclonales, el OKCT₁ para el T_1 , el OKCT₂ para el T_2 y así sucesivamente. (5)

Las funciones efectoras y reguladoras, mediadas por las células T, representan las capacidades de sus poblaciones que se caracterizan por diferencias en sus fenotipos. Con base en esto, las células T de la sangre periférica se pueden dividir en 2 poblaciones. El 65% de las células T en sangre periférica son T_4 positivas y el 35% restante son T_8 positivas. Ambas son T_1 , T_3 y T_{11} positivas. Dentro de la población T_4 positivas existen células efectoras para los siguientes procesos: para hipersensibilidad tardía, ayudan a que los linfocitos B se con-

viertan en células plasmáticas que son productoras de inmunoglobulinas, promueven el desarrollo de células citotóxicas e inducen la generación de células T supresoras activas.

Las células T₈ positivas incluyen células T efectoras citotóxicas y células supresoras activas que pueden inhibir la - - hipersensibilidad tardía y la producción de inmunoglobulina. Estas dos poblaciones de células T pueden fraccionarse en subpoblaciones que difieren en otras moléculas de superficie celular y en sus características funcionales.

Un factor de gran importancia en la maduración y diferenciación de los linfocitos T, es su capacidad para reconocer los productos originados a partir de los genes del denominado complejo principal de histocompatibilidad (CPH). El reconocimiento de los productos del CPH ocurre durante la maduración de los linfocitos T. La activación del linfocito T requiere como paso inicial la presencia de un antígeno específico, además de interactuar con células accesorias las cuales tienen dos funciones, primero procesan y presentan al antígeno y los productos - del gen CPH en forma adecuada para que puedan ser reconocidos - por el receptor de la célula T. Segundo, sintetizan y secretan materiales solubles para que prosiga la activación completa de la célula T. Algunos ejemplos de estas células accesorias son los macrófagos, las dendríticas, las de Kupfeer, las de Langerhans, las células B y T activadas y en algunos casos las endoteliales. Entre las sustancias secretadas por estas células

tenemos a la interleucina-I, que proporciona una segunda señal que junto con la primera representada por el antígeno y las moléculas CPH es suficiente para activar las células T derivadas del timo. (5)

Una vez que las células T han sido activadas liberan las linfocinas que son productos solubles con una función específica, las más importantes son:

LINFOCINA	ACCION
Factor inhibidor de la migración de macrófagos.	Inhíbe la migración al azar de los macrófagos.
Factor inhibidor de leucocitos.	Inhíbe la migración al azar de los neutrófilos.
Factor activador de macrófagos.	Mejora la actividad citolítica de los macrófagos.
Interferón gamma.	Tiene las mismas funciones que el activador de los macrófagos.
Factor estimulador de colonias.	Apoya el crecimiento y diferenciación de los monocitos.

LINFOCINA	ACCION
Factor activador de Fibro-- blastos.	Estimula la proliferación de los fibroblastos.
Interleucina - 2	Estimula el crecimiento de - las células T activadas. An tes llamado factor de creci- miento de la célula T.
Interleucina - 3	Parecida al factor estimula- dor de colonias.
Factor de crecimiento de la célula B.	Estimula la proliferación y diferenciación de una subpo- blación de células B.

Como ya se mencionó, la fagocitosis es la primera manifes-
tación del proceso inmunitario y una forma de evaluar la res- -
puesta inmune consiste en medir la capacidad fagocítica de es--
tas células en un modelo experimental, utilizando un grupo de ra
tas normales y un grupo de ratas diabéticas, retándolos con una
bacteria como la Lysteria monocitógenes que es de tipo intrace
lular.

Lysteria monocitógenes.- Bacilo corto Gram positivo, móvil
microaerofílico, no produce esporas, sin cápsula, de 0.5 a 2 mi
cras de diámetro y que puede adoptar formas filamentosas. Una -

particularidad es que crece a temperaturas bajas entre 4 a 10°C en pH alcalinos y resiste concentraciones altas de cloruro de sodio (20%). Posee buena capacidad antigénica, produce una hemolisina soluble con propiedades similares a la estreptolisina O, produce un factor (MPA) capaz de producir monocitosis en el conejo, fué descubierto por Stanley en 1949, se puede extraer con cloroformo ya que es de naturaleza lipóide, no es antigénico, aunque pueden funcionar como adyuvante. Produce una enzima que es considerada como factor de virulencia (superóxido dismutasa), que inhibe la acción del ión superóxido, indispensable en el complejo bactericida mieloperoxidasa-haluro- H_2O_2 (5, 24). La enfermedad causada por este microorganismo se presenta en 26 especies de mamíferos y aves, incluyendo a los humanos.

La listeriosis puede producir:

- 1.- Meningoencefalitis.
- 2.- Septicemia.
- 3.- Infecciones localizadas (en órganos internos y/o cutáneas).

El índice de mortalidad de esta enfermedad se aproxima al 100% en los animales infectados, no se conocen métodos de inmunización profiláctica. (15, 1)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Existen datos estadísticos que demuestran que en México, una de las enfermedades no infecciosas con mayor número de muertes, es la Diabetes mellitus. Dentro del total de muertes de pacientes diabéticos, el 60% muere por infecciones recurrentes causadas principalmente por bacterias. (6)

Las células fagocíticas son las células del sistema inmune más importantes en el control de las infecciones bacterianas, por lo que es conveniente valorar su capacidad fagocítica ante estos agentes patógenos.

La energía para la movilidad de las células fagocíticas -- así como para llevar a cabo la ingestión de bacterias en el -- proceso de la fagocitosis dependen de la glucólisis (5). La -- energía para los eventos celulares subsiguientes, que involu-- cran el consumo de oxígeno proviene de la estimulación de la ru-- ta metabólica de la hexosamonofosfato [Fig. 1] (10). Por lo -- tanto, podemos proponer que la falta de glucosa en el interior de las células fagocíticas es uno de los factores que pueden -- disminuir la eficiencia de la respuesta inmune celular y esto -- puede ser la causa de la gran susceptibilidad a infecciones bac-- terianas y micóticas que presentan los diabéticos.

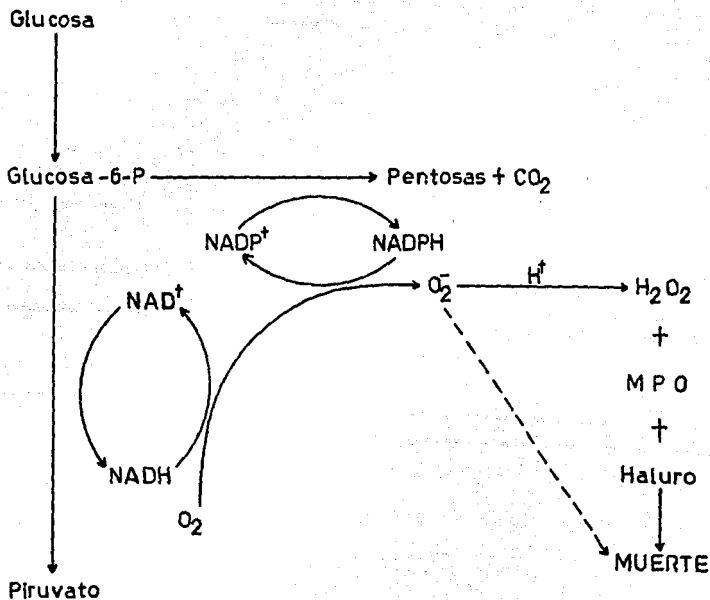


Figura 1.- Metabolismo Energético de las células fagocíticas.

O B J E T I V O S

1. Demostrar que el sistema fagocítico se encuentra disminuído, debido a un trastorno metabólico ocasionado por la - - - hiperglicemia.
2. Determinar a que nivel se encuentra la falla en el proceso de la fagocitosis.

HIPOTESIS DEL TRABAJO

Se sabe que la ausencia de insulina, provoca una falla en el transporte de la glucosa, por lo que se espera que las cél las fagocíticas y todo el sistema inmune celular, esté disminuído en su eficiencia.

MATERIAL Y EQUIPO

EQUIPO:

- Estufa de temperatura controlada 50X60X60, marca Riessa.
- Baño María de temperatura controlada, marca Riessa-VM.
- Espectrofotómetro Bauch and Lomb, modelo Espectronic 20.
- Centrífuga clínica de 8 camisas, marca SOL BAT, modelo J-12
- Autoclave de 60 X 25 cm.
- Refrigerador de 12 pulgadas.
- Balanza analítica Mettler H 80.
- Balanza granataria marca Ohaus.
- Microscopio ZEISS.

MATERIAL:

- Cajas de Petri 15X150 mm. marca Pyrex.
- Tubos de ensaye 13X100 marca Pyrex.
- Matraces Erlenmeyer cap. 1 lt. marca Pyrex.
- Matraces Erlenmeyer cap. 500 ml. marca Pyrex.
- Matraces Erlenmeyer cap. 250 ml. " "
- Matraces aforados cap. 1 lt. " "
- Matraces aforados cap. 250 ml. " "
- Matraz aforado cap. 100 ml. " "
- Jeringas desechables cap. 10 ml.
- Jeringas desechables cap. 1 ml.
- Agujas desechables No. 20

- Mecheros Bunsen.
- Mecheros Fisher.
- Pipetas graduadas 0.1 ml. marca Pyrex.
- Pipetas graduadas 5 ml. " "
- Pipetas graduadas 1 ml. " "
- Vasos de precipitados 500 ml. marca Pyrex.
- Vasos de precipitados 100 ml. marca Pyrex.
- Espátulas de acero inoxidable.
- Estuche de disección Estainless D-12.
- Jaulas 40 X 60 cm.

MATERIAL BIOLÓGICO

- 1.- Cepa de Lysteria monocitógenes.
- 2.- Ratas macho, cepa Wistar (CII-ZV) cuya edad oscila entre 4 y 6 meses, peso aproximado entre 280 y 320 gramos.

R E A C T I V O S

1.- Agar soya tripticasa	454 gr.	marca	Bioxón
2.- Caldo soya tripticasa	200 gr.	"	Bioxón
3.- Alloxan G. R.	25 gr.	"	Sigma
4.- Cloruro de Sodio	250 gr.	"	Merk
5.- Eter etílico	1 lt.	"	Sigma
6.- Citrato de Sodio	10 gr.	"	Baker
7.- Peróxido de hidrógeno	10 ml.	"	Sigma
8.- Ortotoluidina	100 gr.	"	Merk
9.- Glucosa	10 gr.	"	Merk
10.- Acido acético	100 ml.	"	Sigma
11.- Cristal violeta	10 gr.	"	Sigma
12.- Safranina-0	10 gr.	"	Sigma
13.- Lugol	10 ml.	"	Sigma
14.- Alcohol	2 lt.	"	Sigma
15.- Cloruro de Bario	5 gr.	"	Merk
16.- Acido sulfúrico concentrado	100 ml.	"	Sigma

PREPARACION DE SOLUCIONES

Solución salina isotónica.- Se disuelven 8.5 gr. de cloruro de sodio en 1 lt. de agua destilada.

Aloxana.- Se prepara disolviendo 322 mg. de aloxana en 25 ml. de solución salina isotónica estéril (12.9 mg./ml.) se protege de la luz y se conserva en refrigeración.

Solución de citratos.- Disolver 0.04 gr. de citrato de sodio en 100 ml. de solución salina isotónica.

Preparación de agar soya tripticasa.- Se suspenden 40 gr. en un litro de agua destilada, se mezcla bien, se calienta agitando frecuentemente y se hierve durante 1 minuto, esterilizar en autoclave a 121°C (15 lbs. de presión) durante 15 minutos y distribuir en cajas de Petri.

Preparación del caldo soya tripticasa.- Se disuelven 30 gr. en un litro de agua destilada, se mezcla bien, se calienta agitando y se hierve durante 1 minuto. Distribuir en tubos de 13X100 y esterilizar.

M E T O D O L O G I A

DIAGRAMA GENERAL

RATAS GRUPO I

RATAS GRUPO II

Inducción de -
la diabetes.

DETERMINACION DE LA GLUCOSA POR EL
METODO DE LA ORTOTOLUIDINA

INOCULACION DE UNA DOSIS SUBLETAL
DE Lysteria monocitógenes

OBTENCION DE CELULAS FAGOCITICAS
DE PERITONEO Y BAZO

CUANTIFICACION DE COLONIAS

ANALISIS ESTADISTICO

INDUCCION DE DIABETES MELLITUS (16)

Se forman dos grupos de 8 ratas cada uno, se pesan y se --
etiquetan para evitar confusión. Al grupo I (control) se le --
inocula por la vena caudal de pene 1 ml. de solución salina iso-
tónica estéril y al grupo II se le inocula una solución de alo-
xana en una relación de 43 mg./kg. de peso, para provocar la -
hiperglucemia en 48 horas.

CUANTIFICACION DE GLUCOSA (8)

Fundamento: La glucosa reacciona con la o-toluidina en so-
lución con ácido acético caliente produciéndose una sustancia
de color verde-azúl, la intensidad de color es medida en un es-
pectrofotómetro a 630 nm.

METODO PARA LA CUANTIFICACION DE GLUCOSA

Anestesiarse al animal en una cámara de éter, obtener por --
punción cardíaca 2 ml. de sangre en un tubo de ensaye de 13X100.
Dejar coagular la sangre y centrifugar a 5000 rpm. durante 5 mi-
nutos. Extraer el suero con una pipeta Pasteur y ponerlo en --
otro tubo, tomar 0.1 ml. de suero y adicionarle 3 ml. de solu-
ción de o-toluidina.

En otro tubo colocar 0.1 ml. de solución patrón de concentración conocida de 100 mg./dl. agregar 3 ml. de solución de o-toluidina, este tubo se rotula como patrón, preparando también un blanco de reactivo. Colocar los tubos perfectamente rotulados en un baño de agua a ebullición durante 10 minutos, enfriar y leer las absorciones del patrón y de los problemas contra el blanco de reactivo, se leé a 630 nm.

Cálculo de la concentración de glucosa.

$$\text{Glucosa} = \frac{\text{Abs. del problema} \times 100}{\text{Abs. del patrón}}$$

Los valores normales de la glucemia en las ratas cepa Wistar CII-ZV es de 100 a 130 mg./dl.

DETERMINACION DE DL_{50} SEGUN REED Y MUENCH (14)

1.- Hacer una suspensión de 10^9 bacterias de Lysteria monocitógenes / ml. ajustar por nefelometría.

2.- Tomar 4 lotes de 4 ratas cada uno e inocularles 1 ml. de la suspensión anterior procediendo de la siguiente manera:

lote	Dilución
1	Suspensión concentrada.
2	1:10
3	1:100
4	1:1000

3.- Calcular la proporción de la mortalidad para cada lote.

4.- Determinar la dosis entre las cuales se encuentra aquella que mata al 50% de individuos.

5.- La DL_{50} se calcula de la siguiente manera:

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

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

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

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

$$\log DL_{50} = A - (DP \times B)$$

A: Log. negativo de la dilución inmediata superior que mata al 50% de las ratas.

B: Log. del factor de dilución.

RESISTENCIA BACTERIANA (13)

FUNDAMENTO: El número de bacterias cuantificadas después del rompimiento de las células fagocíticas por cambios bruscos de temperatura, nos indicará la eficiencia de éstas en el control de una infección bacteriana.

NOTA: TODO EL PROCESO SE REALIZA EN CONDICIONES DE ESTERILIDAD.

PASO I

Al grupo de ratas normales y diabéticas se les inocula por la vena caudal del pene un mililitro de una suspensión de 1×10^7 bacterias.

PASO II

Las ratas son sacrificadas 48 horas después de la inoculación de las bacterias.

Método para la obtención de macrófagos peritoneales y conteo bacteriano.

1.- Inocular 5 ml. de solución salina de citratos fría en la cavidad peritoneal de la rata. Agitar en forma homogénea todas las ratas, rotular problemas y normales.

2.- Obtener 3 ml. de exudado de la cavidad peritoneal.

3.- Centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos, eliminar el sobrenadante y resuspender el botón celular en 3 ml. de solución salina.

4.- Centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos; se elimina el sobrenadante y se procede a congelar y descongelar el botón celular sucesivamente por 5 ocasiones.

5.- Hacer diluciones 1:10 y 1:100 sembrar en cajas de Petri con agar soya tripticasa, rotulando cada una de las diluciones.

Método para la obtención de células fagocíticas de bazo y conteo bacteriano.

1.- Extraer el bazo y homogenizarlo en 6 ml. de solución salina, pasarlo a un tubo de ensayo 13X100.

2.- Centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos, se elimina el sobrenadante y se resuspende el botón celular en 5 ml. de solución salina.

3.- Se centrifuga a 1500 rpm durante 5 minutos, del sobrenadante se toma 0.1 ml.

4.- Se repite paso 2 y 3 hasta completar cuatro lavadas^{*}, del sobrenadante de la última lavada se toma 0.1 ml., se siembra y se rotula como cuarta lavada del bazo.

5.- Se elimina el sobrenadante de la cuarta lavada y se procede a congelar y descongelar sucesivamente por 5 ocasiones, resuspender a 3 mililitros de solución salina.

6.- Hacer diluciones 1:100 y 1:1000, sembrar 0.1 ml. de la dilución en cajas de Petri con agar soya tripticasa rotulando cada una de las diluciones.

7.- Se incuban por 48 horas a 37°C las placas y se hace la cuenta de colonias.

No. total de bacterias en bazo = $\frac{\text{No. de colonias} \times \text{Dil.} \times 3 \text{ ml.}}{0.1 \text{ ml.}}$

^{*} El lavado de las células fagocíticas del bazo antes del rompimiento, se llevó a cabo con la finalidad de eliminar las bacterias que se encontraban fuera de los fagocitos.

ANALISIS DE VARIANZA (26)

La técnica de Fisher conocida como análisis de varianza -- (ANADEVA), es una herramienta útil en la investigación cuando se aplica la observación y la experimentación.

La técnica consiste en separar de la variación total observada las causas o factores parciales, siguiendo los siguientes pasos:

- a) Clasificar o separar las causas parciales de variación.
- b) Calcular los grados de libertad (gl) para cada factor o causa parcial de variación.
- c) Calcular la suma de los cuadrados de las desviaciones de las observaciones (SC) con respecto a la media, para cada una de las causas de variación.
- d) Calcular la varianza o cuadrado medio (CM) para cada -- factor de variación.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Media cuadrática	F calculada
---------------------	--------------------	-------------------	------------------	-------------

Estado T

Hiperglucémico.	$i-1$	$\frac{y_i^2}{i} - \frac{y_{..}^2}{N}$	$\frac{SC}{g.l.} T = A$	$\frac{A}{B} = F$
-----------------	-------	--	-------------------------	-------------------

E

Otras Causas	$N-i$	$\sum_{i=1}^i \sum_{j=1}^j y_{ij}^2 - \frac{y_{i.}^2}{j}$	$\frac{SC}{g.l.} E = B$	
--------------	-------	---	-------------------------	--

Si $F_{cal.} > F_{tab.}$

La fuente de variación es debida al estado hiperglucémico de las ratas.

Si $F_{cal.} < F_{tab.}$

La fuente de variación es debido a otras causas.

RESULTADOS

TABLA NO. 1
 DETERMINACION DE LA DOSIS LETAL MEDIA
 (Con Lysteria monocit6genes reci6n cosechada)

GRUPO	NO. DE RATAS	DOSIS	MORTALIDAD (48 hrs)	% DE MORTALI DAD.
I	4	1×10^9 bact/ml.	4	100
II	4	1×10^8 bact/ml.	2	50
III	4	1×10^7 bact/ml.	0	0
IV	4	1×10^6 bact/ml.	0	0

La d6sis letal 50 es la que mata al 50% de los animales.

$$DL_{50} = 10^8 \text{ bact/ml.}$$

TABLA NO. 2
CUANTIFICACION DE GLUCOSA
POR EL METODO DE LA ORTO-TOLUIDINA
(en el grupo de ratas control)

NORMALES

RATAS	CONC. mg/100 ml.
1	118
2	100
3	100
4	126
5	127
6	166
7	173
8	133

$$\bar{X} = 130.4 \pm 27.05 \text{ mg/100 ml.}$$

TABLA NO. 3
 CUANTIFICACION DE GLUCOSA
 POR EL METODO DE LA ORTO-TOLUIDINA
 (en el grupo de ratas tratadas con aloxana)

RATAS	CONC. mg/100 ml.
1	818
2	393
3	681
4	500
5	545
6	400
7	472
8	800

$$\bar{X} = 576.1 \pm 169.8 \text{ mg/100 ml.}$$

TABLA NO. 4

Cuantificación de colonias Lysteria monocitógenes
en peritoneo después del rompimiento de los macró
fagos por cambios bruscos de temperatura.

RATAS CONTROL

RATA	SUSPENSION CONCENTRADA	DILUCION 1:10	DILUCION 1:100
N ₁			
N ₂			
N ₃			
N ₄	(NO SE OBTUVO CRECIMIENTO BACTERIANO)		
N ₅			
N ₆			
N ₇			
N ₈			

RATAS DIABETICAS

D ₁			
D ₂			
D ₃			
D ₄	(NO SE OBTUVO CRECIMIENTO BACTERIANO)		
D ₅			
D ₆			
D ₇			
D ₈			

TABLA NO. 5

Cuantificación de colonias de Lysteria monocitógenas, antes del rompimiento de las células fagocíticas del bazo.

(Después de la 4a. lavada)

RATAS NORMALES

RATA	SUSPENSION CONCENTRADA	DILUCION 1:10 # COLONIAS	NO. TOTAL DE BACTERIAS
N ₂	15	0	450 bact./bazo
N ₄	35	1	1050 "
N ₆	25	0	750 "
N ₈	48	3	1440 "

$$\bar{X} = 922.5 \pm 423.1 \text{ bact./bazo}$$

* No. total de bacterias = $\frac{\text{No. de colonias} \times \text{Dil.} \times 3 \text{ ml.}}{0.1 \text{ ml.}}$

* Para obtener el número total de bacterias en bazo se tomó en cuenta que una colonia representa el crecimiento de una bacteria.

TABLA NO. 6

Cuantificación de colonias de Lysteria monocitógenas, antes del rompimiento de las células fagocíticas del bazo.

(Después de la 4a. lavada)

RATAS DIABETICAS

RATA	SUSPENSION CONCENTRADA	DILUCCION		NO. TOTAL DE BACTERIAS
		1:10	# COLONIAS	
D ₂	incontables	309		9.27 x 10 ⁴ bact./bazo
D ₄	incontables	230		6.90 x 10 ⁴ "
D ₆	incontables	175		5.25 x 10 ⁴ "
D ₈	incontables	250		7.50 x 10 ⁴ "

$$\bar{X} = 7.2 \times 10^4 \pm 1.66 \times 10^4 \text{ bact./bazo}$$

TABLA NO. 7

Cuantificación de colonias Lysteria monocitóge-
nes después del rompimiento de las células fago
cíticas del bazo, del grupo de ratas control.

RATA	SUSPENSION CONCENTRADA # COLONIAS	1:100 # COLONIAS	1:1000 # COLONIAS	NO. TOTAL DE BACTE- RIAS EN BAZO.
N ₁	incontables	199	15	45 x 10 ⁴ bact./bazo
N ₂	"	37	2	6 x 10 ⁴ "
N ₃	"	215	25	75 x 10 ⁴ "
N ₄	"	200	60	180 x 10 ⁴ "
N ₅	"	230	27	81 x 10 ⁴ "
N ₆	"	143	12	36 x 10 ⁴ "
N ₇	"	300	14	42 x 10 ⁴ "
N ₈	"	224	23	69 x 10 ⁴ "

$$\bar{x} = 6.67 \times 10^5 \pm 5.18 \times 10^5 \text{ bact./bazo}$$

TABLA NO. 8

Cuantificación de colonias de Lysteria monocitóge-
nes después del rompimiento de las células fagocí-
ticas del bazo, del grupo de ratas diabéticas.

RATA	SUSPENSION CONCENTRADA	1:100 # COLONIAS	1:1000 # COLONIAS	NO. TOTAL DE BACTE- RIAS EN BAZO.
D ₁	incontables	incontables	150	4.5 x 10 ⁶ bact./bazo
D ₂	"	"	300	9 x 10 ⁶ "
D ₃	"	"	178	5.34 x 10 ⁶ "
D ₄	"	"	288	8.64 x 10 ⁶ "
D ₅	"	"	243	7.24 x 10 ⁶ "
D ₆	"	"	177	5.31 x 10 ⁶ "
D ₇	"	"	159	4.77 x 10 ⁶ "
D ₈	"	"	200	6 x 10 ⁶ "

$$\bar{X} = 6.35 \times 10^6 \pm 1.74 \times 10^6 \text{ bact./bazo}$$

ANALISIS DE VARIANZA

Tomando en cuenta las bacterias encontradas antes del rompimiento de las células fagocíticas.

NORMALES		DIABETICAS	
$\bar{X} = 131.15 \pm 27.17$		$\bar{X} = 523.25 \pm 190.86$	
Dil.	1:10	Dil.	1:10
	0		309
	1		230
	0		175
	3		250
	N = 4		D = 964
	= 10		= 241500

$$Y_{..} = 968 \qquad N = 8 \qquad \frac{y_{i.}^2}{j} = \frac{(964)^2 + (4)^2}{4} = 232328$$

$$\sum_{i=1}^{ni} \sum_{j=1}^{nj} y_{ij}^2 = 241516 \qquad \frac{Y_{..}^2}{N} = 117128$$

Fuente de variación	grados de libertad	suma de cuadrados	Media Cuadrática	F calculada
Estado T Hiperglucémico	1	115200	115200	75.23 **
E Otras causas	1	9188	1531.3	

F de tablas con un $\alpha = 0.05 = 5.99$

** SIGNIFICATIVO

F cal. $>$ F tab.

ANALISIS DE VARIANZA
(Después del rompimiento de las células fagocíticas)

NORMALES

DIABETICAS

$$\bar{X} = 130 \pm 26.4$$

$$\bar{X} = 576 \pm 169.8$$

Dil. 1:1000

Dil. 1:1000

15

150

2

300

25

178

60

288

27

243

12

177

14

159

23

200

$$\sum_N = 178$$

$$\sum_D = 1695$$

$$\sum \sum_N = 6052$$

$$\sum \sum_D = 382787$$

$$Y.. = \sum_D + \sum_N = 1873 \quad N = 16 \quad \frac{y_{i.}^2}{j} = \frac{(1695)^2 + (178)^2}{8} = 363088.6$$

$$\sum \sum y_{ij}^2 = 388839 \quad \frac{y_{.j}^2}{N} = \frac{(1873)^2}{16} = 219258.06$$

Fuente de variación	grados de libertad	suma de cuadrados	Media Cuadrática	F calculada
T Estado Hiper glucémico	1	143830.57	143830.57	78.2 **
E Otras causas	14	25750.37	1839.31	

F de tablas con un $\alpha = 0.05 = 4.6$

F cal. $>$ F tab.

** SIGNIFICATIVO

ANALISIS DE RESULTADOS

De las cosechas realizadas en peritoneo (Tabla No. 4), no se obtuvo crecimiento bacteriano ni antes ni después del rompimiento de los macrófagos, posiblemente esto se debió a que la bacteria se inocularó por vía intravenosa y el tiempo entre la inoculación y cosecha fué de 48 horas, por lo tanto la mayor concentración de bacterias se encontraba en torrente sanguíneo y órganos internos, como en el caso del bazo donde los resultados fueron positivos, se sugiere realizar un próximo estudio con un hemocultivo y corroborar lo antes expuesto.

Al momento de llevar a cabo la extracción del bazo se observó que el grupo de ratas normales presentaron esplenomegalia pronunciada, no así el grupo de ratas diabéticas donde esta respuesta estuvo disminuída. Esta observación concuerda con los resultados obtenidos (Tablas 6 y 7) en donde podemos darnos cuenta que el número de bacterias encontradas en el bazo de las ratas diabéticas fué mayor que en el grupo de ratas control y en base a estos resultados se observa una mejor respuesta y eficiencia de las células fagocíticas del grupo de ratas control.

CONCLUSIONES

Por los resultados obtenidos experimentalmente y validados estadísticamente por medio del análisis de varianza (ANAEVA), podemos concluir que el efecto hiperglucemiante debido a la carencia de insulina disminuye la eficiencia de las células fagocíticas, ya que el número total de bacterias encontradas en bazo de ratas diabéticas fué significativamente mayor que en el grupo de ratas control.

Una explicación de nuestros resultados puede ser que la falta de glucosa en las células fagocíticas obtenida por las vías de la hexosa monofosfato y la glucólisis, provoca un desacoplamiento en la generación del ión superóxido y del peróxido de hidrógeno, siendo este último esencial en la formación del complejo microbicida haluro-mieloperoxidasa- H_2O_2 . Debido a esto las células fagocíticas de las ratas hiperglucémicas no son capaces de controlar la infección intracelular.

Como explicación alternativa podemos sugerir que la activación de los macrófagos por los linfocitos T se encuentra alterada. Algunos estudios demuestran que la resistencia de una infección intracelular está basada principalmente en una respuesta inmune celular dependiente de los linfocitos T los cuales activan a los macrófagos. (11, 13, 18)

B I B L I O G R A F I A

- 1.- CANADELL J. MA. / LIBRO DE LA DIABETES, 2a. Edición, Editorial JIMS; Capítulos VII, XII Y XIII, Barcelona (1980).
- 2.- CUATRECASAS P. A. INSULIN RECEPTORS; ANN. REV. BIOCHEM. --
43, 169-175. (1974).
- 3.- DAVIS B. D. DULBECCO R. / MICROBIOLOGIA, 2a. Edición, Editorial SALVAT, México (1973), páginas 302-706.
- 4.- FARRERIAS P. ROZMAN C. "MEDICINA INTERNA", Editorial MA--
RIN, España (1978), páginas 480-490.
- 5.- FUNDENBERG H. / INMUNOLOGIA CLINICA, 5a. Edición, Editorial MANUAL MODERNO, Cap. XI, XII, XXVII, México (1985).
- 6.- GARZA E. I. FERNANDEZ R. A. / MANIFESTACIONES ORALES DE LA
DIABETES MELLITUS; Tesis Profesional para obtener el Título de Cirujano Dentista, U.N.A.M., E.N.E.P. ZARAGOZA, --
(1980) páginas 5-11.
- 7.- GUYTON A. C. / TRATADO DE FISIOLOGIA MEDICA, 5a. Edición,
Editorial INTERAMERICANA, México (1972), pag. 173-975.
- 8.- HENRI R. J. CANNON D.C. / QUIMICA CLINICA, BASES Y TECNI--
CAS, 2a. Edición Editorial JIMS. (1978).

- 9.- ISHIBASHI, T. KITAHARA / ALTERED RESISTENCE TO Lysteria --
monocitógenes INDIABETIC MICE. J. EXP. MED. 51, 251-259, -
(1981).
- 10.- KORNOUSKI, M. L. / THE METABOLISMO OF LEUCOCYTES SEMIN. --
HEMATOL. 5, 156-165, (1978).
- 11.- LANE, F. C. AND UNANUE, E. R. REQUIREMENT OF THIMUS (T) --
LYMPHOCYTES FOR RESISTANCE TO LISTERIOSIS. J. EXP. MED. --
135, 1104-1112 (1972).
- 12.- LARSEN A. S., WIGGIENS I. G. / IMMUNE RESPONSE TO Lysteria
monocitógenes, MANUAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY. 43; 320-323,
(1977).
- 13.- MACKANESS, G. B. RESISTANCE TO INTRACELLULAR INFECTION J.
EXP. MED. 116; 381-406 (1962).
- 14.- MANUAL DE PRACTICAS DE POSGRADUADOS DEL DEPARTAMENTO DE -
INMUNOLOGIA DE LA E. N. C. B., I.P.N. (1978).
- 15.- MENDEZ D. ASPECTOS CLINICOS DE LA LISTERIOSIS. REVISTA LA
TINOAMERICANA DE MICROBIOLOGIA. 8: 101-104, (1966)
- 16.- HITRUKA B. / ANIMAL FOR MEDICAL RESEARCH MODELS FOR THE --
STUDY OF HUMAN DISEASE, 2a. Edición, Editorial AD-WILLY ME
DICAL. (1973), páginas 279-284.

- 17.- MORA GUEVARA J. L. SANCHEZ RUIZ J. / EVALUACION DE LA RESPUESTA INMUNE EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE DIABETES MELLITUS EN RATAS. TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL TITULO DE Q.F.B., U.N.A.M., E.N.E.P. ZARAGOZA. (1982).
- 18.- NORTH R. J. IMPORTANCE OF THYMUS - DERIVED LYMPHOCITES IN CELL-MEDIATED IMMUNITY TO INFECTION, CELL IMMUNOL. 7; - - (1973), 166-176.
- 19.- PTAK W. A. SZARNIK Z. / CONTACT SENSIBILITY IN ALLOXAN DIABETIC MICE CLIN, EXP. IMMUN. 19 (2), 319-325, U.S.A. - - (1975).
- 20.- ROIT I. / INMUNOLOGIA ESCENCIAL, 3a. Edición, Editorial -- JIMS, Cap. VII, España (1979)
- 21.- SAIKI O., NAGORO S. / DEPRESSED IMMUNOLOGICAL DEFENSE MECHANISMS IN MICE WITH EXPERIMENTALLY INDUCED DIABETES. INFECTION AND IMMUNITY, I, 127-132, (1980).
- 22.- SWARD C.P. MECHANISMS OF PATHOGENESIS IN Lysteria monocitógenes INFECTION I INFLUENCE OF IRON. J. BACT. 82; 536-542, (1966).
- 23.- TAGER H. GIVEN STRUCTURALLY ABNORMAL INSULINE CAUSING - - HUMAN DIABETES, NATURE 281, 122-5, (1979).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 24.- TEPPERMAN J. / FISILOGIA METABOLICA Y ENDOCRINA, 3a. Edición, Editorial INTERAMERICANA; Cap. X, México (1975).
- 25.- VIGNE J. LE DIABETE, LA RECHERCHE 115: 1130-39, France, - (1980).
- 26.- WAYNE DANIEL W. / BIOESTADISTICA, Editorial LIMUSA, México (1977), páginas 211-223
- 27.- WELCH D.F. RELATION SHIP BETWEEN SUPEROXIDO DISMUTASE AND PATHOGENIC MECHANISMS OF Lysteria monocitógenes INFECTION AND IMMUNITY 23: 501-509, (1979).