



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**REMOCION PULMONAR DE Staphylococcus aureus
EN RATONES CON DIABETES MELLITUS INDUCIDA
EXPERIMENTALMENTE CON ALOXANA.**

T E S I S

Que para obtener el Título de

B I O L O G O

p r e s e n t a

VERONICA ALEJANDRA MONDRAGON JAIMES

Asesores:

MVZ. Carlos Alberto Ramírez Tabche

MVZ. MSc. PhD. Alfonso López M.

MVZ. Ricardo Navarro Fierro



Mayo 1984



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.

RESUMEN

Debido a la frecuente asociación que existe entre la Diabetes Mellitus e infecciones bacterianas, se estudió la remoción bacteriana pulmonar en ratones diabéticos inoculados con aerosoles conteniendo Staphylococcus aureus en suspensión. Un grupo de 88 ratones fueron tratados con aloxana por vía intravenosa y otro grupo de 56 ratones permaneció como testigo. Una vez nebulizados, se sacrificaron ratones a las 0, 4, 12 y 24 horas, y se determinó el número de bacterias por gramo de pulmón. No se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$), en el número de bacterias eliminadas entre los grupos de ratones diabéticos y testigos.

LISTA DE CONTENIDO

| | Página |
|---------------------------------------|--------|
| I. INTRODUCCION | 1 |
| II. REVISION DE LA LITERATURA | 3 |
| III. MATERIAL Y METODOS | 23 |
| 1. Animales experimentales | 23 |
| 2. Inducción de la Diabetes Mellitus | 24 |
| 3. Preparación del inóculo | 25 |
| 4. Cámara de exposición al aerosol | 27 |
| 5. Remoción bacteriana | 29 |
| 6. Determinación de glucosa en sangre | 31 |
| 7. Muestras para histopatología | 32 |
| 8. Análisis estadístico | 33 |
| IV. RESULTADOS. | 35 |
| V. DISCUSION. | 44 |
| VI. CONCLUSIONES | 48 |
| VII. APENDICE | 49 |
| VIII. REFERENCIAS | 54 |

INTRODUCCION

La Diabetes Mellitus frecuentemente se describe como una enfermedad metabólica que inhibe las defensas antibacterianas en el organismo (4)(36).

Algunos investigadores han demostrado anormalidades en las funciones fagocíticas de los granulocitos, como quimiotaxis, fagocitosis y digestión intracelular de microorganismos bajo esta condición (24)(36).

También se ha estudiado, aunque en menor grado, el efecto de la Diabetes Mellitus en la respuesta inmunológica contra organismos infecciosos (24)(28).

El aparato respiratorio es uno de los que frecuentemente son infectados por bacterias en individuos que presentan defensas disminuídas. También se ha observado que las neumonías bacterianas son secuelas de las defensas alteradas de los individuos diabéticos. Uno de los métodos más frecuentemente utilizados para el estudio de la capacidad del pulmón para destruir bacterias inhaladas, es el llamado método de la remoción bacteriana. Esta técnica permite exponer experimentalmente a diferentes especies animales a aerosoles con una concentra

ción conocida de bacterias y durante un tiempo controlados (37). Los animales se sacrifican y se puede calcular el número de bacterias viables en el pulmón. Este método ha permitido demostrar el efecto adverso que las infecciones virales, uremia y acidosis (27) y edema pulmonar (29) tienen sobre el pulmón .

El objetivo de este trabajo es investigar el posible efecto que la Diabetes Mellitus pueda tener en ratones experimentalmente inoculados con Staphylococcus aureus por vía aérea .

REVISION BIBLIOGRAFICA

La Diabetes Mellitus (D.M.) es una enfermedad que adquirió importancia desde el año 70 A.C. Fue en esta época cuando Arateus la describió y le dió su nombre (22). Existen registros anteriores a esta fecha en los cuales se menciona que los antiguos médicos chinos ya habían descrito un síndrome de polifagia, poliuria y poli-dipsia (22).

Thomas Willis en 1674, describió a la orina de individuos diabéticos como 'Meliflua' (5). En el siglo XVIII Dobson dió a conocer la presencia de azúcar en la orina; 29 años más tarde, Rollo trata de controlar la glucosuria por medio de una dieta adecuada (22). Morton en 1686, dió a conocer el carácter hereditario de la enfermedad. En 1859, Claudio Bernard demostró que la sangre de pacientes diabéticos presentaba un alto contenido de glucosa que rebasaba los límites normales y reconoció a la hiperglucemia como un signo cardinal de la D.M. (22).

Kussmaul en 1874, describió el coma diabético como una incapacidad por parte del paciente, para respirar (22). Hagerdorn en 1939, aplicó la primera insulina de acción prolongada (22). En 1959 Sanger, determinó

la estructura química de la insulina de buey, la secuencia de los 51 aminoácidos que la componen y posteriormente, en 1960 Smith y Nicol (22) describieron la estructura química de la insulina humana.

Alrededor de los años treinta, el 65 por 100 de los pacientes diabéticos morían antes de los 45 años en coma. Sin embargo, desde que se tiene conocimiento de la aplicación de la insulina, tal porcentaje ha disminuido hasta un 15 por 100 (13).

Actualmente, la mayoría de los pacientes diabéticos mueren después de los 65 años de edad debido a varias de las consecuencias que trae consigo el padecimiento de esta enfermedad crónica (47).

A la fecha, la D.M. sigue siendo un padecimiento de gran frecuencia. En Estados Unidos en 1973, la D.M. se registró como una de las enfermedades de mayor incidencia de muerte, ocupando el primer lugar entre las principales causas de fallecimiento (27). En el período de 1950-1965, se duplicó el número de diabéticos diagnosticados. Estudios recientes reportan la existencia aproximada de 200 millones de diabéticos en el mundo (22).

La D.M. es una enfermedad crónica con afección vascular, que se caracteriza por el trastorno en el metabolismo de los carbohidratos, lípidos y proteínas a causa de una deficiencia relativa o absoluta de insulina (47).

Existen factores constitucionales y ambientales que predisponen a la D.M. y modifican altamente la frecuencia, tal es el caso de la obesidad, ya que se ha observado que alrededor del 80 por 100 de los diabéticos con enfermedad que empieza en la madurez, son obesos y, alrededor del 60 por 100 de los individuos con sobrepeso marcado tienen alguna forma de intolerancia a los carbohidratos. Por otra parte, se ha observado que la D.M. se presenta con mayor incidencia entre los 45 y los 60 años de edad, pero también se presenta en ancianos, en jóvenes y en niños (47) Se calcula que del 3 al 5 por 100 de los diabéticos diagnosticados son niños (12)(13).

Actualmente se considera a la D.M. como una de las tres enfermedades de trastornos metabólicos más importante (13)(22).

Aparte de la obesidad, otros factores predisponentes son las ocupaciones sedentarias y, tal vez, el abuso de alcohol, nicotina, sedantes y otros medicamentos como los hiperglucemiantes (v. gr. salidiuréticos tiazídicos), tienen gran influencia en el desarrollo de la enfermedad (22).

En los niños y adolescentes la forma más común de D.M. es la llamada juvenil, la cual se caracteriza por una notable disminución del número de células pancreáticas, debido a lo cual la producción de insulina se reduce (1).

La deficiencia de insulina propicia la ce -

tosis, y el enfermo requiere la administración diaria de insulina. A este tipo de diabetes también se le llama diabetes insulinoindependiente o tipo I, para diferenciarla de la diabetes de tipo adulto o estable, no dependiente de insulina o tipo II (1)(22).

La diabetes de tipo II no presenta las alteraciones pancreáticas señaladas para la de tipo I. Lo característico de esta variedad es la resistencia a la acción de la insulina. La diabetes de tipo II puede deberse a la producción de insulina anormal, presencia de antagonistas de insulina o alteraciones en el sitio de acción de la hormona (1)(39). La obesidad es una de las causas más importantes por su frecuencia que pueden ocasionar la diabetes tipo II (1). Sin embargo, aún en sujetos no obesos, se presenta resistencia a la insulina en este tipo de diabetes (1)

Algunos autores consideran a la D.M. como una enfermedad genética que se manifiesta alterando la cinética de la insulina (47).

El hecho de que varios autores consideren a la D.M. como una enfermedad hereditaria (1)(12)(22)(47), se basa en que las probabilidades de padecer la misma, se incrementan cuando hay antecedentes diabéticos en la familia (1)(15). La forma como se transmite, aún no está bien establecida, pero en la actualidad existen partidarios que proponen tres mecanismos: autosómica recesi-

va, poligénica y heterogénica manifestada por una mutación en cualquiera de los loci posibles (47)

Dentro de los factores etiológicos que se asocian como causantes de la D.M. se puede mencionar el ayuno prolongado o la ingestión de alimento que contiene excesivas cantidades de grasa; ambos pueden producir un estado de cetosis aguda (42).

Otras de las causas que pueden manifestar una D.M. suelen ser la pancreotomía de aproximadamente el 90 por 100 del órgano. Por otra parte, la D.M. puede ser el resultado de la pancreatitis aguda, la cual, a menudo se ve acompañada de hiperglucemia y glucosuria. Aproximadamente el 33 por 100 de los pacientes que presentan pancreatitis crónica, manifiestan D.M. (6) (14) (21) (22).

Avances recientes ponen de manifiesto la relación entre infecciones virales y el desarrollo de D.M. insulinodependiente (41), esto es, virus de acción diabetogénica. Esta posibilidad se señala desde hace muchos años y son numerosos los informes que sugieren una estrecha relación entre infección y diabetes insulinodependiente. La mayor parte de las evidencias, sin embargo, son de tipo circunstancial como es el caso del aumento en la incidencia de diabetes insulinodependiente después de brotes epidémicos de parotiditis o el inicio de la sintomatología diabética en las semanas o meses siguientes a la infección viral. También se asocia el virus de la ru-

béola, especialmente en su forma de infección congénita y experimentalmente se ha logrado inducir con este virus, alteraciones en las células beta del páncreas de conejas embarazadas similares a las observadas en el páncreas de ratones infectados por el virus de la encefalomiocarditis (EMC) (15). Durante la infección viral con EMC se presenta inflamación de los islotes de Langerhans y frecuentemente se han detectado anticuerpos dirigidos contra el citoplasma o la membrana de las células beta (15)(41)

Craighead (7)(8) estudió una variedad del virus de la EMC que en el ser humano ocasionalmente da lugar a una enfermedad febril, pero que en los ratones ocasiona destrucción de las células beta y como resultado, la manifestación de la D.M. Estableció además, que sólo se presenta en algunas cepas de ratones, los cuales son susceptibles a dicho virus y que tal susceptibilidad se transmite en forma autosómica recesiva.

Por otra parte, al inocular ratones experimentalmente con el Reovirus tipo 3, se ha detectado la presencia de antígenos virales en las células beta del páncreas. Simultáneamente la infección trae consigo destrucción de las células beta, reducción del contenido de insulina pancreático y alteración de la curva de tolerancia a la glucosa (23). El virus Coxsackie B4 (CB4) produce cambios en los islotes pancreáticos que

recuerdan los observados en la diabetes juvenil y, probablemente, el estado diabético resulte de un desequilibrio entre las influencias ambientales perjudiciales y la capacidad heredada de las células beta para soportar la lesión, ya que en el diabético parecen existir trastornos en la respuesta inmune genéticamente controlada que dan lugar a una mayor susceptibilidad del páncreas a infecciones que atacan preferentemente a las células beta y al desarrollo de una reacción autoinmune contra el páncreas, que destruye progresivamente a dichas células (7)(5).

La D.M. puede tener también un origen tóxico, mediante el uso de sustancias que producen una acción citotóxica sobre las células beta del páncreas, como son: la aloxana, la estreptozotocina, D-manoheptulosa, extractos prehipofisarios ácido dehidroascórbico y otras (21)(5).

En condiciones normales las células beta del páncreas contienen insulina para uno o dos días (21). Cuando se administra a un animal cantidades adecuadas de aloxana, ésta produce acción mortal específica y rápida sobre las células beta de los islotes. Al quedar destruidas, la insulina que contienen pasa de inmediato al torrente sanguíneo (21).

La aloxana es una sustancia que se encuentra químicamente relacionada con el ácido úrico y debido a esta relación, existe la posibilidad que pueda ser producido en el organismo debido a disturbios en el metabo -

lismo de pirimidinas o purinas y por lo tanto puede ser un factor etiológico en la D.M. humana (6).

Altas dosis de aloxana producen daño en el hígado, lesiones en los túbulos contorneados distales, lesiones glomerulares remarcablemente similares a las observadas en la diabetes humana (6)(20) y lo más importante, produce necrosis en los islotes de Langerhans.

Transcurridos de 10 a 60 minutos después de la inyección de la aloxana, el citoplasma de las células beta se vuelve vacuolado, el núcleo ligeramente picnótico, las células beta se contraen dando como resultado un incremento en el espacio pericapilar (6).

Transcurridas de 5 a 24 horas posteriores a la inyección de la aloxana, puede observarse cariólisis desintegración de la membrana nuclear y muchas células destruidas (6).

Cooperstein y Watkins (6) han establecido que la inyección de aloxana produce una curva trifásica de glucemia. Existe una hiperglucemia inicial observada después de las tres horas de inoculación seguida de una hipoglucemia marcada entre las 6 y las 12 horas y una hiperglucemia permanente de las 12 a las 14 horas.

Existen evidencias considerables que ponen de manifiesto que el sitio de acción de la aloxana es la superficie celular de las células beta (6) y que el daño a las mismas puede ser debido a la reacción de la alo

xana con un sitio involucrado en el transporte de la glucosa, la liberación de insulina o ambos.

Moxley y Longmore (40) han demostrado que la diabetes inducida con aloxana y estreptozotocina, reducen la incorporación de glucosa en lípidos neutros y fracciones de fosfolípidos a nivel pulmonar, a una tasa menor al 40 por 100 de la que se observa en animales normales.

Recientes investigaciones señalan que la insulina puede desempeñar un papel muy importante en la regulación del metabolismo de los lípidos a nivel pulmonar; parece ser que influye en la síntesis de los mismos (39)(44)

Uno de los efectos más importantes de la insulina es el transporte de glucosa a nivel membrana, a casi todas las células del cuerpo. La ausencia de insulina provoca la liberación de glucosa hacia la sangre, por parte del hígado, el cual a su vez, se ve en la necesidad de sintetizar grandes cantidades de glucosa por medio de gluconeogénesis (22). Sin embargo, tiene efectos superiores el glucagón, cuya función es antagónica a la de la insulina. El glucagón, la adrenalina y la cortisona provocan hiperglucemia además, favorecen la glucogenolisis hepática (22).

Por su parte, la insulina facilita la fijación y el transporte de glucosa y su transformación en glucógeno, y el glucagón, adrenalina, cortisona y ACTH obsta

culizan este paso (5)(22).

La producción nueva de glucosa (en este caso hiperglucemia), es un proceso que se lleva a cabo mediante la movilización de las reservas corporales como aminoácidos de las proteínas y glicerol de las reservas grasas. La ruptura de las proteínas puede ser producida en todos los tejidos corporales, pero en este caso, la proteína no es sustituida por proteína de nueva síntesis. Es evidente que la consecuencia de tal efecto será la desnutrición protéica y la lipólisis, ambas produciendo pérdida de peso (5)(22).

La ausencia de insulina no solamente causa la deposición de grasa en el tejido adiposo, sino que inmediatamente se favorece la producción de ácidos grasos y glicerol, los cuales son liberados y se aumenta la concentración de los mismos en la sangre circulante (22). Al pasar éstos ácidos grasos hacia el hígado, se sintetizan triglicéridos, fosfolípidos y colesterol, que luego vuelven a la sangre en forma de lipoproteínas. La elevada concentración de lípidos, en particular el colesterol, son la causa de un desarrollo aterosclerótico en personas diabéticas (5).

No todos los ácidos grasos que penetran en el hígado son sintetizados a triglicéridos, fosfolípidos y colesterol; muchos son oxidados para formar acetil coenzi

ma-A; ésta a su vez, se condensa para formar ácido acetil acético, el cual será degradado hasta ácido hidroxibutírico y acetona (5). La presencia en sangre de grandes cantidades de estas sustancias, es llamada comunmente cetonemia y a los productos se les conoce como cuerpos cetónicos.

La concentración elevada de cuerpos cetónicos pueden producir acidosis grave que desencadene un coma diabético (12).

Los signos clínicos asociados con la cetosis incluyen anorexia, vómito, letargo, deshidratación y depresión (22).

La acidosis diabética es un efecto que se presenta, por lo general, en los casos de diabetes muy grave y no tratada, causada por los altos niveles de los ácidos mencionados (12). El aumento de los radicales ácido en los líquidos corporales, favorece la disminución de las concentraciones de sodio y la reacción de los cuerpos cetónicos con el bicarbonato, dando lugar a sales sódicas neutras como acetona sódica y otras, agua y anhídrido carbónico (22). De esta forma, la acetona sódica podrá ser eliminada por la orina (acetonuria) lo cual indica, en el caso de la D. M. que se trata de un estado avanzado de cetosis que requiere de una terapia adecuada inmediata (22). El CO_2 se elimina por vía respiratoria. La consecuencia es, una disminución de sodio y aumento de los cetoácidos que elevan, a su vez, la acidosis y disminuyen el pH de los líquidos

corporales hasta un valor de 7-6.9, valor dentro del cual el diabético puede entrar en coma (22). El descenso del pH favorece una hiperpotasemia con finalidad compensadora sin embargo, debido a la poliuria sostenida, el potasio puede ser excretado en grandes cantidades (22).

El descenso de pH sanguíneo estimula el centro respiratorio para que se incremente su actividad, esto trae como resultado una respiración rápida y profunda (respiración de Kussmaul), que ocasiona una eliminación excesiva de CO_2 y disminución considerable del bicarbonato de los líquidos extracelulares (22)(45).

A causa de la elevada glucemia, un individuo diabético puede perder diariamente de 300-500 gramos de glucosa por la orina debido a que en tales circunstancias se alcanza el umbral sanguíneo para la aparición de azúcar en la orina. La diuresis en la orina es causada por la elevada concentración de glucosa en los túbulos renales, lo que evita la resorción tubular de agua. En la glucemia alta, la glucosa no difunde fácilmente hacia el interior de las células, esto trae consigo un aumento de la presión osmótica de los líquidos extracelulares, razón por la cual se ocasiona la salida osmótica de agua desde el interior de las células hacia el líquido extracelular (21).

La alta tasa de deshidratación sostenida produ-

ce poliuria y polidipsia secundaria, los cuales son signos característicos importantes en la diabetes (5)(45).

Los principales síntomas de la diabetes son los siguientes: poliuria (alta eliminación de orina), polidipsia (toma de líquidos en grandes cantidades), polifagia (ingestión exagerada de alimentos), pérdida de peso y astenia (falta de energía) y aliento cetónico (producido por la volatilización de los cuerpos cetónicos) (5)(22).

Dentro de las lesiones pancreáticas producidas por la D.M., se ha observado el depósito amiloide de cam bios degenerativos en las células alfa y beta, como la le sión pancreática más común (12)(13).

En el 90 por 100 de los diabéticos que sobrepasan los 20 años de padecimiento de la enfermedad, se ha pod i observar un desarrollo de retinopatía, cataratas o glaucoma (12). La retinopatía se caracteriza por la dilatación de las venas y pequeñas hemorragias puntiformes, exudados y edemas retinianos, engrosamiento de los capilares reti nianos (microangiopatía) con aparición de microaneurismas (5)(22). Se menciona que la retinopatía avanzada, se acompaña con frecuencia de lesiones retinianas producidas por aterosclerosis, hipertensión arterial e insuficiencia renal, y que se caracteriza por la neovascularización y la proliferación de tejido fibroso y colágeno; ésta, por lo general, se presenta en el diabético juvenil de

evolución prolongada (12)(22). Sin embargo, la aparición de la retinopatía se relaciona fundamentalmente con la duración de la diabetes (13)(45).

Los pacientes pueden presentar además, visión borrosa debido a alteraciones en la forma del cristalino. Tal alteración ocurre probablemente, debido a cambios osmóticos como consecuencia secundaria de la hiperglucemia (12).

Otras de las lesiones extrapancreáticas de la D.M. , se encuentran relacionadas con el desarrollo de una microangiopatía capilar, la cual presenta engrosamiento de la membrana basal (22)(45). Tanto las arteriolas como las venas pueden estar igualmente afectadas pero esto se presenta en un menor grado que en los capilares. Todos los capilares del cuerpo pueden verse igualmente afectados, pero los involucrados en riñón, retina y piel, son de importancia primordial (12)(22)(45). La microangiopatía trae como resultado una enfermedad renal crónica, ceguera y gangrena (22).

Actualmente se considera que la membrana basal de los capilares del glomérulo está compuesta por glicoproteína y que un aumento de la glucosa disponible para la síntesis de glicoproteína, es el causante directo de las diferencias encontradas en la membrana basal de los capilares de los glomérulos en el estado diabético (22).

A pesar de todos los orígenes que se le atribuyen al engrosamiento capilar, la mayoría de los autores coinciden en que las arterias renales de grueso calibre presentan aterosclerosis grave al igual que los capilares de la membrana basal del glomérulo, y que este tipo de lesión está relacionada con la edad o con una D.M. crónica (5) (12) (22).

Dentro de los signos manifestados por un paciente diabético, se encuentran las neuralgias, las que se manifiestan con mayor frecuencia en los nervios periféricos (22). La neuropatía puede alterar a cualquier porción del sistema nervioso.

Una de las complicaciones de la D.M., a la que se le ha dado mayor importancia, es la complicación del pie diabético. La gangrena de los pies en los pacientes diabéticos, es una complicación grave y frecuente (22) (5). Puede deberse a lesiones vasculares (pie "sin pulso") o neuropatía (pie "indoloro"), generalmente con infección o lesión agregada. La insuficiencia arterial se manifiesta por claudicación, calambres o dolor nocturno (22).

La Diabetes Mellitus puede tener otras consecuencias de igual gravedad que las mencionadas con anterioridad, como lo es el incremento de la susceptibilidad a las infecciones. Las alteraciones de los mecanismos de defensa contra varios agentes infecciosos en la

diabetes, son una de las causas que contribuyen a la elevada tasa de mortalidad de dicha enfermedad (45).

En pacientes diabéticos, una trivial infección de un dedo del pie suele ser el primer acontecimiento que desencadene una serie de complicaciones (la gangrena como acontecimiento más importante) que finalmente puede llevar a la muerte (45). Las infecciones debidas a Staphylococcus aureus son especialmente prominentes, las cuales se hacen evidentes por furúnculos y carbúnculos recurrentes (25). Son importantes y frecuentes las infecciones por hongos, usualmente moniliasis, la cual se manifiesta como candidiasis de la vagina, uñas, y ocasionalmente en la boca (25).

En ratones diabéticos se ha comprobado que existe una falla a nivel de la respuesta inflamatoria local, lo cual lleva a una rápida sepsia y muerte de los mismos (24).

La susceptibilidad a la infección ha sido descrita como un mal funcionamiento de la inmunidad celular, lo cual es debido, en parte a una falla a nivel de las células linfoides con habilidad disminuída para generar promotores de estimulación de eosinófilos y linfocitos (25).

Kasura (28) propone la existencia de receptores para la insulina en linfocitos, lo cual modula la función de los macrófagos y la interacción entre los macrófagos y los linfocitos. Debido a que los macrófagos y los linfocitos son cruciales para la formación de linfocinas, las alteraciones de estos dos tipos de células o la falta de insulina puede originar un mal funcionamiento de dichas células y por lo tanto, a nivel pulmonar, una eliminación alterada.

Otra de las causas que se considera influyen en la susceptibilidad alterada, es la inhibición en el funcionamiento de los leucocitos polimorfonucleares (39) (40). La susceptibilidad a la infección también ha sido atribuida a un deterioro en la quimiotaxis.

Saiki et. al. (46) sugieren que la principal alteración inmunológica de la D.M. es debida a una depresión de las funciones de las células T, de la actividad fagocítica de los macrófagos, o de ambos. Se sospecha que la inhibición de las funciones de las células T en individuos diabéticos es debida a la hiperglucemia (46)

Se ha comprobado además, que la fagocitosis alterada puede ser corregida con una terapia adecuada de insulina (46). Actualmente se considera que la insulina juega un papel muy importante en la interacción entre macrófagos y linfocitos (46), si ésta falta, la producción de linfocinas se verá a su vez alterada.

Investigaciones recientes (39)(44), indican que la D. M. afecta a las funciones bioquímicas del pulmón, debido a la ausencia de insulina, ya que ésta interviene en la regulación del transporte y utilización de la glucosa en el pulmón.

Morishige (39), ha identificado receptores de insulina en las membranas de células tales como los neumocitos (44); además, agrega que más del 40 por 100 de los tipos celulares que forman el pulmón, son sensibles a la insulina, y que el transporte y la utilización de la glucosa en este tejido se encuentra bajo el control de receptores específicos para la insulina.

Green y Kass (17), han mostrado que los macrófagos alveo-

lares son las principales células bactericidas en el pulmón y que existe un desajuste en las funciones celulares de los mismos en ratones diabéticos, lo cual se manifiesta en un rápido y fácil establecimiento infeccioso en el pulmón.

A la fecha, existen pruebas significativas de que el proceso de fagocitosis incluyendo quimiotaxis, adherencia de los leucocitos polimorfonucleares al endotelio y funciones microbicidas, se ven alteradas durante la D.M. (24). Uno de los factores determinantes puede ser la disminución de la energía sustrato para las funciones celulares, lo cual confiere a los ratones diabéticos una mayor susceptibilidad a las infecciones (24).

Mahmoud et. al. (36), han demostrado que una terapia adecuada con insulina en ratones diabéticos permite que este proceso sea reversible. Sin embargo, en pacientes con diabetes juvenil, una terapia adecuada con insulina y antibióticos, han sido insuficientes y la infección contribuye a un pronóstico pobre.

Otro factor estadísticamente significativo, que tiene influencia sobre los leucocitos para que fagociten Staphylococcus spp. es la cetoacidosis (4).

Bybee et. al. (4) indujeron la anormalidad de la capacidad fagocítica de los leucocitos, por medio de la suspensión de los mismos en sueros de pacientes diabéticos con acidosis; e indican, además, que existen buenas evidencias para asegurar que la acidosis en la D.M. puede convertir una infección inconsecuente de bacterias u hongos en una lesión necrótica con un rápido crecimiento de los

microorganismos. Varios autores (4)(22) apoyan la idea que durante la acidosis diabética, la migración de los granulocitos a una le si ón in fl am ato ria se ve alterada.

Esta falla en la D.M. humana se ha visto corregida cuando se trata adecuadamente la acidosis (11).

La falla fagocítica de los leucocitos en la acidosis diabética y su corrección con la eliminación de la acidosis sugieren que esta anomalía está relacionada con el estado metabólico an or mal de los carbohidratos (11).

Drachman et. al. (11) demostraron in vivo e in vitro que el defecto principal del estado diabético, reside en el suero más que en los leucocitos polimorfonucleares. Este factor depresivo fue identificado como las altas concentraciones de glucosa, cuya acción, sobre los leucocitos polimorfonucleares es, principalmente, osm ó t i ca (11).

Como se mencionó con anterioridad, las funciones bio q ú m i cas del pulmón ante un estado diabético se ven afectadas, lo cual influye en el funcionamiento de las células bactericidas del mismo.

Por muchos años ha sido estudiada la capacidad del tejido bronquiopulmonar en animales normales, para deshacerse del material extraño, incluyendo bacterias (30)(32).

Laurenzi (30) hace referencia a investigaciones encaminadas al estudio de la eliminación bacteriana a nivel pulmonar, en las cuales se expone a ratones y perros normales a una nube bacteriana y se observa la desaparición de neumococos en las secreciones bron-

quiales. Las bacterias que se encuentran en tales secreciones exceden la cantidad de 10^6 colonias por mililitro de secreción.

El interés sobre la capacidad del tejido bronquiopulmonar para eliminar bacterias ha aumentado en la actualidad y ha llevado a varios investigadores (33)(37) a diseñar cámaras de exposición de animales de laboratorio a aerosoles con bacterias suspendidas. El aerosol de bacterias es generado por una fuente de presión, por lo que el aerosol estará compuesto de pequeñas gotitas en las cuales están suspendidas las bacterias (30). Las bacterias pueden permanecer suspendidas en el aire por horas y de esta forma ser inhaladas y depositadas en el tejido pulmonar.

MATERIAL Y METODOS

1.- Animales experimentales.

Se utilizaron 144 ratones raza Albina Suiza cepa CFW con un peso promedio de 30 g obtenidos de la Granja Avícola Experimental y Bioterio de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

Se llevaron a cabo cuatro réplicas del diseño esquematizado en el cuadro 1, bajo las mismas condiciones cada vez. Para cada réplica se formaron dos grupos de ratones : tratados con aloxana y testigos (22 y 14 ratones respectivamente).

CUADRO 1.- Número de ratones en cada réplica y diseño del experimento.

| TRATAMIENTO | TIEMPO DE SACRIFICIO POSTINOCULACION | | | | | Total |
|-------------|---|---|----|------|---------|-------|
| | 0 | 4 | 12 | 24 h | 14 días | |
| Aloxana | 4 | 4 | 4 | 4 | 6 | 22 |
| Testigos | 2 | 2 | 2 | 2 | 6 | 14 |
| Total | 6 | 6 | 6 | 6 | 12 | 36 |

Ambos grupos fueron expuestos a aerosoles con bacterias suspendidas de Staphylococcus aureus y sacrificados posteriormente a diferentes tiempos postinoculación: 0, 4, 12 y 24 h.

Los animales sacrificados a las dos semanas de la inoculación (6 ratones tratados con aloxana y 6 normales), se mantuvieron con agua y comida ad libitum durante los 14 días, para observar si la exposición al aerosol con bacterias provocaba muertes por neumonía.

2.- Inducción de la Diabetes Mellitus.

La inducción de la Diabetes Mellitus se llevó a cabo por medio de aloxana¹ (monohidrato cristalino de aloxana); sustancia ampliamente conocida y demostrada como tóxica para las células beta de los islotes de Langerhans (6)(45).

Para cada réplica se indujo la Diabetes Mellitus en un lote de 25 ratones que se mantuvieron en ayuno por 48 h

¹ Alloxan monohydrate, Sigma Chem. Com. St. Louis Mo.

con agua ad libitum, ya que la habilidad de la aloxana se ve inhibida por la presencia de niveles normales de glucosa sanguínea (6). La aloxana fue inoculada en una de las venas de la cola en una dosis de 70 mg por kilogramo de peso, previamente diluída en solución salina fisiológica. El volumen inoculado por ratón fue de aproximadamente 0.2 ml.

3.- Preparación del inóculo.

Las cepas liofilizadas de Staphylococcus aureus (ATCC 292-23), que se utilizaron para la preparación del inóculo, se obtuvieron del Departamento de Bacteriología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM.

La cepa liofilizada de S. aureus se sembró en agar soya tripticasa (ISA) y se incubó la placa por espacio de 24 horas. De este cultivo se tomaron 4 ó 5 colonias y se sembraron en 25 ml de caldo infusión cerebro y corazón (CICC), contenido en matraces de 50 ml de capacidad para permitir una mejor oxigenación del medio. El caldo se incubó a 37°C en un baño María¹ con agitación durante 12 horas. Trascurrido este tiempo, se tomaron 20 ml del caldo y se resembraron en 100 ml de CICC

¹ Forma Scientific, M. Ohio U.S.A.

en matraces de 250 ml de capacidad. La resiembra se mantuvo en el baño María por 2 h.

Posteriormente se centrifugó el caldo a 10,000 rpm por 10 min a 10°C¹. El centrifugado se decantó y el sedimento se resuspendió en 100 ml de solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.2); se homogenizó y se centrifugó nuevamente bajo las mismas condiciones, para lavar las células bacterianas del caldo utilizado, se decantó y se resuspendió una vez más en sólo 6 ml de solución amortiguadora. A partir del homogenizado se ajustaron 9 ml del mismo a una absorbancia de 1.3 en un espectrofotómetro² a 620 nm de longitud de onda.

La concentración de bacterias en el inóculo se conoció a partir de diluciones seriadas de dicho inóculo ajustado desde 10⁶ hasta 10¹⁰ sembrando tres gotas de 25 microlitros de cada dilución de S. aureus en TSA. Las placas se dividieron en tres secciones para contener las gotas de tres diluciones diferentes y se incubaron a 37°C durante 24 horas.

Se contaron las UFC en las diferentes diluciones donde fue posible hacerlo y se ajustó con el factor de dilución, de esta forma se obtuvo la cantidad de bac

1 Centrífuga refrigerada J2-21 Beckman Inst. Inc. Fullerton., CA., U.S.A.

2 Bausch & Lomb, Rochester, N.Y., U.S.A.

terias por mililitro a la absorbancia anteriormente mencionada.

$$\text{No. de bacterias por mililitro} = \frac{\text{UFC}}{0.075} \times \frac{1}{\text{Fac. dil}}$$

Donde:

UFC = Número de colonias presentes en las tres gotas a una dilución contable .

Fac. dil = Factor de dilución

$\frac{1}{\text{Fac. dil}}$ = Inverso del factor de dilución al que se realizó la siembra y la cuantificación de las UFC. Esto es:

$$\frac{1}{10^0} = 1 \qquad \frac{1}{10^{-2}} = 100$$

$$\frac{1}{10^{-1}} = 10 \qquad \frac{1}{10^{-3}} = 1000$$

0.075 = Volumen de la solución sembrada en las cajas de petri (3 gotas de 0.025 ml = 0.075 ml)

La concentración del inóculo se obtuvo a partir del promedio del número de bacterias por mililitro en las diferentes diluciones donde fue posible hacerlo.

4.- Cámara de exposición al aerosol

La inoculación por exposición al aerosol, se llevó a cabo mediante la técnica utilizada por Martínez Burnes (37) que es una modificación de los procesos utilizados (30). Con ésta se garantiza una buena inoculación al distribuir y fragmentar homogéneamente las partículas, lo que permite la llegada de las bacterias hasta los alveolos pulmonares.

La cámara del aerosol es de acrílico (47 cm de largo, 34.5 cm de ancho y 21.5 cm de altura) y presenta cuatro perforaciones laterales y una en la parte superior (con 21 cm de diámetro) que permite la entrada de jaulas pequeñas al interior de la cámara, dentro de las cuales se colocan a los ratones en grupos de siete. Esta perforación se asegura hermeticamente antes de exponer a los ratones a la nebulización.

La nebulización se llevó a cabo por medio de una fuente de aire con una compresora, la cual genera una presión que llega a tres nebulizadores² donde se depositó el inóculo bacteriano. Los nebulizadores son colocados en cada una de las perforaciones laterales. El inóculo sale de los nebulizadores en forma de aerosol, el cual se distribuye en la cámara y es inhalado por los ratones. Simultáneamente y mediante un filtro apropiado se indujo una corriente de vacío o salida de la cámara para que formara una circulación interna y se distribuyera homogéneamente el inóculo, este efecto se ilustra en la figura 1. El filtro fue colocado en la cuarta perforación. El aire se extrajo de la cámara mediante una bomba de vacío. Todo el aire extraído pasaba al fondo de un recipiente que contenía fenol al 5 por 100. La exposición al aerosol se realizó dentro de una

1 DeVilbiss Mod 645, Co, Somerset, P.A., U.S.A.

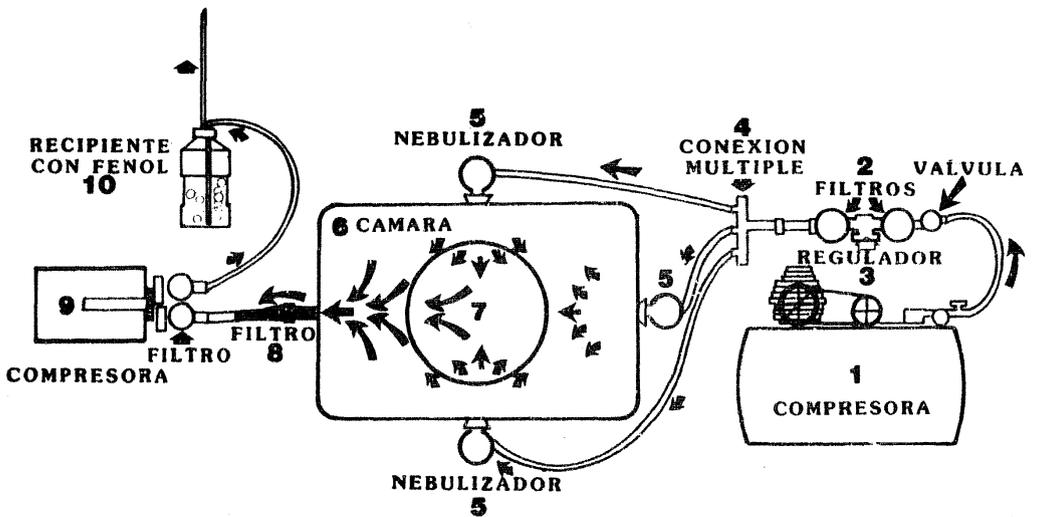


Fig. 1 Aparato de inoculación por aerosol (Diagrama de flujo de aire)

campana de extracción la que se encendía al momento de instalar las conexiones de la cámara. Con esto se garantizó la seguridad de los operadores.

Se nebulizaron 8 ml de inóculo de S. aureus en cada réplica, el que se consumía en 10 minutos.

Tanto los ratones normales como los tratados con aloxana, fueron nebulizados.

Se tomaron al azar cuatro ratones tratados con aloxana y dos normales cuatro horas antes de exponerlos al inóculo bacteriano, y se les mantuvo en ayuno. Estos ratones fueron sacrificados a la hora cero.

Cuatro horas antes de sacrificar a los ratones, se les mantenía en ayuno con agua ad libitum: esto se hacía con la finalidad de lograr mayor precisión en la lectura de la concentración de glucosa en la sangre al momento del sacrificio.

5.- Remoción bacteriana.

Después de la exposición de los ratones al aerosol bacteriano, se procedió a sacrificarlos en los siguientes tiempos: 0, 4, 12 y 24 horas. Cada ratón fue sacrificado con pentobarbital sódico¹ a una dosis de 7.87 mg por gramo de peso (0.125 ml) por vía intraperi-

¹ Anestosal, Lab. Norden de México.

ritoneal, pesado en una balanza analítica digital¹ y sus datos fueron registrados. Posteriormente se colocaron en decúbito dorsal en una plataforma de madera con parafina. La región ventral se desinfectó con una solución de cloruro de benzalconio². Los ratones fueron desangrados por la arteria renal para obtener una muestra de sangre y posteriormente determinar la concentración de glucosa en la misma.

Después de desangrados los ratones, los pulmones fueron removidos asépticamente, se separaron los bronquios extrapulmonares y el corazón, se pesaron los pulmones y se colocaron en tubos maceradores³ de vidrio (19 x 150 mm y 16 x 150 mm), adicionando 5 ml de solución amortiguadora de fosfatos (pH 7.2), después se homogenizaron con ayuda de un rotor⁴ de velocidad variable. Esto se hizo por separado para cada ratón.

El homogenizado del pulmón, con una concentración inicial de 10^0 , se diluyó serialmente hasta obtener la dilución 10^3 . De cada homogenizado se tomaron tres gotas de 24 microlitros cada una y se sembraron en cajas de petri con TSA; después se incubaron a 37°C por 24 h.

1 Ohaus Scale Corporation, N.Y., U.S.A.

2 Equipos Médicos Quirúrgicos, México.

3 Pyrex, Corning Glass Works, N.Y., U.S.A.

4 Caframo, Ontario, Canadá.

en una estufa bacteriológica.

Se calculó el número de bacterias por gramo de pulmón a través del número de UFC cuantificadas en la siembra de cada dilución (10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3) :

$$\text{No. de bacterias g. pulmón} = \frac{1}{0.075} \times 5 \times \frac{1}{\text{Fac. dil.}} \div \text{g. Pul.}$$

5 = Número de mililitros de solución-amortiguadora de fosfatos adicionados al tubo donde se maceraron los pulmones.

0.075 = Volumen de solución sembrado en las cajas de petri (3 gotas de 0.025 ml = 0.075 ml).

Después se promediaron los resultados, excluyéndose los que tenían un número excesivo de bacterias, ya que éstos fueron imposibles de contar. También se excluyeron los que no mostraron crecimiento bacteriano. Este promedio se utilizó como medida del número de bacterias por gramo de pulmón en el ratón.

6.- Determinación de la glucosa en sangre.

Obtenidas las muestras de sangre, se determinó la concentración de glucosa por ratón por el método de la ortotoluidina. Las muestras fueron centrifugadas¹ a 3,000 rpm por 10 min. Trascorrido este tiempo se tomaron 50 microlitros de suero de cada muestra y se colocó

¹ Baird & Tatlock. London. BTL. Bench Centrifuge.

ron en tubos de vidrio. A cada muestra se le adicionó 0.45 ml de agua destilada y 3.5 ml de ortotoluidina. Se preparó también una muestra blanco y una estandar. El blanco se preparó con 0.5 ml de agua destilada y 3.5 ml de ortotoluidina y el estandar fue preparado con 0.45 ml de agua destilada y 50 microlitros de patrón de glucosa. El patrón de glucosa se preparó con 100 mg de glucosa en 100 ml de solución salina fisiológica.

Se colocaron los tubos en un baño María¹ a 100°C por 10 minutos y posteriormente se hicieron las lecturas de concentración de glucosa individualmente en un espectrofotómetro² a 650 nm.

La determinación de glucosa se hizo para todos los ratones sacrificados. (9)

7.- Muestras para histopatología.

De cada ratón se tomaron ambos riñones y se fijaron en formaldehído amortiguado al 10 por 100. Las muestras fueron procesadas por medio de la técnica de inclusión en parafina (34), se hicieron cortes de cuatro micras de espesor y se tiñeron con hematoxilina y eosina.

1 BT3 Grant Instruments L.T.D. (CB2 5Q).

2 Spektralphotometer FM2. DL. Zeiss. West Germany.

Posteriormente se estudiaron los cortes al microscopio y se anotaron las lesiones encontradas en cada caso.

8.- Análisis estadístico.

Se obtuvieron las medias de peso vivo, número de bacterias, número de bacterias por gramo de pulmón, remoción pulmonar y su desviación estandar.

Se realizó un análisis de covarianza para establecer el efecto de grupo, réplica experimental, tiempo (horas postinoculación) y su interacción sobre la variable número de bacterias por gramo de pulmón, y la relación de ésta con la glucemia.

El análisis de covarianza se realizó utilizando el siguiente modelo:

$$Y_{ijk} = \mu + H_i + \beta_1 G_{ijk} + \beta_2 (H_i * G)_{ijk} + R_j + E_{ijk}$$

Y_{ijk} = Número de bacterias por gramo de pulmón, en la Hora_i, Réplica_j, K-ésimo ratón.

μ = Media general.

H_i = Efecto del i-ésimo tiempo de sacrificio post inoculación (0, 4, 12 y 24 h).

$\beta_1 G_{ijk}$ = Efecto de la relación lineal entre glucemia y Y_{ijk}

$\beta_2 (H_i * G)_{ijk}$ = Efecto de la interacción tiempo glucemia.

R_j = Efecto de réplica experimental

E_{ijk} = Efecto de error aleatorio

Las comparaciones múltiples de medias para los factores que resultaron con un efecto significativo, se realizaron mediante la prueba de Tuckey modificada para muestras de diferente tamaño (16).

RESULTADOS

El depósito de S. aureus inmediatamente después de terminada la inoculación varió considerablemente entre las diferentes réplicas (Cuadro 1), y se encontró una correlación negativa altamente significativa ($r=-0.59$) ($p < 0.01$) entre la concentración inicial del inóculo y la deposición de bacterias a la cero horas.

Se encontró una marcada variabilidad en los niveles medios de glucosa sanguínea en el grupo de ratones tratados con aloxana. Algunos de estos valores de glucosá se confundieron con los valores basales del grupo no tratado con aloxana (Cuadro 2).

Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) en el número de bacterias por gramo de pulmón entre las diferentes horas de muestreo (0, 4, 12 y 24). Mediante la prueba de Tuckey, se observaron diferencias entre los cuatro intervalos de tiempo. Sin embargo, no se encontró una relación lineal significativa ($r= 0.22$) entre los niveles de glucemia y el número de bacterias que permanecieron viables en el pulmón.

CUADRO 1. Concentraciones de inóculo y depósito de S. aureus en los pulmones de ratones tratados con aloxana y testigos inocu- lados por aerosol.

| No. de Réplica | Inóculo (No. de UFC/ml) | Depósito a las cero horas (No. de UFC/ ml) | Coefficiente de correlación. |
|----------------|----------------------------|--|---------------------------------|
| 1 | 9.152×10^8 | 8.062×10^5 | r = - 0.597 |
| 2 | 1.250×10^9 | 1.482×10^6 | |
| 3 | 5.380×10^9 | 1.380×10^6 | |
| 4 | 2.660×10^{13} | 7.790×10^5 | |

CUADRO 2. Valores promedio y desviación estandar de glucemia entre los grupos tratados con aloxana y testigos, obtenidos a los diferentes lapsos postinoculación.

| GRUPO | MEDIA (n) | DEV. ESTD. |
|----------------------|---------------|------------|
| Para toda la muestra | 116.75 (n=91) | 70.63 |
| Grupo Testigos | 105.22 (n=31) | 46.88 |
| Hora 0 | 145.71 (n= 7) | 72.99 |
| Hora 4 | 95.37 (n= 8) | 34.47 |
| Hora 12 | 89.13 (n= 8) | 30.26 |
| Hora 24 | 95.75 (n= 8) | 24.48 |
| Grupo Aloxana | 122.70 (n=60) | 79.91 |
| Hora 0 | 154.21 (n=14) | 78.49 |
| Hora 4 | 144.07 (n=14) | 102.75 |
| Hora 12 | 85.87 (n=16) | 22.76 |
| Hora 24 | 113.25 (n=16) | 84.94 |

CUADRO 3. Indices o porcentajes de retención bacteriana obtenidos de ratones tratados con aloxana y testigos, inoculados con aerosoles conteniendo S. aureus, en diferentes intervalos de tiempo postinoculación.

| Tratamiento | | Intervalos de tiempo postinoculación | | | |
|---------------------|--------|--------------------------------------|-------|------|---------|
| | | 0 | 4 | 12 | 24 (h). |
| Aloxana (n= 60) | Media | 100 | 25.12 | 4.22 | 1.07 |
| | + D.E. | 0 | 2.82 | 1.83 | 1.07 |
| Testigos (n= 31) | | 100 | 30.82 | 2.79 | 0.16 |
| | | 0 | 25.54 | 2.33 | 0.24 |

30

CUADRO 4. Número de bacterias por gramo de pulmón retenidas en ratones tratados con aloxana y testigos, en diferentes intervalos de tiempo post inoculación con S. aureus.

| Tratamiento | | Intervalos de tiempo postinoculación | | | |
|--------------------|--------|--------------------------------------|----------|---------|---------|
| | | 0 | 4 | 12 | 24 (h). |
| Aloxana (n=60) | Media | 1010920.3 | 254054.6 | 46677.3 | 10827.7 |
| | + D.E. | 576361.1 | 106413.0 | 48243.1 | 23481.8 |
| Testigos (n=31) | | 1094161.5 | 246453.6 | 29934.0 | 2539.1 |
| | | 602732.1 | 112880.5 | 43897.3 | 3880.6 |

NÚMERO DE BACTERIAS POR GRAMO DE PULMÓN

RETENIDAS

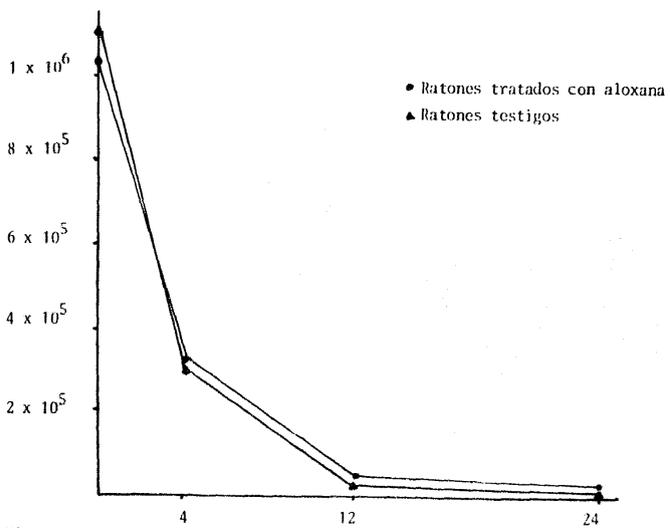


Fig. 1. Número de bacterias retenidas por gramo de pulmón en ratones tratados con aloxana y testigos, en diferentes tiempos postinoculación con *S. aureus*.

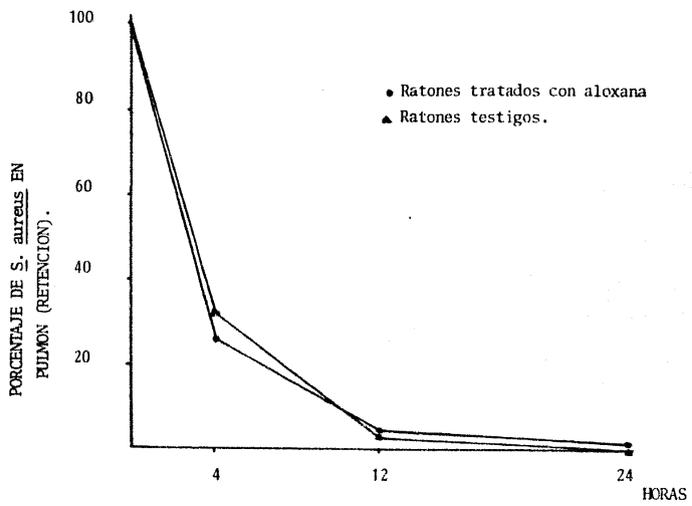


Fig. 2. Índice de retención bacteriana en pulmón de ratones tratados con aloxana y testigos, inoculados con Staphylococcus aureus.

CUADRO 4. Análisis de covarianza. Número de bacterias por gramo de pulmón.

| Variable | n. l. | S. S. | S. M. | F calculada |
|--------------|-------|-------------|------------|-------------|
| Glucemia (1) | 1 | 6066.45 | 6066.453 | 0.081 (ns) |
| error | 83 | 6216241.77 | 74894.48 | — |
| Hora (2) | 3 | 15333386.33 | 5111128.78 | 69.00 (**) |
| error (2) | 84 | 6222313.35 | 74075.16 | — |
| H*Gluce (1) | 3 | 69947.21 | 23315.74 | 0.30 (ns) |
| Réplica (1) | 3 | 475497.80 | 158499.27 | 2.06 (ns) |
| error | 80 | 6146294.56 | 76828.68 | — |
| TOTAL | 90 | 21974112.69 | — | — |

(1) ajustado a diferencias entre réplicas y horas

(2) ajustado a las diferencias entre réplicas

(ns) no significativo, $p > 0.05$

(**) altamente significativo, $p < 0.01$

CUADRO 5. Porcentaje de ratones tratados con aloxana - que presentaron lesiones renales en los diferentes tiempos postinoculación.

| LESION | INTERVALOS DE TIEMPO POSTINOCULACION. | | | | |
|---|---------------------------------------|--------|-------|-------|---------|
| | 0 h. | 4 h. | 12 h. | 24 h. | 15 días |
| Congestión de - vasos sanguíneos | 50 % | 33.3 % | 25 % | 8.3 % | 53.3 % |
| Engrosamiento glomerular | 58.3 | 83.3 | 25.0 | 58.3 | 60.0 |
| Degeneración tubular | 66.6 | 75.0 | 50.0 | 75.0 | 60.0 |
| Cilindros en túbulos | 25.0 | 33.3 | 16.6 | 8.3 | 26.6 |
| Exudado purulento en túbulos | 8.3 | 8.3 | 16.6 | 0 | 6.6 |
| Reac. Inflamato- ria en glomérulo | 41.6 | 33.3 | 16.6 | 25.0 | 46.6 |
| Reac. Inflamato- ria en tej. Inters- ticial | 16.6 | 58.3 | 33.2 | 16.6 | 53.3 |
| Fibrosis tej. In - tersticial | 8.3 | 16.6 | 8.3 | 0 | 6.6 |

Los índices de remoción bacteriana en los pulmones tanto de animales testigos como los tratados con aloxana indican que las bacterias se eliminaron rápidamente (Cuadro 3). (Figuras 1 y 2).

El inóculo bacteriano no provocó muertes por neumonía dentro de los 15 días posteriores a la inoculación, en ninguno de los grupos de ratones. A la necropsia, no se observaron cambios macroscópicos en los pulmones.

En el grupo tratado con aloxana, se observaron diferentes frecuencias y grados de lesión renales (Cuadro 5), pero en ningún caso se observaron cambios en el parénquima pulmonar. Es importante hacer notar que todos los animales con lesiones renales pertenecían a las réplicas 1, 2 y 3, pero ninguno a la réplica 4.

DISCUSION

El depósito inicial de Staphylococcus aureus inmediatamente después de terminada la inoculación varió considerablemente entre las diferentes réplicas. Estos resultados son consistentes con los observados por otros investigadores (30)(33), aunque las variaciones en estas últimas fue menor (32)(33). Esta variación en el depósito inicial es probablemente debida a varios factores como podrían ser la concentración del inóculo o la viabilidad de las bacterias

La correlación negativa ($r=-0.59$), entre la concentración inicial del inóculo y el número de bacterias depositadas ha sido descrita por otros investigadores (30)(32)(33). No se ha podido explicar científicamente cual es la causa de este fenómeno. Se ha observado que la nebulización muchas veces es deficiente, formándose partículas mayores de 10 micras, las que son retenidas

en las vías respiratorias altas, siendo escaso el número de bacterias que logran llegar al alveolo (30).

La variabilidad de los niveles de glucosa encontrados en el grupo tratado con aloxana, es inconsistente con los valores reportados por otros investigadores. Es difícil explicar esta marcada discrepancia de resultados, pero pudiera deberse a que en este experimento se utilizó solución salina fisiológica como vehículo del aloxana y no HCl o solución amortiguadora (pH 4.5) como lo recomiendan algunos investigadores (6) (23). Sin embargo, existen reportes confiables de la eficacia de la solución salina como vehículo para la inducción de la Diabetes Mellitus con aloxana (24)

Otra posible explicación podría ser que la aloxana utilizada no haya tenido las propiedades químicas y biológicas esperadas; sin embargo, esto también es improbable, pues cuando esta sustancia se oxida, tiende a virar hacia el color rosado (6), situación que no se observó durante y después de la investigación. También se podría pensar que la variabilidad en los niveles de glucosa se hayan debido a un error en las técnicas de inoculación.

La falta de efecto diabetogénico de la aloxana podría deberse también a una dosis insuficiente o a un -

acelerado metabolismo de esta sustancia. Hebert J.C. (comunicación personal, 1983), afirma que la vida media de la aloxana en contacto con el suero sanguíneo, es de menos de un minuto.

Las curvas de remoción bacteriana tanto en el grupo "diabético", como en el testigo fueron similares a las descritas para ratones inoculados con S. aureus (30) (32)(37), por lo que no se pudo comprobar efecto adverso de la glucemia en la remoción bacteriana similar a la descrita para infecciones virales (26), uremia (18), acidosis (27)(4) o edema pulmonar (29).

Se podría pensar que los niveles de glucemia, quizá, no fueron lo suficientemente altos como para inducir una falla en los mecanismos de defensa del pulmón.

DeMaria y Kappral (10) afirman que no es necesaria la multiplicación de bacterias (Staphylococcus aureus) para inducir una neumonía; sin embargo, esto no se comprobó, ya que los animales después de inoculados fueron mantenidos por 15 días sin que alguno de ellos mostrara signos o lesiones respiratorias.

Las lesiones histológicas observadas en los riñones no concuerdan con la nefrosis y nefroesclerosis que se presentan en la Diabetes Mellitus. Es posible que las

lesiones de exudación y fibrosis intersticial hayan sido hallazgos incidentales, independientes del grado de glucemia. Aunque se han descrito lesiones asociadas a la administración de la aloxana, éstas son de carácter degenerativo por lo que tampoco coinciden con las lesiones observadas (20). (38).

CONCLUSIONES,

Dados los diferentes niveles de glucemia obtenidos en los ratones tratados con aloxana, se concluye que la respuesta no fue estandar en los ratones utilizados.

Al no haber obtenido niveles elevados de glucemia, en los individuos tratados con aloxana, no se puede concluir en cuanto a la mayor susceptibilidad a la infección de los individuos diabéticos.

A P E N D I C E

CUADRO 1 . Resultados generales. Se enlistan los resultados individuales para ratones testigos (N) y tratados con aloxana (D).

| H | Gpo. | Peso | Peso | mg/100ml Gluc. | U | F | C | No. Bac. | No. Bac. | |
|----|------|-----------|----------|-------------------|-----|-----|----|----------|----------|---------|
| | | Rat. g | Pul g | | | | | | | 0 |
| 0 | D | 30.77 | 0.21 | 137 | Inc | Inc | 30 | 1 | 133333 | 634921 |
| 0 | D | 33.80 | 0.41 | 102 | Inc | Inc | 68 | 6 | 426667 | 1040650 |
| 0 | D | 32.75 | 0.26 | 195 | Inc | Inc | 98 | 9 | 626667 | 2410256 |
| 0 | N | 27.41 | 0.20 | 125 | Inc | Inc | 50 | 5 | 333333 | 1666667 |
| 0 | N | 27.42 | 0.23 | 94 | Inc | Inc | 46 | 6 | 353333 | 1536232 |
| 4 | D | 24.31 | 0.19 | 231 | Inc | 96 | 6 | 0 | 52000 | 273684 |
| 4 | D | 27.72 | 0.31 | 34 | Inc | 96 | 24 | 1 | 96889 | 312545 |
| 4 | D | 24.94 | 0.24 | 39 | Inc | 89 | 9 | 2 | 84222 | 350926 |
| 4 | D | 34.17 | 0.24 | 59 | Inc | 95 | 11 | 1 | 67778 | 282407 |
| 4 | N | 25.56 | 0.15 | 156 | Inc | 34 | 3 | 2 | 58667 | 391111 |
| 4 | N | 18.93 | 0.15 | 150 | Inc | 44 | 9 | 0 | 44667 | 297778 |
| 12 | D | 31.82 | 0.22 | 88 | Inc | 26 | 1 | 1 | 30222 | 137374 |
| 12 | D | 29.94 | 0.28 | 51 | 60 | 7 | 1 | 0 | 5111 | 18254 |
| 12 | D | 35.26 | 0.25 | 93 | 80 | 12 | 3 | 0 | 11111 | 44444 |
| 12 | D | 21.11 | 0.21 | 44 | Inc | 42 | 7 | 0 | 37333 | 177778 |
| 12 | N | 28.15 | 0.25 | 90 | 57 | 4 | 1 | 0 | 4378 | 17511 |
| 12 | N | 24.66 | 0.16 | 54 | 88 | 9 | 1 | 1 | 21300 | 133125 |
| 24 | D | 31.07 | 0.31 | 22 | 40 | 6 | 0 | 0 | 3333 | 10753 |
| 24 | D | 31.41 | 0.24 | 90 | 34 | 1 | 0 | 0 | 1467 | 6111 |
| 24 | D | 33.08 | 0.24 | 108 | 15 | 1 | 0 | 0 | 833 | 3472 |
| 24 | D | 28.03 | 0.22 | 356 | 40 | 3 | 2 | 0 | 6000 | 27273 |
| 24 | N | 23.17 | 0.18 | 85 | 23 | 1 | 0 | 0 | 1100 | 6111 |
| 24 | N | 26.10 | 0.20 | 133 | 21 | 4 | 0 | 0 | 2033 | 10167 |

Inc = Incontables.

CUADRO 2. Resultados generales. se enlistan los resultados individuales para ratones testigos (N) y tratados con aloxana (D)

| H | Gpo. | Peso | Peso | mg/100ml | | U | F | C | No. Bac. | No. Bac. |
|----|------|-----------|-----------|----------|-----|-----|----|---|----------|----------|
| | | Rat. g | Pul. g | Gluc. | 0 | | | | | |
| 0 | D | 34.21 | 0.26 | 190 | Inc | 261 | 43 | 0 | 230333 | 885897 |
| 0 | D | 41.86 | 0.27 | 318 | Inc | 180 | 15 | 3 | 140000 | 518519 |
| 0 | D | 41.82 | 0.27 | 234 | Inc | 148 | 20 | 3 | 144000 | 533333 |
| 0 | D | 37.20 | 0.31 | 255 | Inc | 178 | 19 | 4 | 170667 | 550558 |
| 0 | N | 30.17 | 0.23 | 284 | Inc | 280 | 30 | 3 | 195556 | 850242 |
| 0 | N | 26.12 | 0.23 | 206 | Inc | Inc | 39 | 0 | 260000 | 1130435 |
| 4 | D | 34.46 | 0.29 | 117 | Inc | 73 | 22 | 0 | 97667 | 336782 |
| 4 | D | 41.60 | 0.33 | 258 | Inc | 44 | 6 | 1 | 45333 | 137374 |
| 4 | D | 31.90 | 0.28 | 72 | Inc | 46 | 4 | 1 | 41333 | 147619 |
| 4 | D | 31.48 | 0.51 | 24 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 4 | N | 22.65 | 0.20 | 114 | 197 | 26 | 1 | 1 | 25950 | 129750 |
| 4 | N | 19.52 | 0.27 | 106 | Inc | 136 | 15 | 2 | 108000 | 400000 |
| 12 | D | 33.13 | 0.19 | 108 | 7 | 1 | 0 | 0 | 567 | 2982 |
| 12 | D | 35.41 | 0.33 | 86 | 131 | 10 | 4 | 0 | 14022 | 42492 |
| 12 | D | 31.17 | 0.25 | 53 | 48 | 3 | 2 | 0 | 6178 | 24717 |
| 12 | D | 32.50 | 0.22 | 103 | 18 | 3 | 1 | 0 | 3289 | 14949 |
| 12 | N | 28.05 | 0.20 | 86 | 5 | 0 | 0 | 0 | 333 | 1667 |
| 12 | N | 23.44 | 0.21 | 84 | 7 | 0 | 0 | 0 | 467 | 2222 |
| 24 | D | 28.57 | 0.31 | 21 | 54 | 7 | 1 | 0 | 4978 | 16057 |
| 24 | D | 43.20 | 0.28 | 150 | 3 | 0 | 0 | 0 | 200 | 714 |
| 24 | D | 40.20 | 0.31 | 150 | 1 | 1 | 0 | 0 | 367 | 1183 |
| 24 | D | 38.00 | 0.29 | 194 | 4 | 0 | 0 | 0 | 267 | 920 |
| 24 | N | 30.50 | 0.18 | 90 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | N | 24.58 | 0.20 | 120 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Inc = Incontables.

CUADRO 3 . Resultados generales. Se enlistan los resultados individuales para ratones testigos (N) y tratados con aloxana (D)

| H | Gpo. | Peso Rat. g | Peso Pul. g | mg/100ml Gluc | | U | F | C | No. Bac. prom. | No. Bac. g. Pul. |
|----|------|-------------|-------------|---------------|-----------------|-----|----|----|----------------|------------------|
| | | | | | 0 | -1 | -2 | -3 | | |
| 0 | D | 26.71 | 0.19 | 71 | Inc | 175 | 27 | 2 | 143333 | 754386 |
| 0 | D | 27.75 | 0.23 | 100 | Inc | 167 | 30 | 8 | 281556 | 1224155 |
| 0 | D | 30.31 | 0.20 | 131 | Inc | 213 | 25 | 3 | 169556 | 847778 |
| 0 | D | 21.58 | 0.16 | 37 | Inc | 260 | 26 | 3 | 182222 | 1138889 |
| 0 | N | 26.47 | 0.20 | 83 | Inc | Inc | 46 | 6 | 353333 | 1766667 |
| 4 | D | 26.53 | 0.24 | 105 | Inc | 40 | 13 | 1 | 60000 | 250000 |
| 4 | D | 28.51 | 0.27 | 163 | Inc | 63 | 5 | 3 | 91778 | 339918 |
| 4 | N | 29.76 | 0.24 | 83 | Inc | 35 | 3 | 0 | 21667 | 90278 |
| 4 | N | 26.25 | 0.21 | 103 | Inc | 46 | 3 | 1 | 39111 | 186243 |
| 12 | D | 30.12 | 0.25 | 96 | 29 ^a | 32 | 3 | 0 | 20422 | 88792 |
| 12 | D | 29.97 | 0.26 | 80 | 51 | 5 | 0 | 0 | 3367 | 12949 |
| 12 | D | 28.30 | 0.23 | 115 | 29 | 3 | 1 | 0 | 3533 | 15362 |
| 12 | D | 23.31 | 0.16 | 110 | 38 | 4 | 1 | 0 | 3956 | 24722 |
| 12 | N | 23.23 | 0.19 | 81 | 89 | 9 | 2 | 0 | 8422 | 44327 |
| 12 | N | 30.96 | 0.23 | 141 | 24 | 2 | 0 | 0 | 1467 | 6377 |
| 24 | D | 25.42 | 0.19 | 124 | 149 | 39 | 0 | 0 | 17967 | 94561 |
| 24 | D | 26.41 | 0.21 | 51 | 9 | 1 | 0 | 0 | 210 | 3016 |
| 24 | D | 30.43 | 0.49 | 61 | 22 | 4 | 0 | 0 | 2067 | 4218 |
| 24 | D | 27.39 | 0.19 | 76 | 3 | 0 | 0 | 0 | 200 | 1053 |
| 24 | N | 30.39 | 0.25 | 91 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | N | 29.28 | 0.19 | 74 | 3 | 2 | 0 | 0 | 767 | 4055 |

Inc = Incontables.

CUADRO 4 . Resultados generales. Se enlistan los resultados in
dividuales para ratones testigos (N) y tratados con
aloxana (D).

| H | Gpo. | Peso Rat. g | Peso. Gluce. Pul mg/100ml ₁₀ | | U | F | C | | No. Bac. prom. | No. Bac. g. Pul |
|----|------|----------------|--|-----|-----|-----|-----|----|-------------------|--------------------|
| | | | | | - 1 | - 2 | - 3 | | | |
| 0 | D | 32.96 | 0.23 | 91 | Inc | 260 | 36 | 8 | 315556 | 1371981 |
| 0 | D | 29.90 | 0.24 | 113 | Inc | 110 | 6 | 2 | 82222 | 342593 |
| 0 | D | 27.38 | 0.22 | 185 | Inc | 360 | 52 | 10 | 417778 | 1898990 |
| 0 | N | 36.78 | 0.30 | 125 | Inc | 58 | 12 | 0 | 59333 | 197778 |
| 0 | N | 48.48 | 0.32 | 105 | Inc | 176 | 26 | 3 | 163556 | 511111 |
| 4 | D | 32.08 | 0.25 | 387 | Inc | 78 | 6 | 1 | 52889 | 211556 |
| 4 | D | 29.60 | 0.25 | 152 | Inc | 130 | 16 | 1 | 86667 | 346667 |
| 4 | D | 25.27 | 0.35 | 212 | Inc | 120 | 8 | 0 | 66667 | 190476 |
| 4 | D | 25.87 | 0.23 | 164 | Inc | 120 | 14 | 0 | 86667 | 376812 |
| 4 | N | 35.29 | 0.27 | 75 | Inc | 74 | 13 | 1 | 67556 | 250206 |
| 4 | N | 41.06 | 0.33 | 90 | Inc | 126 | 11 | 1 | 74667 | 226263 |
| 12 | D | 24.68 | 0.19 | 114 | 53 | 0 | 0 | 0 | 3533 | 18596 |
| 12 | D | 23.68 | 0.19 | 86 | 46 | 12 | 2 | 0 | 8133 | 42807 |
| 12 | D | 24.10 | 0.18 | 63 | 110 | 12 | 0 | 0 | 7667 | 42593 |
| 12 | D | 29.97 | 0.22 | 84 | 111 | 14 | 0 | 0 | 8367 | 38030 |
| 12 | N | 40.00 | 0.22 | 54 | 68 | 7 | 0 | 0 | 4600 | 20909 |
| 12 | N | 36.90 | 0.30 | 123 | 50 | 7 | 0 | 0 | 4000 | 13333 |
| 24 | D | 28.22 | 0.30 | 180 | 12 | 1 | 0 | 0 | 733 | 2444 |
| 24 | D | 28.22 | 0.26 | 136 | 1 | 0 | 0 | 0 | 67 | 256 |
| 24 | D | 29.48 | 0.24 | 65 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | D | 25.26 | 0.22 | 28 | 4 | 0 | 0 | 0 | 267 | 1212 |
| 24 | N | 33.36 | 0.31 | 113 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 24 | N | 22.68 | 0.21 | 60 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

Inc = Incontables.

REFERENCIAS

1. Ariza, A.R.C. Otros progresos en Diabetes Mellitus Tipo I. Rev. Med. IMSS (Mex). -19:365 (1980).
2. Bar R., Kahn C.R., Koren Hillel S. Insulin Inhibition of antibody dependent cytotoxicity and insulin receptors in macrophages. Nature. 265: 632-634 (1976)
3. Brody.M., and Dixon L., Vascular Reactivity in Experimental Diabetes Mellitus. Circ. Res. 14: 494-501 (1964)
4. Bybee, J.D. and Rogers.D.E. The phagocytic activity of polymorphonuclear leukocytes obtained from patients with Diabetes Mellitus. J. Lab. Clin. Med. 64:1 (1964)
5. Cecil R.L., Loeb R.F. Tratado de Medicina Interna. Interamericana. México (1) (1958)
6. Cooperstein S.J. and D. Watkins. The islets of Langerhans. Academic Press Inc. U.S.A. (1981)
7. Craighead, J.E. Virus-induced insulinitis in experimental animal models. Acta endocrinológica . 83,(Suppl 205):123 (1976).
8. Craighead, J.E. Current views on the etiology of insulin dependent Diabetes Mellitus. New. Engl. J. Med. 299:1439 (1978)
9. Davidsohn I., J.B. Henry. Diagnóstico Clínico por el Laboratorio. Salvat. 5a. ed. México (1972)
10. DeMaria, T.G., and Kapral, F.A. Pulmonary infection of mice with Staphylococcus aureus. Infect. Immun., 21: 114-123 (1978)
11. Drachman, R.N., Root, R.K., and Wood, W.B., Jr. Studies on the effect of experimental nonketonic Diabetes Mellitus on antibacterial defense: I Demonstration of a defect in phagocytosis. J. Exp. Med. 124:227 (1966)
12. Ettinger, S., J. Textbook of Veterinary Internal Medicine W.B. Saunders Com, Philadelphia (1975)
13. Farreras Valente P., Rozman Ciril. Medicina Interna. Marin S.A.

14. Frasset, I., J., Viña., Jr., Frasset, M., Alvarez de Laviada, A. Ferriol y V. Antón. Contribución al estudio de de la aloxana en ratas pancreoprivas. Rev. Esp. Fisiol. 35: 129-133 (1979).
15. Futrán J., Jessurum J. Flores H., Halabe J. Etiología y patología de la glomeruloesclerosis diabética. Rev. Med. IMSS 21:450 (1983)
16. Gill John L. Design and Analysis of Experiments Animal and Medical Sciences. The Iowa State University Press.U.S.A. Vol 3.(1978)
17. Green G.M., and Kass E.H. The role of the alveolar macrophage in the clearance of bacteria from the lung.J. Exp. Med. 119: 167 (1964)
18. Goldstein, E. and Green, G.M. Inhibition of pulmonary bacterial clearance during acute renal failure. Antimicrob. Ag. Chemoter.,22-25 (1965)
19. Goldstein, E. and Green, G.M. Alteration of pathogenicity of Pasteurella pneumotropica for the murine lung caused by changes in antibacterial activity. J. Bact., 93:1651-1656 (1967).
20. Goodman L.S., y Gilman A. Bases farmacológicas de la terapéutica. UTEHA. 2a. ed. 2:1853 (1957).
21. Guyton A.C. Tratado de Fisiología Médica. Interamericana Sa. ed. México (1977).
22. Harrison., et. al. Medicina Interna. La Prensa Médica Mexicana. 5a. ed. México (1979).
23. Hakan, L.A.B., et. al. Effects in vitro of alloxan on the glucose metabolism of mouse pancreatic B-cells. Biochem. J. 182:797-802 (1979).
24. Hebert, J.C. and Coil, J.A., Jr., MD. Increased susceptibility to pulmonary infection in alloxan diabetic mice. J. Surg. Res. 31: 337-342 (1981)
25. Hersman Jerome M. Endocrine Pathophysiology. Leand Febiger.

Philadelphia (1977)

26. Jakab, G.J. Mechanisms of virus induced bacterial superinfections of the lung. Clin. Chest. Med., 2:59-66 (1981)
27. Kas, E.H., Green, G.M. and Goldstein, E. Mechanisms of anti-bacterial action in the respiratory system. Bact. Rev., 30: 488-496 (1966)
28. Kazura, J.W., Gandola, C., Rodman. Deficient production of the lymphokine eosinophil stimulation promoter in chemically induced and mutation Diabetes Mellitus in mice. J. Immun. 123: 2114-2117 (1979)
29. LaForce, F.M., Mullane, J.F., Boehme, R.F., Kelly, W.J. and Huber, G.L. The effect of pulmonary edema on bacterial defenses of the lung. J. Lab. Clin. Med. 82:631-648 (1975)
30. Laurenzi, G.A., L. Berman, M. First, and Kass, E.H. A quantitative study of the deposition and clearance of bacteria in the murine lung. J. Clin. Invest. 43:759-768 (1964)
31. Leslie Raffael, Pitsakis P., Levison Sandra P., and Levison Matthew E. Experimental Candida albicans, Staphylococcus aureus and Streptococcus faecalis pyelonephritis in diabetic rats. Inf. and Immun. 775-779 (1981)
32. Lillie, L.E., and Thomson, R.G. The pulmonary clearance of bacteria by calves and mice. Can.J. Comp. Med. 36: 129-137 (1972)
33. López, A., Maxie, M.G., Savan, M., Ruhnke, H.L. Thomson, R.G., Barnum, D.A. and Geissinger, H.D. The pulmonary clearance of Pasteurella haemolytica in calves infected with Bovine virus Diarrhea or Mycoplasma bovis. Can. J. Comp. Med. 46:302-306 (1982)
34. Luna, G.L. Manual of histologic staining methods of the armed forces Institute of Pathology. Third ed. Mc. Graw-Hill, New York. (1968)
35. MacQuish, A.C., S.J. Urbaniak, C.J. Campbell, L.J.P. Duncan, and W.J. Irvine. Phytohemagglutinin transformation and circula

- ting lymphocyte subpopulations in insulin dependent diabetic patients. Diabetes. 23:708-712 (1974)
36. Mahmoud, A.A.F., Rodman, H.M., Mandel, M.A., et. al. Induced and spontaneous Diabetes Mellitus and suppression of cell mediated immunologic response. J. Clin. Invest. 57: 362 (1976)
 37. Martínez, B.J. Eventos inflamatorios en el pulmón y su correlación con la remoción bacteriana en ratones inoculados con Pasteurella haemolytica y Staphylococcus aureus. M. en C. Ve terinarias. Tesis. U.N.A.M. México (1984)
 38. Mauer, S.M., Brown, D.M. and Steffes M.W. Studies on the reversibility of kidney changes in experimental diabetes in the rat. Acta Endocrinologica. Suppl 242 (1981)
 39. Morishige, W.K., Uetake Carol-Ann, Greenwood and Akaka. Pulmonary insulin responsivity: In vivo effects of insulin on the diabetic rat lung and specific insulin binding to lung receptors in normal rats. Endocrinology. 100:1710-1722 (1977)
 40. Moxley, M.A., and William, J. Longmore. Studies on the effects of alloxan and streptozotocin induced diabetes on lipid metabolism in the isolated perfused rat lung. Life Sciences 17: 921-926 (1975)
 41. Onodera, T., Jenson, A.B., Yoon, J.W., Notkins, A.L., Virus-induced Diabetes Mellitus: Reovirus infection of pancreatic beta cells in mice. Science. 201(4355):529-531 (1978)
 42. Wieland, O., Löffler, G. Über den Mechanismus der gesteigerten ketonkörperbildung. Biochemische Zeitschrift. 339:204-211 (1963)
 43. Pérez, P.E. Nuevos conceptos en Diabetes Mellitus tipo I. Rev. Med. IMSS. 19: 365 (1980)
 44. Plopper, C.G., Morishige, W.K. Alterations in granular (type II) pneumocyte ultrastructure by streptozotocin-induced diabetes in rat. -----
 45. Poje, M. and Rocić, B. Diabetogenic action of alloxan like derivatives of uric acids. Experimentia. 36:78-79 (1980)

46. Saiki, O., Negoro, S., Tsuyuzuchi, I., Yamamura, Y. Depressed immunological defense mechanisms in mice with experimentally induced Diabetes Mellitus. Infect. and Immun. 28: 127-131 (1980)
47. Stanley, L., Robbins., Angell, A. Patología Básica. Interamericana. 2a ed. México (1978)