

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

---

CAMPUS IZTACALA



B01204/96  
Ej. 2

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD ENDOCITICA  
Y QUIMIOTACTICA DE POLIMORFONUCLEARES Y  
MONOCITOS EN DIABETICOS TIPO II ESTABLES  
Y DESCOMPENSADOS

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

**B I O L O G O**

P R E S E N T A :

**RUBEN RUIZ RAMOS**

ASESOR DE TESIS: M.C. RAFAEL JIMENEZ FLORES

LOS REYES IZTACALA, TLALNEPANTLA, EDO. DE MEX. 1996



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.

Dedico este trabajo a la memoria de mis hermanos:

Ricardo Ruiz Ramos  
1966-1991

René Ruiz Ramos  
1970-1996

Bi ma mandé

Yabidú

Ra inaní

Manu mansana ansí paté

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a mis padres: Juana Ramos de Ruiz y Macario Ruiz García, por todo cuanto me han dado en esta vida, por los enormes sacrificios que han realizado, por el gran apoyo que me han brindado y por haberme dado la oportunidad de estudiar una carrera profesional.

A mis hermanos biológicos; Raúl, Ricardo, René y Rafael, por todos los momentos que hemos compartido y porque somos parte de los mismo. Deseo lo mejor para ustedes en todo momento.

Quiero agradecer de manera muy especial al Dr. Rafael Jimenez Flores, Jefe del Laboratorio de Inmunología de la UMF del Campus Iztacala, por haber dirigido con tanto empeño y convicción este trabajo de tesis, por haber invertido su tiempo valioso, por su enorme paciencia y tolerancia, por sus grandes y valiosos consejos y enseñanzas, pero sobre todo por haberme brindado su amistad, gracias.

A todos los compañeros del Laboratorio de Inmunología del Campus Iztacala por su ayuda, su apoyo y por su amistad.

A la Química Gloria L. Paniagua C., Jefe del Laboratorio de Análisis Clínicos de la CUSI-Iztacala, por haberme apoyado con los análisis de química sanguínea de las muestras de enfermos diabéticos.

Agradezco enormemente a Ma. del Carmen Naranjo Mtz. por darme el estímulo, la fuerza y el impulso final para la conclusión de este trabajo. Por su valiosa ayuda, consejos, apoyo y por compartir esos grandiosos momentos.

Por ser quien eres y por ser como eres.

A Sandra Soto R. por todo el apoyo brindado, por su enorme paciencia y comprensión y sobre todo, por todos los momentos que hemos compartido. Gracias.

A mis amigos y hermanos no biológicos: Angel, Juan, Mario, Hugo, Francisco, René, Arturo, Alberto y Martín, por el apoyo que me han brindado en los momentos que lo he necesitado, por los grandes momentos que hemos compartido y por que sé que siempre estarán ahí.

Espero que el camino sea bueno para ustedes.

A todas y cada una de las personas que han influido en mi vida y en mi formación, y de quienes he aprendido lo que sé y por quienes soy quien soy y estoy donde estoy.

No hay enseñanzas buenas o malas, solo eso, enseñanzas.



## INDICE

	<u>PAGINA</u>
1- RESUMEN.....	1
2- INTRODUCCION.....	3
2.1 ORIGEN DE LOS FAGOCITOS.....	4
2.2 FAGOCITOSIS.....	6
A) QUIMIOTAXIS Y DIAPEDESIS.....	6
A.I) RECEPTORES DE LA SUPERFICIE CELULAR Y MOLECULAS QUIMIOATRAYENTES.....	8
A.II) SEÑAL A TRAVES DE LA MEMBRANA Y PROTEINAS ACCESORIAS.....	9
A.III) MOLECULAS DE ADHESION CELULAR (INTEGRINAS).....	12
A.IV) INTERACCION ENTRE RECEPTORES DE LA SUPERFICIE CELULAR Y MOLECULAS QUIMIOATRAYENTES.....	13
A.V) CITOESQUELETO.....	15
B) ENDOCITOSIS.....	18
C) DIGESTION.....	20
3- OBJETIVOS.....	27

4- METODOLOGIA.....	29
4.1 OBTENCION DE SANGRE.....	29
4.2 OPSONIZACION DE LEVADURAS.....	30
4.3 ENSAYO DE ENDOCITOSIS.....	30
4.4 ENSAYO DE QUIMIOTAXIS.....	31
4.5 PREPARACION DE MEMBRANAS.....	33
4.6 CONTEO DE CELULAS.....	33
5- RESULTADOS.....	34
5.1 QUIMITAXIS.....	34
5.2 ENDOCITOSIS (INGESTION).....	36
5.3 DIGESTION.....	37
6- ANALISIS DE RESULTADOS.....	39
6.1 QUIMIOTAXIS.....	39
6.2 ENDOCITOSIS (INGESTION Y DIGESTION).....	41
7- CONCLUSIONES.....	44
8- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	46

## RESUMEN

La diabetes mellitus en México y en otros países representa un problema de salud pública, por su elevada morbimortalidad, una de las principales complicaciones de los enfermos que la padecen, es la alta incidencia de infecciones recurrentes.

La hipótesis establece que la elevada recurrencia de enfermedades infecciosas en los enfermos diabéticos, se debe en gran medida, a una deficiencia en los mecanismos de defensa de estos pacientes, provocada por los cambios metabólicos de la enfermedad.

En el presente trabajo se demuestran diferencias significativas mediante la evaluación de la quimiotaxis, con tres quimioatrayentes; (N-fMLP, suero autólogo activado con zimosán, suero stock activado con zimosán) en monocitos y polimorfonucleares de tres grupos de estudio: A).- grupo control (no diabéticos), B).- diabéticos tipo II estables y C).- diabéticos tipo II descompensados

Por otra parte el proceso de la fagocitosis, revela también modificaciones tanto en la ingestión celular (endocitosis), como en la

digestión (estallido respiratorio) de Saccharomyces cerevisiae, medido por la reducción del azul de nitro-tetrazolio (NBT).

Los resultados indican que los procesos de quimiotaxis, endocitosis y digestión celular se encuentran alterados en el grupo de pacientes diabéticos con descontrol metabólico, comparado con los de diabéticos controlados y el testigo.

Lo anterior hace suponer que estos disturbios se deben en gran medida a una glucosilación no enzimática del diabético con hiperglucemia, que promueve una disfunción de proteínas solubles, y estructurales que participan activamente en los mecanismos evaluados, manifestándose como una deficiencia en adhesión, opsonización, señalización transmembranal, reconocimiento y eventos metabólicos citoplasmáticos.

## INTRODUCCION

Los estudios realizados en 1882 por el científico ruso Elie Metchnikoff que se iniciaron con la observación de células móviles en larvas de estrella de mar, tratando de endocitar un cuerpo extraño que había sido introducido al organismo hospedero lo llevaron a proponer que la actividad fagocítica de estas células era el principal mecanismo de defensa de los seres vivos. De esta manera sus hipótesis y observaciones fueron los fundamentos de la inmunología celular. (1)

La inmunología celular se enfoca al estudio de las células del sistema inmunocompetente. Actualmente es un próspero campo de investigación que incluye complejos mecanismos de reconocimiento de mensajes bioquímicos, así como el estudio de los mecanismos moleculares en la activación transmembranal y citoplásmica que permita la síntesis y excreción de él o los productos (citocinas) que tienen diversas funciones, ya sea directamente o sobre otras poblaciones celulares que participan en el mecanismo de respuesta inmune. (2,3)

Dentro de los componentes celulares existen dos poblaciones que ocuparán nuestra atención debido a que, son las células especializadas y

responsables de la fagocitosis, me refiero a los neutrófilos y a los fagocitos mononucleares. Sin embargo, otras células también presentan capacidad fagocítica como basófilos y eosinófilos, estos últimos no serán abordados en el presente trabajo.

## **2.1 ORIGEN DE LOS FAGOCITOS.**

Estos tipos celulares tienen como origen la médula ósea que actúa como sitio de proliferación y maduración terminal de los mieloblastos. La proliferación consiste en aproximadamente cinco divisiones que tienen lugar solo durante los primeros tres estados de maduración de neutrófilos (blasto, promielocito y mielocito), después del estado de mielocito las células pierden su capacidad mitótica y cinco días después aproximadamente éstas se liberan al torrente sanguíneo. En las etapas de mielocito se desarrollan dos tipos de gránulos; los gránulos azurófilos o gránulos primarios que contienen principalmente mieloperoxidasa, lisosimas, elastasas, proteínas catiónicas y grandes cantidades de enzimas lisosómicas hidrolíticas. El segundo tipo, los gránulos secundarios o específicos que son más pequeños y numerosos que los gránulos

primarios, son peroxidasa negativos y contienen principalmente lactoferrina y lisosima.

El siguiente paso en la maduración celular es el estado de metamielocito que es una célula no secretora, no proliferativa y de la cual proceden los polimorfonucleares maduros (PMN) que poseen ambos tipos de gránulos en proporción aproximada de un primario por dos secundarios y cuyos diámetros son 500 y 200 nm respectivamente.

Los fagocitos mononucleares se originan también en la médula ósea. La primera célula precursora identificable como parte del sistema fagocítico mononuclear es el monoblasto, después de dividirse da origen al promonocito que ya muestra la capacidad de síntesis y almacenamiento de gránulos azurófilos y algunos mieloperoxidasa positivos, la maduración de estas células da lugar a los monocitos que son liberados a la circulación dos días y medio después de su formación para migrar hacia los tejidos, constituyendo el sistema monocito-macrófago. Los gránulos en esta etapa miden aproximadamente 0.3 a 0.6  $\mu\text{m}$ .

Una vez que éstos tipos celulares han madurado completamente participan en funciones diferentes como: presentación de antígenos,

cooperación celular, producción y secreción de mediadores biológicamente activos, quimiotaxis, ingestión y digestión de agregados moleculares (complejos antígeno-anticuerpo Ag-Ab) y organismos invasores, destrucción de células tumorales y en la propia homeostasis. (2-4)

## 2.2 FAGOCITOSIS.

De los eventos en que se puede dividir la fagocitosis para su estudio, solo abordaré los siguientes:

A) QUIMIOTAXIS Y DIAPEDESIS

B) ENDOCITOSIS

C) DIGESTION

### A) QUIMIOTAXIS Y DIAPEDESIS

Parte importante de las funciones de estas células es la de migrar hacia los sitios donde se les requiera y generar la señal quimiotáctica.



Existen en general dos tipos de migración celular; la migración al azar o no direccional, la cual, ocurre en ausencia de cualquier estímulo químico y la quimiocinesis o quimiotaxis, que es una migración celular estimulada químicamente y en dirección a lo largo de un gradiente de concentración de un quimioatrayente, de esta última nos ocuparemos.

Este movimiento celular involucra la migración a través del endotelio vascular (diapedesis), algunos estudios han demostrado el efecto de mediadores humorales en la interacción endotelio-leucocito. (5,6)

En términos generales, los procesos de locomoción son iniciados por la unión de moléculas quimioatrayentes a los distintos receptores de la membrana plasmática, esta unión altera el potencial transmembranal, de valores de reposo de -15 mv, seguido de una despolarización de la membrana y finalmente un periodo de hiperpolarización que alcanza niveles máximos de aproximadamente -50 mv. en 2 a 5 min.

Por otra parte también se activa el flujo iónico y los niveles intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  de reposo  $0.1 \mu\text{M}$ , aumentan hasta  $1 \mu\text{M}$ . y esta movilización inicial de  $\text{Ca}^{2+}$  dirige el ensamble de microfilamentos y

microtúbulos en el citoplasma, ocasionando una gran actividad del citoesqueleto de la célula que adquiere una forma asimétrica característica; con el frente en forma de pseudópodo, el cual, avanza delante del cuerpo celular que contiene al núcleo y los gránulos citoplásmicos y una especie de protuberancia arborecente en la parte posterior. (2,7,8,9)

Se requieren también reacciones de transmetilación mediadas por 5-adenosilmetionina (Ado-Met) así como la activación de fosfolipasas e incrementos en adenosín-3,5-monofosfato (AMP) ya que este "mensajero" se involucra a su vez en la activación de glucógeno fosforilasa. (7)

#### A-I) RECEPTORES DE LA SUPERFICIE CELULAR Y MOLECULAS QUIMIOATRAYENTES

Se ha establecido que durante la maduración de PMN's ocurren cambios en carbohidratos de la superficie celular, glicoproteínas, glicolípidos y antígenos HLA, se sabe también que la densidad de antígenos HLA-A, B Y C decrece durante la maduración mientras que algunos antígenos de superficie aparecen. (10) Por lo tanto, el desarrollo

de las capacidades quimiotácticas y de reconocimiento son paralelas a la adquisición de ciertos receptores de membrana.

Aproximadamente el 95% de PMN maduros poseen receptores para opsoninas (La porción Fc de IgG1 e IgG3, IgM, C3b, C3bi), factores quimiotácticos como péptidos N-formilados, C5a y leucotrieno B4 y para otros moduladores exógenos de funciones del neutrófilo como; factor activador de plaquetas (PAF), agentes  $\beta$ -adrenérgicos, adenosina, interleucina-1 (IL-1), y factor de necrosis tumoral (TNF), receptores para factores de crecimiento (GM-CSF y G-CSF), hay también presentes sitios de unión para insulina. (7,11-23)

#### **A-II) SEÑAL A TRAVES DE LA MEMBRANA Y PROTEINAS ACCESORIAS**

Asociados con los receptores de membrana se hallan varias proteínas ligadas al nucleótido guanina (proteína-G), que median la señal de transducción entre los receptores y sus agonistas tales como nucleótidos cíclicos, diacilglicerol e inositol polifosfatos, activando o inactivando indirectamente enzimas asociadas a la membrana plasmática o canales iónicos. (24)

Las proteínas-G están constituidas de tres subunidades o cadenas proteicas llamadas alfa ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), gamma ( $\gamma$ ), y asociada a la subunidad  $\alpha$ , un nucleótido guanosín difosfato (GDP). La dinámica de transducción de la señal comienza cuando un primer mensajero se acopla a su receptor específico en la membrana plasmática, esto causa un cambio en la conformación de éste y promueve un intercambio de GDP por el nucleótido guanosín trifosfato (GTP), activando a la proteína-G, esta activación produce una disociación de las subunidades, con lo que la subunidad alfa ligada a GTP ( $\alpha$ -GTP) difunde a lo largo de la membrana y se liga con un efector activándolo, a continuación la subunidad  $\alpha$  hidroliza el GTP a GDP inactivándose a sí misma y de esta manera se reasocia con el complejo  $\beta$ - $\gamma$ . (24-27)

Se ha demostrado que estos receptores ligados a proteína-G activan o inactivan adenililciclase alterando la concentración de AMPc, otras activan una fosfolipasa fosfoinositol-específica (fosfolipasa C- $\beta$ ), la cual hidroliza fosfatidil-inositol-bifosfato (PIP<sub>2</sub>) para generar dos mediadores intracelulares, inositol-trifosfato (IP<sub>3</sub>), el cual libera Ca<sup>2+</sup> del retículo endoplásmico (RE) y por tanto incrementa la concentración de Ca<sup>2+</sup> en el

citosol y diacilglicerol, el cual permanece en la membrana plasmática y activa proteín-cinasa-C. (24-27)

Otros componentes estructurales membranales (canales) participan en el transporte activo y pasivo como la amilorida-sensible a  $\text{Na}^+\text{-H}^+$ , la cual regula el pH citoplásmico y fagolisosómico, la ovabaina-sensible a  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPasa, la cual mantiene el potencial de membrana y el vanadato sensible  $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}$  ATPasa, el cual saca  $\text{Ca}^{2+}$  de la célula manteniendo las concentraciones en el resto del citosol de aproximadamente  $0.1 \mu\text{M}$ . Otros componentes involucrados en la homeostasis del calcio incluyen una bomba que transporta el ión del citoplasma dentro de un almacén que posiblemente reside en el retículo endoplásmico (calmodulina) y un canal que responde a inositol-1,4,5,-trifosfato liberando este calcio "secuestrado" en el citoplasma. (2,26,27)

También han sido demostrados complejos CD11 y CD18, los cuales son importantes en adherencia así como también LFA-1, Mac1 y P150.95, cada uno es un heterodímero que contiene una única subunidad  $\alpha$  (CD11a, CD11b Y CD11c respectivamente) formando complejos con una

subunidad común  $\beta$  (CD18). Estas proteínas reciben el nombre de integrinas. (26,27,28)

### A-III) MOLECULAS DE ADHESION CELULAR (INTEGRINAS)

Las integrinas son las principales proteínas receptoras usadas por las células animales para unirse a la matriz extracelular. Estas moléculas están formadas por heterodímeros que funcionan como ligandos transmembranales que median las interacciones bidireccionales entre la matriz extracelular y la actina del citoesqueleto, también actúan como transductores de la señal, activando varias vías de señalización intracelular cuando son activadas por ligarse a proteínas de la matriz, como pueden ser colágeno, fibronectina o laminina, así como a moléculas quimioatrayentes, tales como MCP-1 (29) o FMLP. Una célula puede regular la actividad adhesiva de estas integrinas por sus propios sitios de unión con la matriz o por sus uniones con los filamentos de actina.

Estos receptores son glicoproteínas transmembranales constituidos por dos subunidades asociadas no covalentemente, se conocen con el nombre de cadenas  $\alpha$  y  $\beta$ , las cadenas  $\beta$ 1 forman dímeros con 9 distintos

tipos de cadenas  $\alpha$ , mientras que, las  $\beta 2$  solo con 3 tipos de cadenas  $\alpha$ , a éste último grupo pertenecen las integrinas que se localizan en linfocitos y macrófagos, como ( $\alpha L\beta 2$ )(CD11a/CD18) LFA-1, ( $\alpha M\beta 2$ )(CD11b/CD18) MAC-1, p150.95 (CD11C/CD18), la importancia de estos dímeros radica en que son las encargadas de mediar las interacciones célula-matriz, así como, célula-célula. (23,26-30)

Esta mediación que se da entre el citoesqueleto y la matriz extracelular, se debe a que las integrinas por medio de su dominio citoplásmico de las cadenas- $\beta$  se ligan, tanto a talina como a  $\alpha$ -actinina, proteínas que inician el ensamble de un complejo de proteínas asociadas con filamentos de actina en el cortex celular. (25-32)

#### **A-IV) INTERACCION ENTRE RECEPTORES DE LA SUPERFICIE CELULAR Y MOLECULAS QUIMIOATRAYENTES.**

La respuesta de C5a resulta de la interacción de esta molécula con su receptor específico en la superficie celular, tal receptor fue identificado como un polipéptido sencillo en la membrana plasmática con una masa molecular de aproximadamente 40 a 48 KDa. estudios adicionales han

demostrado que existen de 50000 a 113000 sitios receptores por célula con una constante de disociación (Kd) de  $2 \times 10^{-9}$ , como la de los receptores para péptidos formilados. Un estímulo induce un incremento en la expresión de receptores para C3 y C3bi (CR1 y CR3 respectivamente) sobre la superficie celular como resultado de la movilización de los distintos reservorios subcelulares.

El receptor para C3b es una glicoproteína con una masa molecular de 205 KDa la cual es diferente del receptor de C3bi, una fosfolipasa fosfoinositol específica asociada a membrana es activada después de la estimulación de alguna molécula quimiotáctica en particular fosfolipasa-C hidroliza fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) y fosfatidilinositol-4-monofosfato (PIP1) a un producto que es un supuesto segundo mensajero, inositol-1,4,5-trifosfato (IP3) y 1,2-diacetil glicerol (DAG).(25)

En neutrófilos permeabilizados IP3 interactúa con un receptor intracelular inespecífico y estimula la liberación de  $Ca^{2+}$ , este calcio no se deriva de mitocondrias ni de retículo endoplásmico pero sí de un organelo distinto que ha sido llamado calciosoma. (2,25)



#### A-V) CITOESQUELETO

Otras citoproteínas se encuentran presentes en neutrófilos, proteínas que están relacionadas con la movilidad celular y exocitosis incluyen actina, tubulina, y miosina, así como, un gran número de proteínas asociadas que participan y modifican la polimerización de éstas y el acoplamiento a otras estructuras subcelulares. (26,31,32)

El citoplasma de las células eucariotas está organizado de una manera muy especial por una red de proteínas filamentosas que se conocen como citoesqueleto. Esta red se compone principalmente de tres tipos de filamentos; microtúbulos, filamentos de actina, y filamentos intermedios.

Los microtúbulos están formados por moléculas de tubulina, que a su vez están constituidos como un heterodímero de dos polipéptidos globulares fuertemente ligados, estas subunidades reciben el nombre de  $\alpha$ -tubulina y  $\beta$ -tubulina, esta última, unida a un GTP que al ser hidrolizado a GDP brinda el mecanismo para su polimerización y despolimerización. Son estructuras tubulares y rígidas que usualmente tienen una terminación anclada en el centrosoma y la otra libre en el

citoplasma (terminación minus y plus respectivamente). En un gran número de células los microtúbulos son estructuras altamente dinámicas que crecen y decrecen alternativamente por el acoplamiento y desacoplamiento de subunidades de tubulina en su terminación plus. (26,30)

Los filamentos de actina son también estructuras dinámicas, que normalmente existen en redes así como filamentos sencillos. Justo debajo de la membrana plasmática se encuentra una capa llamada cortex, y está formada de filamentos de actina y una variedad de proteínas ligadas a ésta. El cortex rico en actina controla la forma y movimientos de superficie de la mayoría de las células animales. (26,30-32)

Se sabe que estas células contienen altas concentraciones de actina en forma monomérica llamada actina-G, esta forma globular monomérica esta asociada a ATP, que al ser hidrolizado a la forma de ADP permite la activación y su rápida polimerización a la forma filamentosa conocida como actina-F. Se ha demostrado que el  $Ca^{2+}$  interviene en el control de proteínas reguladoras de la polimerización de actina, proteínas como la llamada profilín que liga monómeros de actina previniendo su adición a

filamentos de actina no preferentes o de terminación redondeada (minus), pero no de terminación en punta o preferentes (plus), mientras que otra proteína llamada gelsolín bloquea la polimerización en la terminación en punta de los filamentos. por lo tanto, los péptidos quimiotácticos pueden incrementar la ruptura de actina polimerizada por liberación de monómeros de actina, por un "desbloqueo" de filamentos preexistentes o por crear nuevos sitios de polimerización de extremos en punta o terminación plus. (26,30)

Los filamentos intermedios a diferencia de los anteriores, están formados por monómeros filamentosos que forman  $\alpha$ -hélice en su parte central enrollados a otra  $\alpha$ -hélice formando dímeros y que asociados a otras moléculas diméricas de manera antiparalela forman tetrámeros como subunidad fundamental. Relativamente rígidos, son estructuras que actúan como cuerdas que proveen estabilidad mecánica a la célula y en los tejidos participan en la formación de las diferentes uniones intercelulares. (26)

Los tres tipos de filamentos están conectados los unos a los otros y sus funciones deben estar perfectamente coordinadas y reguladas para

que estas células puedan realizar los diferentes movimientos. Se sabe que algunos factores quimiotácticos están relacionados en la activación y regulación de la polimerización de éstos.(29-32) Lamentablemente se desconocen la mayor parte de los mecanismos moleculares que dirigen y regulan la citocinesis.

## **B) ENDOCITOSIS**

En neutrófilos los gránulos están separados de la membrana plasmática por un citoplasma hialino rico en filamentos. La estimulación de la superficie celular dirige un incremento en la movilización de  $Ca^{2+}$  y particularmente en la periferia celular, este incremento puede activar el gelsolín y de esta manera corta los filamentos de actina y produce un decremento en la viscosidad de esta área, sin embargo, para que estos procesos sean efectivos se requiere de la mediación de proteínas presentes en el suero y que se les ha llamado opsoninas (C3b, C3bi, IgG, IgM) pues ya que se ha establecido que la importancia de estas opsoninas es el de proveer un medio de reconocimiento entre fagocitos, partículas y organismos invasores, existen tres formas generales de opsonofagocitosis:

I) Anticuerpos que participan por la reacción de combinar los sitios activos Fab2, con el apropiado determinante antigénico de la superficie bacteriana; las porciones Fc expuestas sobre el microorganismo se ligan con los receptores correspondientes de la superficie de los fagocitos.

II) Solo el C3b o C3bi participan atacando la superficie microbiana uniéndose covalentemente vía thiol-éster o enlace amida y la superficie del fagocito vía receptor específico conocido como CR1 o CR3 respectivamente.

III) Anticuerpos (Ab) y C3b o C3bi participan, el Ab que liga al antígeno y el complejo (Ag-Ab) así formado, activa el complemento por la vía clásica o alterna seguida por el depósito de C3b o C3bi en la superficie bacteriana y así los microorganismos los cuales han sido cubiertos con Ab y fragmentos del complemento ligan a los fagocitos vía receptor de ambos ligandos. (2,33,34)

Algunos investigadores postulan que la carga neta de la superficie bacteriana o la hidrofobicidad de partículas determinan si puede ser unido por fagocitos, el reconocimiento entre fagocito y su objetivo puede ser acompañado por la interacción de carbohidratos ligados a proteínas o

lectinas de la superficie de un tipo celular que se combinan con azúcares complementarios de la superficie de otra. (33,34)

Una vez que se ha realizado la opsonización y por medio de ésta el reconocimiento celular con la subsecuente cadena de procesos bioquímicos asociados a la activación de membrana y polimerización de elementos del citoesqueleto. La membrana forma pseudópodos que rodean a la partícula extraña en un proceso que se ha denominado de "cremallera", hasta fusionarse los extremos y formar una vesícula endocítica llamada fagosoma, que es internalizada por la célula para más tarde fusionarse con los gránulos primarios y secundarios y formar un fago-lisosoma. (2,26)

### C) DIGESTION

Los gránulos primarios juegan un papel importante durante la digestión ya que contienen mieloperoxidasa, proteínas neutras, proteoglicanos (elastasas, catepsina G y D), hidrolasas ácidas ( $\beta$ -glucuronidasa, fosfatasa ácida,  $\beta$ -manosidasa, N-acetilglucosaminidasa) y proteínas catiónicas, todas ellas con actividad microbicida. Y por otro

lado los gránulos secundarios, que poseen lisosimas, colagenasa, proteínas ligadas a B12, lactoferrina y activadores de la cascada del complemento. Y una tercera población que no ha sido bien caracterizada y que cosedimenta con gránulos específicos. Estos gránulos contienen gelatinasa, enzima que tiene gran similitud con la colagenasa. (2,26,35,36)

De tal manera que en el fago-lisosoma ya formado actúan estas enzimas en procesos no oxidativos y en adición existe un sistema dependiente de oxígeno, es esta etapa la que recibe el nombre de “estallido respiratorio” por el creciente aumento en el consumo de éste por la célula. Las enzimas que intervienen se localizan en la membrana plasmática, las oxidasas incluyen el heme-protein-citocromo-b un dímero que contiene una glicoproteína de 91 KDa y un polipéptido de 22 KDa el cual ha sido encontrado tanto en la membrana plasmática como en los gránulos específicos. El aparato responsable de la activación de esta oxidasa está dividido entre el citosol y la membrana plasmática, durante este fenómeno se producen varios metabolitos del oxígeno por activación de una oxidasa que depende del fosfato de nicotin-adenín-dinucleótido

reducido (NADPH) que reduce el oxígeno molecular hasta anión superóxido ( $O_2^-$ ) que a su vez se transforma en peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y éstos a su vez pueden interactuar para dar origen al radical hidroxilo (OH) y posiblemente al oxígeno atómico o singlete de oxígeno ( $^{1/2}O_2$ ). La regulación de la generación de anión superóxido se ha relacionado con la interacción de adenín nucleótidos estimulados por quimioatrayentes.

La NADPH-oxidasa parece ser un compuesto del citocromo b-245-flavoproteína y una ubiquinona. Estos constituyentes se cree que son ensamblados como una cadena transportadora de electrones sirviendo para transportarlos de NADPH al oxígeno. NADPH es subsecuentemente regenerado a través de la desviación hexosa-monofosfato. El citocromo b tiene dos subunidades proteicas de 22 KDa y 2 subunidades glicoproteicas de 91 KDa, este citocromo está distribuido entre la membrana de los gránulos citoplásmicos en células en reposo. La flavoproteína contiene un polipéptido de 45 KDa de similar distribución subcelular. (2,26,37-39)

Los neutrófilos contienen una gran cantidad de glucógeno la mayoría del cual proviene de la glucosa. La producción de glucógeno



decrementa cuando estas células están privadas de glucosa, especialmente si ellas están comprometidas en algún proceso de fagocitosis, pero la síntesis ocurre cuando la glucosa es agregada. Durante la fagocitosis por células privadas de glucosa, la actividad de glicógeno-fosforilasa aumenta, pero los niveles de fosforil-cinasa y glicógeno-sintasa permanece sin cambio.

Por un lado, sin embargo, se ha demostrado que diversas moléculas de organismos invasores como bacterias, levaduras u hongos poseen la capacidad de inhibir la fagocitosis o el ensamble de monómeros de actina y por tanto la quimiotaxis. (40,41)

Y por otro lado se han descrito enfermedades en las que se han establecido defectos en las funciones de las poblaciones fagocíticas y un hecho común es la presencia de infecciones recurrentes, así pues las deficiencias funcionales en las poblaciones fagocíticas, se han asociado en humanos a la presencia de enfermedades infecciosas. (40-52)

La diabetes mellitus es la enfermedad endocrina más frecuente. En población mexicana tiene una alta incidencia, las estadísticas de este padecimiento en especial, son poco confiables por la elevada frecuencia de

enfermos sin diagnosticar, pero algunos autores mencionan hasta el 12% de la población que se atiende en consultas externas de hospitales de 2º nivel.

La enfermedad se clasifica en diabetes primaria y secundaria, la primera se subdivide en diabetes mellitus insulino dependiente (DMID) o diabetes tipo I (juvenil) y diabetes mellitus no insulino dependiente (DMNID) o tipo II (del adulto), esta última variedad tiene tres formas de presentación; en obesos, no obesos y de inicio en jóvenes.

La diabetes secundaria se presenta como una consecuencia a diferentes enfermedades del páncreas (tumores, traumatismos, infecciones), por alteraciones en los receptores para insulina, asociada a otras endocrinopatías y muy raramente a otras circunstancias.

La más frecuente en nuestro país es la DMNID en obesos. La patogénesis aun se encuentra en estudio, se describe en la tipo I, una fuerte predisposición genética, la tipificación de antígenos de clase II en 981 enfermos con DMID comparados con 2228 controles reportó elevada frecuencia de DQA1\*0301 - DQB1\*0302 en la población enferma de los tres grupos raciales estudiados, este haplotipo incluye diferentes

alelos del DR4. También se ha identificado en la posición 57 de la cadena  $\beta$  del HLA-DQ la presencia del aminoácido aspártico (D) como factor de resistencia a la enfermedad y susceptibilidad si no existe. Estas alteraciones genéticas y la presencia de factores ambientales: dietéticos, virales (coxsackie, citomegalovirus, paperas y hepatitis) y otras infecciones aparentemente hacen que se reconozca como extraño parte del tejido pancreático y se produzca una respuesta autoinmune dañando y destruyendo las células beta del páncreas.

Respecto a la diabetes tipo II se considera que tiene características poligénicas y multifactoriales, se hayan involucrados los genes de la glucocinasa, transportadores de glucosa; GLUT-2 (páncreas a hígado), GLUT-4 (músculo a grasa), el péptido amiloidogénico de los islotes (amyлина) y los receptores para insulina, además de los ya mencionados hábitos dietéticos y la obesidad.

La evolución de la enfermedad tiene algunas variaciones y las manifestaciones clínicas son habitualmente consecuencia de hiperglucemia, otras veces son el resultado de complicaciones tempranas o tardías de formas agudas (cetoacidosis, hiperosmolaridad) o

repercusiones de larga evolución (daño vascular: renal, miocárdico, piel, nervioso, retina y tejidos blandos). Las infecciones son muy frecuentes en estos enfermos y generalmente causa de sus descontrolados metabólicos.

Otra alteración metabólica anexa a la diabetes, es la de lípidos que en conjunto son generadoras de aterosclerosis. He comentado la elevada frecuencia de infecciones en diabéticos y en la literatura se han descrito defectos de las diferentes fases en la actividad de los fagocitos. Aparentemente dichos cambios son el resultado de modificaciones metabólicas y vasculares que deterioran los mecanismos de defensa contra agentes patógenos. (53-83)

## OBJETIVOS

### 3.1 GENERAL.

- Evaluar y comparar las actividades endocíticas (ingestión y digestión) y quimiotácticas de monocitos y polimorfonucleares de diabéticos tipo II compensados y descompensados.

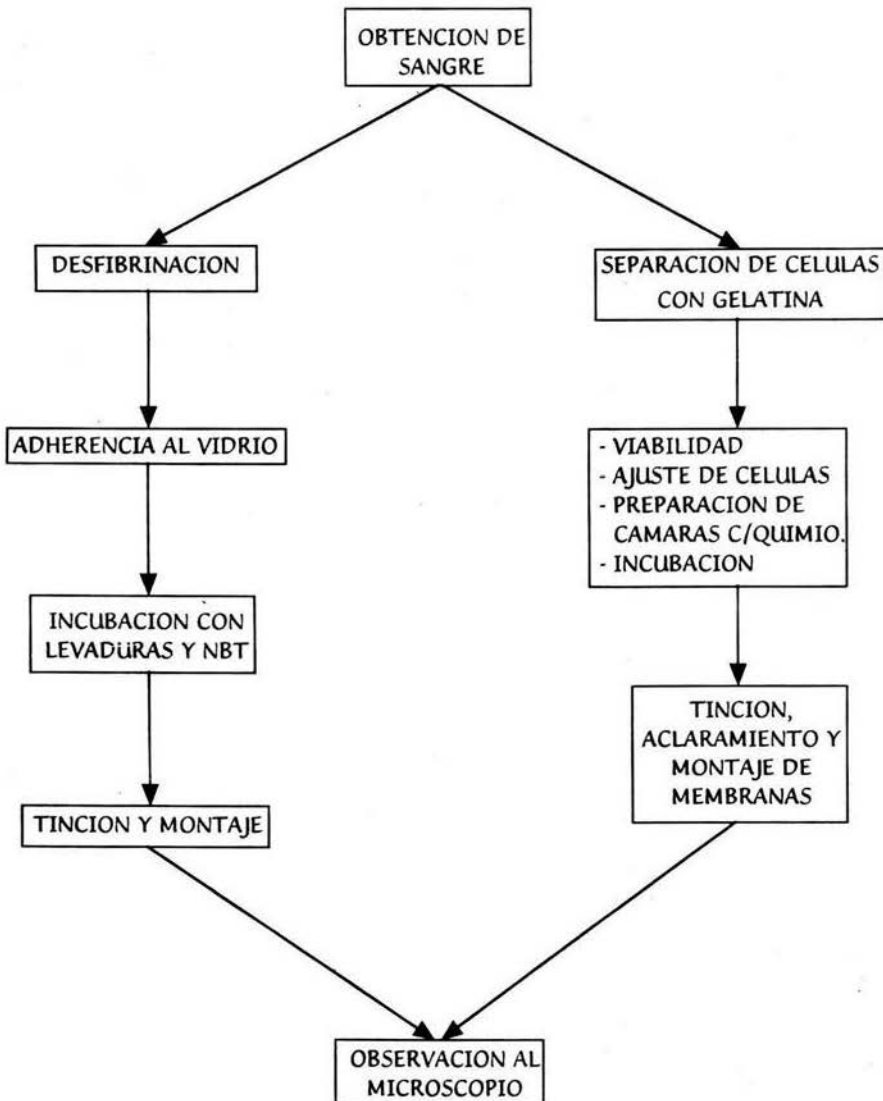
### 3.2 ESPECIFICOS.

- Estandarizar una técnica que permita evaluar de manera cuantitativa y a nivel clínico la quimiotaxis.

- Estandarizar una técnica que permita evaluar por medio de ingestión de levaduras y reducción de NBT, ingestión y digestión celular.

- Establecer si existen diferencias significativas tanto en quimiotaxis, como en endocitosis y digestión, entre diabéticos descompensados, diabéticos estables y un grupo control.

## DIAGRAMA DE FLUJO DE LA METODOLOGIA



## METODOLOGIA

Se formaron tres grupos de estudio de diez personas cada uno, ambos sexos, de 21 a 60 años de edad; Grupo A: personas no diabéticas, clínicamente sanas y con glucemia dentro de límites normales, formado por personal del laboratorio de Inmunología y de la E.N.E.P. Iztacala. Grupo B: diabéticos tipo II compensados, Grupo C: diabéticos tipo II descompensados o con descontrol agudo o subagudo al momento de la toma de la muestra, ambos grupos formados por pacientes de consulta externa de la C.U.S.I. Iztacala y hospitalizados en el Servicio de Medicina Interna del Centro Médico "La Raza" respectivamente.

### 4.1 OBTENCION DE SANGRE

A cada individuo se le tomó una muestra de 20 ml de sangre periférica por punción venosa, la cual, se dividió en tres partes:

#### 4.2 OPSONIZACION DE LEVADURAS

La primera parte de 3 ml. de sangre fue utilizada para separar el suero, en el cual se suspendió una concentración de Saccharomyces cerevisiae, de  $40 \times 10^6$  y fue incubada 30 min. a  $37^{\circ}\text{C}$ , concluido este periodo se centrifugó a 2500 r.p.m. 5 min., se resuspendieron en 1 ml. de solución hank.

#### 4.3 ENSAYO DE ENDOCITOSIS

La segunda parte de 7 ml se colocó en un tubo de ensayo con tapón de rosca, que contenía 15 perlas de vidrio para desfibrinar la sangre mediante agitación suave, Una vez desfibrinada, la sangre fue colocada sobre dos cubreobjetos desengrasados dentro de cajas petri e incubadas a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 30 min., concluido este período la sangre se retiró y se realizaron tres lavados con solución hank para eliminar las células que no se adhirieron al vidrio. Posteriormente dentro de la caja petri se agregaron 2 ml de solución hank + 0.2 ml de NBT (azul de nitro-tetrazolio)(SIGMA N 6876) al 0.1% y 0.1 ml de Saccharomyces cerevisiae en solución, previamente ajustadas a una concentración de  $4 \times 10^6$  cel/ml.



y opsonizadas con el suero de cada sujeto respectivamente y se incubaron durante 30 min. a 37°C. Al término de este periodo fue retirado el sobrenadante y cada cubreobjetos se lavó tres veces con solución hank y dos más con solución salina 0.85%, se escurrieron unos segundos, se tiñeron con safranina tres minutos, se lavaron con agua destilada para retirar el exceso de colorante, se dejaron secar a temperatura ambiente y se montaron con resina sintética.

#### **4.4 ENSAYO DE QUIMIOTAXIS**

La tercera parte de la muestra (10 ml) se mezcló con 3 ml de gelatina al 3% en solución alsever y se incubó en un tubo de ensaye en posición vertical durante 30 min. a 37°C, al término de este periodo se recuperó la fase superior donde se han separado las células blancas y se le agregó solución alsever hasta completar el volumen del tubo, se resuspendió y se centrifugó a 2000 r.p.m. durante 10 min., se desechó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió nuevamente en solución alsever, este procedimiento se repitió dos veces más y después se resuspendió en 2 ml de solución hank, en este paso las células fueron contadas en una

cámara de Neubauer, y se ajustaron a una concentración de  $2 \times 10^6$  cel/ml y se colocaron dentro del compartimiento superior de una cámara de Boyden (14) modificada (modificación realizada en el laboratorio de Inmunología UMF, Campus Iztacala), la cual, fue previamente ensamblada separando los compartimientos por dos membranas, la primera de 13 mm. de diámetro, con  $5 \mu\text{m}$  de poro tubular de policarbonato (Millipore cat. no. TMTPO1300) y la segunda o inferior de triacetato de celulosa del mismo diámetro y  $3 \mu\text{m}$  de poro en forma de malla (Metricel GA-1, Gelman Science Inc).

En el compartimiento inferior de la cámara se colocó 0.1 ml de N-formil-met-leu-phe (SIGMA F 3506) a una concentración de  $10^{-8}$  M y se agregó solución hank llenando completamente el compartimiento evitando la formación de burbujas. Otra cámara se le agregó 0.1 ml de suero autólogo activado previamente con zimosán (SIGMA Z4250) y mezclado con solución hank y una más con 0.1 ml de suero stock activado de la misma manera que el anterior y en solución hank. El control conteniendo únicamente solución hank. En todos los casos, los experimentos fueron realizados por duplicado. Una vez ensambladas las 8 cámaras se incubaron a  $37^\circ\text{C}$  durante 3 hrs.

#### **4.5 PREPARACION DE MEMBRANAS**

Después de este período las membranas fueron recuperadas, lavadas con solución hank y una vez más con agua destilada, fueron teñidas con hematoxilina de Erlich y lavadas con agua destilada, se secaron, se clarearon con xileno y se montaron con resina sintética.

#### **4.6 CONTEO DE CELULAS**

Las preparaciones de la prueba de quimiotaxis, una vez montadas, se observaron al microscopio óptico con el objetivo de 40X y se contaron 30 campos escogidos en forma escalonada, se obtuvo el valor de la media y se compararon los tres grupos por medio de una prueba estadística de análisis de varianza, mientras que para fagocitosis se contaron 100 células muestra/individuo, para establecer un promedio y un porcentaje de endocitosis y digestión para comparar los tres grupos en la misma forma que en la anterior.

## RESULTADOS

### 5.1 QUIMIOTAXIS

Se compararon las respuestas de tres grupos de estudio: Grupo A (grupo control), Grupo B (diabéticos compensados) y Grupo C (diabéticos descompensados), con tres diferentes quimioatrayentes N-FMLP, suero autólogo activado con zimósán y un suero stock activado con zimósán, las respuestas obtenidas fueron las siguientes:

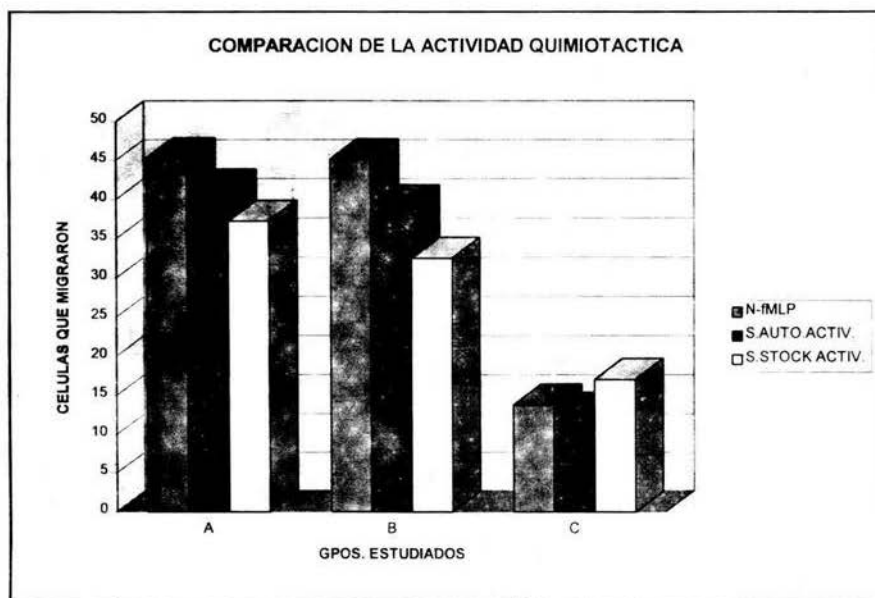
(grafica N° 1)

1.- Los valores obtenidos de células que migraron a los estímulos de N-FMLP, no mostraron diferencias significativas entre el grupo A (45.23) y el B (45.12) pero ambos mostraron una diferencia considerable con respecto a C (13.80).

2.- Para la prueba de migración por estímulo de suero stock se observó, un comportamiento similar al anterior, solo que los números de células que migraron de A (37.25) y B (32.52) fueron menores en comparación a los obtenidos con N-FMLP, mientras que el número de

células que migraron de C (17.06) aumentó en comparación con el mismo .

3.- Para el tratamiento con suero autólogo se mantiene el mismo comportamiento, A (41.18) y B (39.25) aunque los valores se incrementaron un poco con respecto al tratamiento anterior, con excepción del grupo C, (12.75) el cual presenta el valor más bajo a dicho estímulo.



Gráfica No 1- Se muestra la comparación en la quimiotaxis entre el grupo A (Control), B (Diabéticos compensados) y C (Diabéticos descompensados), pudiendo observarse diferencias de consideración del grupo C, con respecto a los otros grupos.

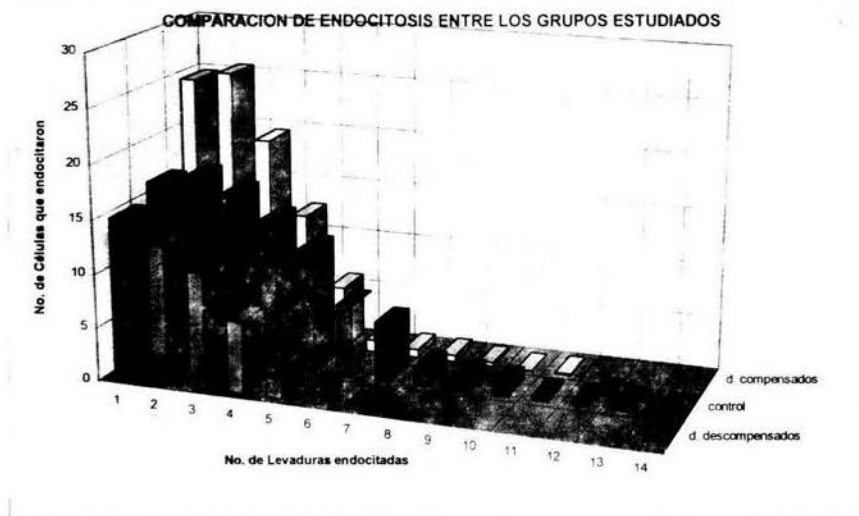
## 5.2 ENDOCITOSIS (INGESTION)

Para evaluar el proceso de endocitosis en los grupos A, B, y C, se midieron el número de células que endocitaron y el número promedio de levaduras endocitadas, se obtuvo lo siguiente:(gráfica N° 2)

1.- En el grupo A observamos que los valores de ingestión promedio más altos, fueron de 8 a 14 levaduras endocitadas por menos de 5 células y encontramos de 5 a 16 células que han endocitado dentro del rango de 1 a 7 levaduras.

2.- El Grupo B muestra sus valores más altos entre 6 y 11 levaduras endocitadas por menos de 5 células y la ingestión de 1 a 5 levaduras fue realizada por 5 a 24 células.

3.- Para el Grupo C los valores disminuyen considerablemente en comparación con los grupos anteriores encontrando como máximo de 5 a 7 levaduras endocitadas por 1 a 5 células y de 1 a 4 levaduras endocitadas por 6 a 15 células.



**Gráfica No 2-** Se muestra la comparación en el número de células que han endocitado, así como, el número de levaduras endocitadas por éstas, entre los grupos : A) Control, B) D. compensados y C) D. descompensados.

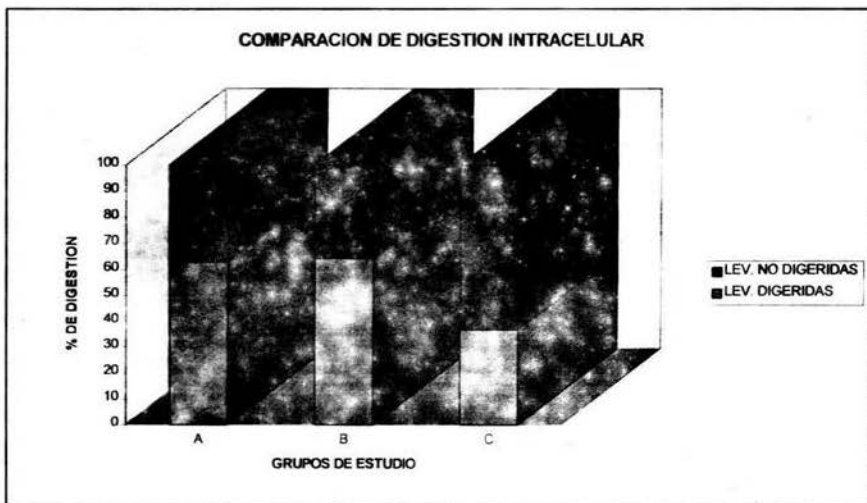
### 5.3 DIGESTION

La evaluación de los procesos digestivos evidenciados por la reducción de NBT se realizó como una prueba cualitativa para comparar el porcentaje de levaduras ingeridas y digeridas (reducidas) entre los grupos A, B, y C. Los datos son los siguientes: (gráfica N° 3)

1.- El valor del porcentaje promedio de levaduras digeridas en el Grupo A fue de 62.86% y de 37.14% para levaduras no digeridas .

2.- Para el Grupo B los valores del porcentaje promedio se comportaron relativamente similares a los del Grupo A, siendo de 64.23% para levaduras digeridas y de 35.77 para levaduras no digeridas

3.- Los resultados arrojados por el Grupo C son significativamente bajos en comparación con los Grupos A y B, ya que este muestra un valor en porcentaje promedio para levaduras digeridas de 36.74% mientras que para levaduras no digeridas es de 63.26% .



Gráfica No 3- Se muestra la comparación del porcentaje de digestión entre los grupos A (Control), B (Diabéticos compensados) y C (Diabéticos descompensados).



## ANALISIS DE RESULTADOS

### 6.1 QUIMIOTAXIS

Los resultados obtenidos con los tres quimioatrayentes estudiados, revelan una disminución considerable de la quimiotaxis en células de diabéticos que sufren una descompensación, sin embargo, podemos observar que la respuesta celular a los distintos estimulantes es diferente, de tal manera que el N-FMLP obtuvo la mayor respuesta, probablemente por ser el quimiotáctico más potente, aunado a la concentración que se usó y que se ha demostrado es la que produce la respuesta más enérgica.

(6)

Podemos observar también que la respuesta tanto de pacientes diabéticos compensados y el grupo control a suero autólogo activado es en promedio poco más elevada que al suero stock activado, sin embargo, la respuesta de pacientes diabéticos descompensados parece mejorar con el suero stock activado, esto seguramente se debe a que los niveles tanto de glucosa, como de insulina, ácidos grasos y iones, se encuentran en niveles anormales en el suero autólogo, lo cual afecta las funciones de

adhesión de la célula y de movilización del citoesqueleto así como de consumo interno de energía que imposibilita estas y otras funciones de las células. (31,83)

Los resultados de otros experimentos (59) y los nuestros propios, nos permiten sustentar la hipótesis de que la base del daño en el mecanismo de defensas del enfermo diabético con hiperglucemia resulta de una interacción anormal entre glucosa y proteínas plasmáticas y membranales, más que defectos intrínsecos en las funciones de las células. Por otra parte ha sido demostrado que la hiperglucemia esta directamente correlacionada con las complicaciones que se presentan durante la diabetes (glucosilación no enzimática de las proteínas y alteraciones en el metabolismo de lípidos).

Se ha sugerido que los productos finales con avanzada glucosilación (AGEs), juegan un papel central en la patogénesis de las complicaciones de diabéticos, esto ocurre por tres mecanismos generales. Primero AGEs alteran la señal de transducción involucrando ligandos en la matriz extracelular. Segundo, AGEs alteran el nivel de señales solubles tales como citocinas, hormonas y radicales libres, a través de interacciones con

receptores celulares específicos para AGEs. Y tercero, Glucosilación intracelular por glucosa, fructosa y metabolitos intermediarios, que pueden alterar la función de proteínas en tejidos blanco. (83)

## 6.2 ENDOCITOSIS (INGESTION ) Y DIGESTION

Los procesos de endocitosis también se ven afectados de manera significativa en el grupo de pacientes diabéticos con descompensación tanto en el número de células que endocitaron como en el número de levaduras endocitadas, en comparación con los otros grupos estudiados. Se sabe que como consecuencia del estado hiperglucémico ocurren daños severos a mecanismos humorales de defensa del hospedero, incluyendo una variedad de funciones como: adhesión, quimiotaxis, endocitosis y muerte intracelular (69-78). Estas afecciones se deben a una combinación multifactorial que involucra daño opsónico de C3, ya que se sabe que la glucosa actúa como aceptor alternativo para C3 (58,72,73) y el daño que causan los radicales OH, se atenúa como resultado de que la glucosa actúa como un antioxidante en algunas reacciones de oxido-reducción, y en elevadas concentraciones (>400 mgs./dl.)(61) altera las funciones de este

radical OH disminuyendo la efectividad de la lisis intracelular, y de otras vías metabólicas en las que interviene (61), esto ayuda a explicar la marcada disminución en los procesos digestivos en el grupo de diabéticos descompensados en comparación con los grupos control y de diabéticos compensados. La hiperosmolaridad también afecta la polimerización de actina, así como algunos mecanismos moleculares de membrana y la alteración de la función de proteínas intracelulares entre otros.(31)

Por otro lado, se sabe que los monocitos realizan glicólisis aerobia y a diferencia de los neutrófilos tienen deficientes almacenes de glucógeno, por lo tanto requieren suministros externos constantes. Esta característica hace evidente la importancia de la vía glucolítica y el transporte indispensable de los azúcares al citoplasma (insulina) ya que proveen de la energía requerida para las actividades de motilidad, esta glicólisis es el resultado de la conversión de glucosa a lactato (las cuatro enzimas necesarias para gluconeogénesis no han sido detectadas en leucocitos).

Los neutrófilos también metabolizan glucosa por la vía de la hexosa-monofosfato y esta vía es de especial importancia porque provee

el NADPH necesario para la generación de oxidantes microbicidas. En modelos de ratas diabéticas con elevadas concentraciones de glucosa se afectan funciones como el estallido respiratorio (53,75,78), siendo una causa posible la glucosilación de proteínas. Agregado a las evidencias de que durante el estado hiperglucémico ocurren modificaciones tanto en receptores de la superficie celular, como en proteínas intracelulares (83), que en conjunto permiten explicar las complicaciones en el sistema de defensa celular y obviamente la recurrencia y severidad de infecciones en enfermos diabéticos descompensados.

Los resultados de los tres grupos son coincidentes con la prueba estadística de análisis de varianza, que indica que al menos uno de los tres grupos posee diferencias significativas.

## CONCLUSIONES

Las actividades quimiotácticas y fagocíticas, tanto de neutrófilos como de monocitos, de diabéticos tipo II con descontrol metabólico agudo se encuentran afectadas significativamente en comparación con los grupos de diabéticos compensados y sujetos no diabéticos.

No se observaron diferencias significativas entre diabéticos compensados y controles.

Se sugiere que las deficiencias observadas en los fagocitos, se deben a alteraciones multifactoriales, en la que participan probablemente eventos promovidos por hiperglucemia, ya sea sobre proteínas estructurales o plasmáticas (glucosilación no enzimática), y que se manifiestan como cambios disfuncionales en las proteínas constitutivas de la matriz extracelular y que probablemente genere anomalías en la producción de citocinas y otros mensajeros solubles mediados por receptor, así como alteraciones en las funciones de proteínas intracelulares que originen deficiencias en adhesión, opsonización, mecanismos de reconocimiento molecular mediados por receptor a nivel

de membrana, señalización transmembranal y polimerización de proteínas involucradas en movimiento de citoesqueleto. Estas múltiples alteraciones generan el daño en quimiotaxis, diapedesis, ingestión y digestión celular. (83).

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- 1.- Tauber AI, Chernyak L. 1991. Metchnikoff and the origins of Immunology. Oxford University Press. NY USA.
- 2.- Williams JW, 1990. Hematology. 4a ed. Ed Mc Graw-Hill. New York. USA. 761-834, 859-902
- 3.- Stites DP, Terr AI. 1991. Inmunología básica y clínica. 7a ed. Ed Manual Moderno. México DF. 75,76
- 4.- Johnston RB Jr. 1988. Immunology: Monocytes and macrophages. N Engl J Med. 318:12;747-52
- 5.- Huang AJ, Furie MB, Nicholson SC. 1988. Effects of human neutrophil chemotaxis across human endothelial cell monolayers on the permeability of these monolayers to ions and macromolecules. J Cell Physiol. 135:355-66
- 6.- Migliorisi G, Folkes E, Pawlowski N. 1987. In vitro studies of human monocyte migration across endothelium in response to leukotriene B<sub>4</sub> and F-Met-Leu-Phe. Am J Pathol. 127:157-67
- 7.- Snyderman R, Goetzl EJ. 1981. Molecular and cellular mechanisms of leukocyte chemotaxis. Science. 213:830-37
- 8.- Ward PA, Dvorak HA, Cohen S. 1975. Chemotaxis of basophils by lymphocyte-dependent and lymphocyte-independent mechanisms, J Immunol, 112:5;1523-31
- 9.- Zimmerli W, Gallin JI. 1986. Monocytes Accumulate on Rebeck skin window coverslips but not in skin chamber fluid: A comparative evaluation of two in vivo migration models. J Immunol Met. 96:11-17



- 10.- Wallace PJ, Packman CH, Lichtman MA. 1987. Maturation-associated changes in the peripheral cytoplasm of human neutrophils: a review. *Exp Hematol.* 15:34
- 11.- Omary BM, Trowbridge SI, Minowada J. 1980. Human cell-surface glycoprotein with unusual properties. *Nature.* 286:8;888-90
- 12.- Ravetch JV, Kinet Jp. 1991. Fc Receptors. *Ann Rev Immunol.* 9:457-92
- 13.- Goldman DW, Goetzl EJ. 1982. Specific binding of leukotriene B4 to receptors on human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol.* 29:4;1600-4
- 14.- Boyden S, 1962. The chemotactic effect on mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leucocytes. *J Exp Med.* 115:453-66
- 15.- Rosenbach T, Czarnetzki BM. 1987. Comparison of the generation in vitro of chemotactically active LBT-4 and its W-metabolites by human neutrophils and lymphocytes/monocytes. *Clin Exp Immunol.* 69:221-8
- 16.- Norris DA, Clark RAF, Swigart LM. 1982. Fibronectin fragments are chemotactic for human peripheral blood monocytes. *J Immunol.* 129:4;1612-18
- 17.- Snyderman R, Altman LC, Hausman MS. 1972. Human mononuclear leukocyte chemotaxis: A quantitative assay for humoral and cellular chemotactic factors. *J Immunol.* 108:3;857-60
- 18.- Cohen S, Ward PA. 1971. In vitro and in vivo activity of a lymphocyte and immune complex-dependent chemotactic factor for eosinophils. *J Exp Med.* 133-46
- 19.- Ward PA, Volkman A. 1975. The elaboration of leukotactic mediators during the interaction between parental-type lymphocytes and F-1 hybrid cells. *J Immunol.* 115:5;1394-9

- 20.- Horwits DA, Garrett MA. 1971. Use of leukocyte chemotaxis in vitro to assay mediators generated by immune reactions. *J Immunol.* 106:3;649-55
- 21.- Altman LC, Snyderman R, Oppenheim JJ. 1973. A human mononuclear leukocyte chemotactic factor: Characterization, specificity and kinetics of production by homologous leukocytes. *J Immunol.* 110:3;801-10
- 22.- Mackin WM, Huang Chi-Kuang, Becker EL. 1982. The formilpeptide chemotactic receptor on rabbit peritoneal neutrophils: Evidence for two binding sites with different affinities. *J Immunol.* 129:4;1608-11
- 23.- Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. 1992. Endothelial cell interaction with granulocytes: Tethering and signaling molecules. *Immunology Today.* 13:3;93-9
- 24.- Linder ME, Gilman AG. 1992. G Proteins, *Scientific American.* 7:36-43
- 25.- Rossi F, DeLla Bianca V, Grzeskowiak M. 1989. Studies on molecular regulation of phagocytosis in neutrophils. *J Immunol.* 142:5;1652-60
- 26.- Alberts B, Bray D, Lewis J. 1994. *Molecular Biology of the Cell*, 3a ed. Ed Garland Publishing Inc. NY USA.
- 27.- Oppenheim JJ, Zachariae COC, Mukaida N. 1991. Properties of the novel proinflammatory supergene "intercrine" cytokine family. *Ann Rev Immunol.* 9:617-48
- 28.- Douglas SD, Musson RA, 1986. Phagocytic Defects-Monocytes/Macrophages. *Clin Immun Immunopath.* 40:62-68
- 29.- Jiang Y, Beller DI, Frenzl G. 1992. Monocyte chemoattractant protein-1 regulates adhesion molecule expression and cytokine production in human monocytes. *J Immunol.* 148:2423-28

- 30.- Carson M, Weber A, Zigmond SH. 1986. an actin-nucleating Activity in polymorphonuclear leukocytes in modulated by chemotactic peptides. *J Cell Biol.* 103:6;2707-14
- 31.- Krishna RKM, Varani J. 1982. Actin polymerization induced by chemotactic peptide and concavalin-A in rat neutrophils. *J.Immunol.* 129:4;1605-7
- 32.- Yassin R, Shefeyk J, White JR. 1985. Effects of chemotactic factors and others Agents on the amounts of actin an 65,000-mol-wt protein associated with the cytoskeleton of rabbit and human neutrophils. *J Cell Biol.* 101:7;182-8
- 33.- Chakravarti B, Schreiber RD, Müller-Eberhard HJ. 1986. Phagocytosis by human monocytes of unopsonized particulate activators of the human alternative complement pathway: Induction by cytokine. *J Immunol.* 137:3;880-85
- 34.- Ofek I, Sharon N. 1988. Lectinophagocytosis: A molecular mechanism of recognition between cell surface sugars and lectins in the phagocytosis of bacteria. *Infect Immunity.* 56:3;539-42
- 35.- Figura KV, Hasilik A. 1986. Lysosomal enzymes and their receptors. *Ann Rev Biochem.* 55:167-193
- 36.- Rojas EO, García GJE, Rodríguez L. 1980. Fagocitosis en lepra. *Dermatología. Rev Mex.* 24:36-52
- 37.- Johnson KJ, Ward PA. 1981. Role of oxigen metabolites in immune complex injury of lung. *J Immunol.* 126:6;2365-9
- 38.- Mandell BF, Ohliger D, Rella J. 1987. Rapid simultaneous assessment of neutrophil superoxide generation and lysosomal enzyme release. *J Immunol Methods.* 100:211-14

- 39.- McGarrity ST, Stephenson AH, Webster RO. 1989. Regulation of Human neutrophil function by adenine nucleotides. *J Immunol.* 142:6;1986-93
- 40.- Sibley LD, Hunter SW, Brennan PJ. 1988. Mycobacterial lipoarabinomannan inhibits gamma interferon-mediated activation of macrophages. *Infection and Immunity.* 56:5;1232-6
- 41.- Janusz MJ, Austen KF, Czop JK. 1989. Isolation of a yeast heptaglucoside that inhibits monocyte phagocytosis of zymosan particles. *J Immunol.* 142:3;959-65
- 42.- Rotrosen D, Gallin JI. 1987. Disorders of phagocyte function. *Ann Rev Immunol.* 5:127-50
- 43.- White CJ, Gallin JI. 1986. Phagocyte defects. *Clin Immunol Immunopathol.* 40:50-61
- 44.- Gutiérrez F. 1988. Alteraciones de los leucocitos polimorfo nucleares en el curso de la sepsis, *Med Intensiva,* 12:8;408-11
- 45.- Palacios RV, Montón DJM, Sanz GT. 1988. Alteraciones de la fibronectina en el politraumatizado con y sin sepsis. *Med Intensiva.* 12:412-6
- 46.- Buckley RH. 1986. Humoral Immunodeficiency. *Clin Immunol Immunopathol.* 40:13-24
- 47.- Waldmann TA. 1986. Immunodeficiency: Immunoregulation and Immunogenetics. 40:25-36
- 48.- Lohr KM, Snyderman R. 1982. Amphotericin B alters the affinity and functional activity of the oligopeptide chemotactic factor receptor on human polymorphonuclear leukocytes. *J Immunol.* 129:4;1594-99
- 49.- Wright GD, Kirkpatrick HC, Gallin JI. 1977. Effects of levamisole on normal and abnormal leukocyte locomotion. *J Clin Invest.* 59:941-50

- 50.- Yoshida T, Janeway CA, Paul WE. 1972. Activity of migration inhibitory factor in the absence of antigen. *J Immunol.* 109:2;201-6
- 51.- Martínez-Cairo CS, Ramírez LML, Davila JV. 1989. Síndrome de hipergammaglobulinemia E. *Rev Med IMSS.* 27:6;452-5
- 52.- Pereira MAA, Sannomiya P, García LJ. 1987. Inhibition of leukocyte chemotaxis by factor in alloxan-induced diabetic Rat plasma. *Diabetes.* 36:1307-14
- 53.- Sima AAF, O`Neill SJ, Naimark D. 1988. Bacterial phagocytosis and intracellular killing by alveolar macrophages in BB rats. *Diabetes.* 37: 344-9
- 54.- Jarstrand C, Holmquist L, Wiernik A. 1990. Influence of human plasma high density lipoproteins from septic patients on different functions of normal human neutrophils. *J Clin Lab Immunol.* 33:69-73
- 55.- Galdiero F, Romano CC, Folgore A. 1983. Phagocytosis in diabetic subjects: Increase in Hydrophobicity of granulocyte cytoplasmic membrane. *Experientia.* 39:1141-2
- 56.- Briggs WA, Sillix DH, Mahajan. 1983. Leukocyte metabolism and function in uremia, *Kidney International,* 24:16;S-93- S-96
- 57.- Homma Y, Onozaki K, Hashimoto T. 1982. Differential activation of phospholipids metabolism by formylated peptides and ionophore A23187 in guinea pig peritoneal macrophages. *J Immunol.* 129:4;1619-26
- 58.- Hostetter MK. 1990. Handicaps to host defense effects of hyperglycemia on C3 and *Candida albicans*. *Diabetes.* 39:271-5
- 59.- Gocke TM. 1991. Infections Complicating Diabetes mellitus. 585-600
- 60.- Vaughn M, VirellaG, López-Virella F. 1989. Diabetes. autoimmunity and arteriosclerosis. *Clin Immunol Immunopathol.* 52:414-20

- 61.- Sagone AL, Greenwald J, Krant EH. 1983. Glucose: A role as a free radical scavenger in biological systems. *J Lab Clin Med.* 101:1;97-104
- 62.- Fernandez SMA, Conejero GQR, De La Torre GR. 1988. Aminoácidos plasmáticos en la cetoacidosis diabética y en el síndrome hiperglucémico hiperosmolar no cetosico. *Med Intensiva.* 12:361-5
- 63.- Villalpando GJ, 1988. Patogenia de la aterosclerosis. *Rev Med IMSS.* 27:432-36
- 64.- Vandelight KR, Ross SA, Matheson DS. 1989 Immunologic studies of patients with diabetes mellitus who have received long term insulin therapy: Lymphocyte reactivity to insulin is correlated with impaired Immunoglobulin secretion in vitro. *Clin Immunol Immunopathol.* 53: 422-29
- 65.- Woda BA. 1991. T-Lymphocyte requirement for diabetes in RT6-Depleted diabetes-resistant BB rats. *Diabetes.* 40:423-8
- 66.- Baynes JW. 1991. Role of oxidative stress in development of complications in diabetes. *Diabetes.* 40:405-12
- 67.- Abdulkadir J, Worku Y, Schreuder GMT. 1989. HLA-DR and -DQ antigens in malnutrition-related diabetes mellitus in ethiopians: A clue to its etiology?. *Tissue Antigens.* 34:284-89
- 68.- Van Hersch JWJ, Westerhuis LWJMJ, Venekamp WJRR. 1990. Coagulation activation in diabetes mellitus. *Haemostasis.* 20:263-9
- 69.- Kozak GP. 1982. *Clinical diabetes mellitus.* WB Saunders Company. USA
- 70.- Molenaar DM, Palumbo PJ, Wilson WR. 1976. Leukocyte chemotaxis in diabetic Patients and their nondiabetic first-degree relatives. *Diabetes.* 25:2;880-83

- 71.- Mowat AG, Baum J. 1971. Chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes from patients with diabetes mellitus. *NEJM*. 284:12;621-27
- 72.- Barañao RI, Rumi LS. 1984. Inmunidad celular en diabetes mellitus. *Revista Clínica Española*. 174:1,2;7-11
- 73.- Miller ME, Baker L. 1972. Leukocyte functions in juvenile diabetes mellitus: Humoral and cellular aspects. *The Journal of Pediatrics*. 81:5;979-82
- 74.- Davidson NJ, Sowden JM, Fletcher J. 1984. Defective phagocytosis in insulin controlled diabetics: evidence for a reaction between glucose and opsoning proteins. *J Clin Pathol*. 37:783-6
- 75.- Bagdade JD, Root RK, Bulger RJ. 1974. Impaired leukocyte function in patients with poorly controlled diabetes. *Diabetes*. 23:1;9-15
- 76.- Nielson CP, Hindson DA. 1989. Inhibition of polymorphonuclear leukocyte respiratory burst by elevated glucose concentrations in vitro. *Diabetes*. 38:1031-35
- 77.- Qvist R, Larkins RG. 1981. Decreased stimulated glucose oxidation and iodination by polymorphonuclear leukocytes from insulin-treated diabetic subjects. *Diabetes*. 30:256-60
- 78.- Gin H, Brottier E, Aubertin J. 1984. Influence of glycaemic normalisation by an artificial pancreas on phagocytic and bactericidal functions of granulocytes in insulin dependent diabetic patients. *J Clin Pathol*. 37:1029-31
- 79.- Markert M, Cech P, Frei J. 1984. Oxygen metabolism of phagocytosing human polymorphonuclear leucocytes in diabetes mellitus. *Blut*. 49:447-455.
- 80.- Yki-Järvinen H. 1994. Pathogenesis of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *The Lancet*. 343: 91-4

81.- Williams G, 1994. Management of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *The Lancet*. 343:95-100

82.- Clark CM, Lee DA. 1995. Prevention and treatment of the complications of diabetes mellitus. *NE J Med*. 5:1210-7

83.- Brownlec M. 1994. Glycation and diabetic complications. *Diabetes* 43:836-41