

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

11227
73

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADOS E
INVESTIGACION

INNATE IMMUNE RESPONSE MECHANISMS IN NON
INSULIN DEPENDENT DIABETES MELLITUS
PATIENTS ASSESSED BY FLOW
CYTOENZYMOMOLOGY

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA

PRESENTA :
DR. ALFREDO LOPEZ PONCE

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACION

SUBDIVISION DE ESPECIALIZACIONES
MEDICAS

OFICIO FMED/SEM /1739/2003

ASUNTO: Autorización del trabajo de
investigación del Dr. Alfredo López Ponce

DR. ISIDRO AVILA MARTINEZ
SECRETARIO DE SERVICIOS ESCOLARES
DE LA FACULTAD DE MEDICINA
Presente.

Estimado Dr. Avila Martínez:

Me permito informar a usted que el alumno Dr. Alfredo López Ponce del curso de especialización en Medicina Interna en el Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición, presenta el trabajo de investigación intitulado "INNATE IMMUNE RESPONSE MECHANISMS IN NON-INSULIN DEPENDENT DIABETES MELLITUS PATIENTS ASSESSED BY FLOW CYTOENZYMOLGY".

De conformidad con el artículo 21 capítulo 5º. de las Normas Operativas del Plan Único de Especializaciones Médicas (PUEM) se considera que cumple con los requisitos para validarlo como el trabajo formal de Investigación que le otorga el derecho a la diplomación como especialista.

Sin otro particular de momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D. F. a 24 de septiembre del 2003

JEFE DE LA SUBDIVISION


DR. LEOBARDO C. RUIZ PEREZ

LRP*mjt.

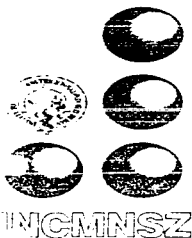
Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Alfredo López Ponce

FECHA: 07/09/2003

FIRMA: [Firma]

FAILA DE [illegible]



INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION
SALVADOR ZUBIRAN

México, D.F., a 14 de julio de 2003.

Vo. Bo.

DR. LEOBARDO C. RUIZ PEREZ
JEFE DE LA SUBDIVISION DE
ESPECIALIZACIONES MEDICAS

Dr. Leobardo Ruiz Pérez
Jefe de la Subdivisión de Estudios de
Posgrado e Investigación
Facultad de Medicina, UNAM
Presente

Por medio del presente, le comunico a usted que esta Dirección de Enseñanza no tiene inconveniente alguno, en que el trabajo titulado "Innate immune response mechanisms in non-insulin dependent diabetes mellitus patients assessed by flow cytometry", que presenta el DR. ALFREDO LOPEZ PONCE, médico residente de cuarto año de la especialidad de Medicina Interna, se le considere como tema de tesis para realizar los trámites de la diplomación oportuna.

Atentamente

~~Dr. Luis Federico Uscanga Domínguez~~
Director de Enseñanza

LFUD*rrl.



INCMNSZ

Investigación DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION
"DR. SALVADOR ZUBIRAN"
DIRECCION DE ENSEÑANZA

ción Servicio
sancia Docencia
0017700

- Vasco de Quiroga 15,
- Delegación Tlalpan
- C.P. 14000 México, D.F.
- Tels. 55-79-12-00
- 55-79-06-11

14 JUL 2003
FALLA DE CIERRE



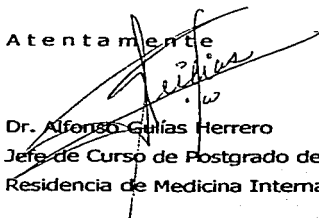
INSTITUTO NACIONAL DE CIENCIAS MEDICAS Y NUTRICION
SALVADOR ZUBIRAN

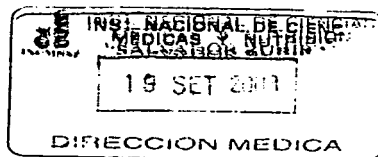
México, D.F., a 20 de septiembre de 2003

Dr. Leobardo Ruíz Pérez
Jefe de la Subdivisión de Estudios de
Postgrado e Investigación
Facultad de Medicina, U.N.A.M.
P r e s e n t e

Por medio de la presente, le comunico a usted que no tenemos inconveniente en que el trabajo titulado **"Innate immune response mechanisms in non-insulin dependent diabetes mellitus patients assessed by flow cytometry"**, publicado previamente en la revista Immunology Letters 2000, 74: 239-244, que presenta el Dr. ALFREDO LÓPEZ PONCE, médico residente de cuarto año de la especialidad de Medicina Interna, se considere como tema de tesis para realizar los trámites pertinentes de la diplomación oportuna.

Atentamente


Dr. Alfonso Guías Herrero
Jefe de Curso de Postgrado de la
Residencia de Medicina Interna



AGH/alp

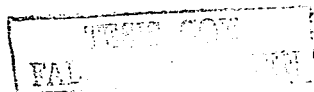
Investigación

Tradición Servicio

Asistencia Docencia

20007700

- Vasco de Quiroga 15,
- Delegación Tlalpan
- C.P. 14000 México, D.F.
- Tels. 55-73-12-00
- 55-73-06-11



Innate immune response mechanisms in non-insulin dependent diabetes mellitus patients assessed by flow cytometry

Luis Llorente ^{a,*}, Hortensia De La Fuente ^a, Yvonne Richaud-Patin ^a,
Claudia Alvarado-De La Barrera ^a, Alejandro Díaz-Borjón ^a, Alfredo López-Ponce ^b,
Israel Lerman-Garber ^b, Juan Jakez-Ocampo ^a

^a Department of Immunology and Rheumatology, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, CP 14000, México, D.F., México

^b Department of Endocrinology, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Tlalpan, CP 14000, México, D.F., México

Received 19 June 2000; accepted 20 June 2000

Abstract

It is well known that infections in patients with diabetes mellitus are more severe, although there is controversy for increased susceptibility to them. Non-specific immune response mechanisms could be related to defense and/or susceptibility to pathogens. The aim of this study was to investigate the activity of several enzymes involved in the primary host defense mechanisms in non-insulin dependent diabetes mellitus (NIDDM). Twenty NIDDM females with a mean HbA_{1c} level of 8.19% were included. No patient had clinical evidence of infection. As controls 20 healthy females were studied. The enzymes tested were dipeptidyl-peptidase 1 (DPP-I), cathepsin B and D, NADPH oxidase and superoxide dismutase (oxidative burst) and collagenase. Isolated leukocytes were incubated with the specific substrates in pyrogen free conditions. The intracellular enzyme activity was analyzed by flow cytometry. Collagenase enzymatic activity was similar in the three leukocyte subpopulations studied. Oxidative burst induction in monocytes was comparable between both groups. Enzyme activity of cathepsin B and D in all cell subsets, oxidative burst in PMN cells, and DPP-I in lymphocytes and monocytes from patients, was higher than those from healthy females ($P < 0.05$). Overall, our findings demonstrate an enhanced functional status of several intracellular leukocyte enzymes in NIDDM. Furthermore, the increased oxidative burst induction and the consequent production of free radicals, may contribute to vascular complications. Other mechanisms — either from the non-specific or specific immune response — deserve investigation to establish if diabetic patients are more susceptible to infectious diseases. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Leukocytes; intracellular enzymes; diabetes; non-specific immune response; flow cytometry

1. Introduction

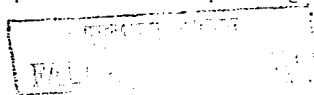
It is widely stated that in patients with diabetes mellitus infections are more severe [1]. The components of the innate immune system constitute the first line of defense against many microorganisms and have a key role in the control of bacterial infections. These functions are dominated by phagocytic cells, mainly neutrophils and macrophages, able to kill invading microorganisms by releasing several components from

granules (neutrophils) or lysosomes (macrophages) [2]. Another important mechanism involved in the elimination of pathogens is the oxidative burst. Upon stimulation both macrophages and polymorphonuclear cells (PMN), markedly enhance their oxygen uptake leading to toxic metabolites for the infectious agents [2,3].

In diabetes mellitus patients the increased frequency of complicated soft-tissue, lower respiratory, and urinary tract infections, is due, at least in part, to deficient leukocyte functions [1]. Macrophages and PMN from these patients have shown impaired phagocytosis as well as bactericidal activity [4–6]. Moreover, it has been reported derangements in other cells involved in specific immune response against infections

* Corresponding author. Tel.: +52-56-555-954; fax: +52-55-732-096.

E-mail address: llyrpl@quetzal.innsz.mx (L. Llorente).



such as B lymphocytes [7]. There is, however, controversy about correlation between defects in leukocyte function and metabolic control of this disease [8,9]. A high production of free radicals in patients with diabetes mellitus has been reported by several studies [8,10], although it has been suggested that impaired ability to eliminate ingested microorganisms is due to a deficient production of these products [11,12].

In order to have an overview of the main non-specific mechanisms involved in the control of infectious processes, this study was undertaken to analyze the activity of several enzymes participating in cell migration, inflammation, PMN degranulation, intracellular protein degradation, as well as induction of oxidative burst, in patients with NIDDM.

2. Material and methods

2.1. Patients

Twenty NIDDM females were included in this study. Their ages ranged from 40 to 64 years old (mean 53 ± 7 years). Disease duration ranged from 5 months to 10 years (mean 5 ± 3 years). Patients were excluded if they had hyperosmolar coma, pregnancy, or complications such as renal failure, proliferative retinopathy, ischaemic heart disease and significant peripheral neuropathy. Infection was ruled out by physical examination, urinalysis, complete blood cell count, Papanicolaou smear and chest radiograph. The control group included 20 healthy females aged from 39 to 61 years old (mean 52 ± 6 years). Four patients and three healthy controls were receiving hormonal replacement therapy at the time of the study. All women were informed about the objectives and methods of the study and gave their written consent.

2.2. Samples

Peripheral blood samples were obtained after an overnight fast, between 19:00–07:45 h. Five millilitres of heparinized whole blood were washed twice on pyrogen free PBS in order to remove extracellular enzymes that may interfere with the assay. After removal of supernatant, erythrocytes were lysed on FACS lysing solution (Becton Dickinson, San Jose, CA) during 20 min and leukocytes were washed two times. Cells were adjusted at a concentration of 4×10^6 cells/ml in PBS.

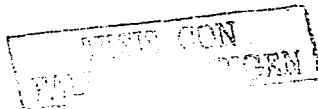
Three millilitres of EDTA anticoagulated blood were used for the ion capture assay for quantitative measurement of percent glycated hemoglobin accordingly to the Abbott Imx Glycated Hemoglobin Assay (HbA_{1c}) (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL).

2.3. Intracellular enzyme flow cytometric analysis

Cytoenzymology is a single cell technique in which an enzymatic substrate (Coulter-Beckmann, Hialeah, FL) enters in the intracellular space. When this compound is hydrolyzed by the specific intracytoplasmic enzyme, the reaction yields a fluorescent product that can be detected by flow cytometry. For each test, blank and enzyme, 50 μ l of the cellular suspension were warmed for 10 min at 37°C. Then, 25 μ l of either PBS (blank) or the corresponding enzymatic substrate were added to the sample tube and incubated at 37°C for the times suggested for each enzyme according to the manufacturer's recommendations. After the second incubation, samples were loaded on crushed ice for 3 min to stop the enzyme-substrate reaction and 0.3 ml of pyrogen-free PBS were added for immediate analysis. Flow cytometry was performed on a FACScan (Becton Dickinson) using Consort 30 software. On the basis of their corresponding morphological features, electronic gates were set for PMN, monocytes, and lymphocytes in order to analyze these clusters separately. The fluorescence channel intensity (mode) from each blank, enzyme and cell subpopulation was recorded. Results are expressed as the ratio between the enzyme's mode value and the blank's mode (fluorescence channel mode ratio [FCMR]) value according to each cell subpopulation. The enzymes tested and substrates employed were: collagenase, this enzyme was evaluated using glycylphenylalanine-glycine-alanine-rhodamine (Rho) 110 as substrate. Collagenases are involved in cell migration, host defense mechanisms and PMN degranulation [13]; dipeptidyl peptidase 1 (DPP-1); the substrate employed for DPP-1 analysis was leucine-leucine-Rho 110. This enzyme is expressed at high levels in cytotoxic cells and it has been implicated in maintenance of cell growth and intracellular protein degradation [14]; cathepsin B and D; cathepsin B and D cooperate in cell migration, host defense mechanisms, inflammation, PMN degranulation, and insulin metabolism [15,16]. The substrate employed for this analysis was the valine-lysine-Rho 110. We also tested the oxidative burst induction by the action of NADPH oxidase and superoxide dismutase over the substrate dichlorofluorescein diacetate, which after its deacylation is trapped inside the cell and converted to dichlorofluorescein through the action of hydrogen peroxide (H_2O_2). This compound contains phorbol myristate acetate (PMA) to activate the enzyme NADPH-oxidase, which is responsible for the oxidative burst.

2.4. Statistics

Mann Whitney 'U' test and linear regression analysis were used to analyze data. Statistical significance was established at P value < 0.05 .



3. Results

Intracellular activity of several enzymes was evaluated by flow cytoenzymology in leukocytes from NIDDM patients and healthy females. A separate analysis of PMN, monocytes and lymphocytes was done for each blank and enzyme tested. The FCM values were recorded as histograms.

3.1. Collagenase

No differences were found in collagenase activity in any cell subpopulation screened between patients and controls.

3.2. Dipeptidyl peptidase 1 (DPP-1)

Lymphocytes and monocytes from NIDDM patients showed increased activity of DPP-1 when compared to healthy subjects ($P < 0.05$).

3.3. Cathepsin B and D

In all patients cell subpopulations studied expressed higher B and D enzyme activity when compared to controls ($P < 0.05$).

3.4. Oxidative burst (NADPH-oxidase and superoxide dismutase)

PMN cells from NIDDM patients showed higher activity of oxidative burst when compared to controls ($P = 0.02$). Results are shown in Table 1.

Fig. 1 displays representative flow cytometric experiments from one NIDDM patient and one healthy female.

3.5. Metabolic control

The metabolic control was determined on the basis of HbA_{1c} levels, which are indicative of the time average blood glucose concentration over the past 1–3 months. Normal values were below 6.1%. All controls were under normal levels. An excellent diabetes control was

defined as HbA_{1c} levels below 8% (11 out of 20 patients), good or regular control from 8 to 10% (seven out of 20 patients) and poor metabolic control when values were over 10% (two out of 20 patients).

No correlation was found between either the enzymes or cell subpopulation tested and clinical characteristics, namely age, disease duration, glycaemic control, type of treatment (including hormone replacement), body mass index, hypertension or smoking (data not shown).

4. Discussion

A common complication in diabetes mellitus is infectious diseases which is more severe, although there is controversy if patients have an enhanced susceptibility to them due only to the metabolic disorder [1]. An abnormal function of leukocytes may in part contribute to the impaired response to pathogens. It has been described that chemotactic and phagocytic function are diminished in diabetes mellitus, as well as bactericidal activity [9,17]. In this study, several enzymes involved in the non-specific immune response mechanisms were analyzed in white blood cells from NIDDM patients. We found no diminished enzyme activity in the three leukocyte subpopulations tested in patients, but an increase in DPP-1, cathepsin B and D and oxidative burst induction, not related to patient's glycaemic control nor clinical characteristics. Previous studies have used chemiluminescence to measure oxidative burst in diabetes [18,19]. In this study, flow cytoenzymology was employed, a reliable method with high sensibility and specificity to test enzyme activity.

Our results showed a higher DPP-1 activity in lymphocytes and monocytes from NIDDM patients than healthy females. This enzyme is restricted to cells with cytotoxic functions such as macrophages, CD8 + T lymphocytes and NK cells [14]. Although we did not quantify these cell subpopulations, our findings support a competent cytotoxic function in NIDDM. Moreover, a proper cytotoxic function is essential to prevent opportunistic infections [2].

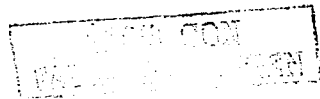
Cathepsin B and D were also found increased in NIDDM patients. As already mentioned, these enzymes

Table 1
Intra-cytoplasmic enzyme activity in leucocytes from NIDDM patients and healthy subjects

Cell subset	Collagenase		Oxidative burst		DPP-1		Cathepsin B and D	
	Controls	NIDDM	Controls	NIDDM	Controls	NIDDM	Controls	NIDDM
Lymphocytes	11.4 ± 3.1 ^a	10.5 ± 1.1	NT	NT	4.6 ± 0.6	6.0 ± 0.3 ^b	25.5 ± 6.8	53.0 ± 6.0 ^b
Monocytes	17.9 ± 3.0	15.3 ± 1.4	10.8 ± 0.6	13.7 ± 1.1	6.4 ± 0.4	7.9 ± 0.3 ^b	25.6 ± 3.6	38.5 ± 4.3 ^b
Granulocytes	22.5 ± 4.8	20.6 ± 1.7	18.5 ± 1.5	23.6 ± 1.0 ^b	NT	NT	33.5 ± 8.9	54.0 ± 9.3 ^b

^a Values are expressed as Mean ± SEM of fluorescence channel mode ratio (FCMR)

^b $P < 0.05$ when compared with controls. NT = Not tested



3

RECEIVED BY
 BUREAU OF
 HEALTH SERVICES
 DIVISION OF
 HEALTH CARE
 SERVICES
 STATE OF
 CALIFORNIA

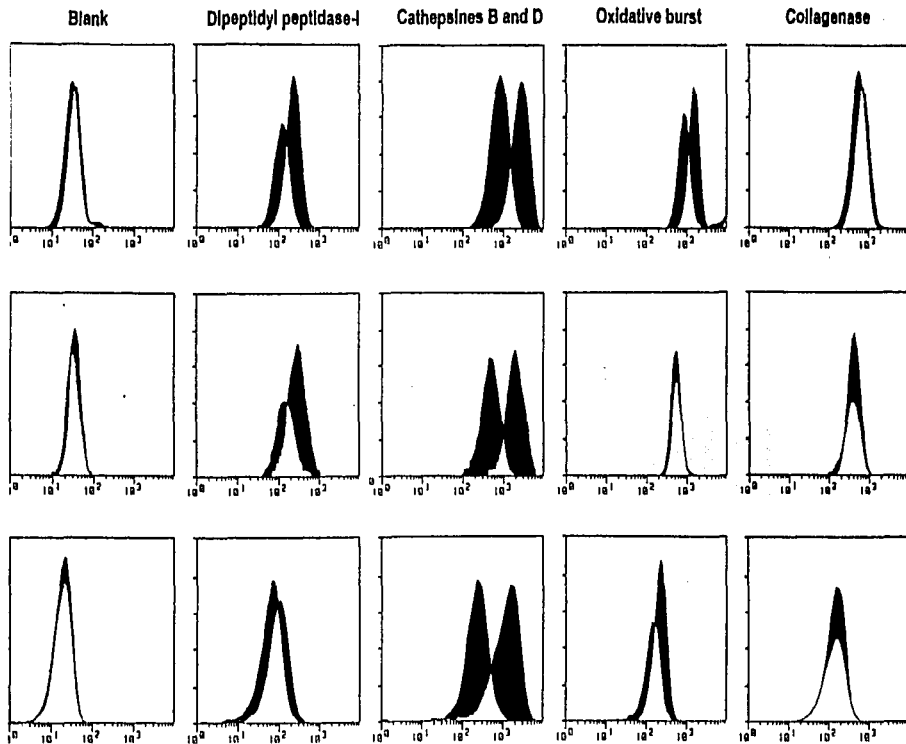


Fig. 1. Representative experiments from a NIDDM patient and one healthy woman. Enzymatic activity was measured by flow cytometry. Leukoocytes isolated from NIDDM patients (black areas) and healthy subjects (purple areas) were incubated with nonfluorescent substrate-dye complex which forms a fluorescent product which is cleaved by its corresponding enzyme as mentioned in Section 2. This figure displays histograms of each blank and enzyme tested. The upper lane of the figure shows graphs for the PMN leukocyte subpopulations while in the middle lane and in the bottom lane are depicted the monocyte and the lymphocyte clusters respectively.

are involved in cell migration, PMN degranulation, antigen processing and insulin metabolism [15,16]. The latter property deserves particular attention, for it has been reported that cathepsin B and D participate in the conversion of pro-insulin to insulin in Langerhans' cells [20] and in rat hepatocytes [21]. Pro-insulin, when present at high levels in the bloodstream, might be considered as a risk marker for NIDDM [22]. In this regard, it is tempting to speculate that leukocytes might be acting in either clearance or even transformation of pro-insulin to insulin in diabetic patients, thus contributing to proper handling of the metabolic disorder. Further research is needed to clarify the possible role, if any, of leukocytes in the fate of pro-insulin.

Interestingly, oxidative burst was found increased in PMN cells from NIDDM patients. Besides the well known important role of oxidation products harmful to infectious agents, it is worth mentioning that increased hydrogen peroxide formation from leukocytes in diabetes mellitus patients may contribute to the development of vascular complications, e.g. thrombosis, myocardial infarct [23,24]. This is in sharp contrast to our previous findings in healthy elderly women where oxidative burst was comparable to controls or even reduced [25]. In diabetic animal models several studies demonstrated a reduction in oxidative stress and/or complications after anti-oxidant supplementation [26]. Notwithstanding, the effect of antioxidant treatment in humans is still not conclusive [24,26].

Overall, our results merit several interpretations which, by no means, are necessarily opposite: (i) The higher functional enzyme activity detected in leukocytes from NIDDM patients might well be an intrinsic defect of the disease — at least for the enzymes tested — unrelated to metabolic control and/or clinical characteristics; (ii) The enzymatic profile in NIDDM patients does not rule out the function of other non-specific host defense mechanisms such as opsonization, phagocytosis, chemotaxis which on the other hand, have been demonstrated to be altered in diabetes mellitus [9,17]. Moreover, specific immune mechanisms such as humoral and cellular responses have to be considered. Other factors, e.g. abnormalities in the microvascular circulation in diabetes mellitus patients may contribute or facilitate the development of infections and impair the response to therapy [27]; (iii) Most likely, this work suggests that there may be a homeostatic dysequilibrium — as far as intracellular enzyme activity is concerned — which on the one hand, try to compensate for the inherent metabolic disorder but on the other hand, surpass the susceptibility and/or severity of infections. In doing so, however, the consequences could be deleterious to the organism, e.g. the high oxidative burst found, leading to abnormalities in the regulation of free radicals production, associated with diabetic vascular complications [23,24,26–28].

The high levels of intracellular enzyme activity in NIDDM patients reflects an over functional performance of this particular branch of the non-specific immune response. Other factors — either specific or non-specific — deserve particular attention to elucidate if, indeed, diabetes mellitus patients are prone to infectious diseases.

Acknowledgements

L. Llorente is recipient of the Beatriz Vázquez Sámano Investigator Career Memorial Award. We thank Axel Zagler, Luz Elizabeth Guillén Pineda, and María Luisa Velasco, for their technical assistance. This work was supported in part by a research grant from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 25606-M) México.

References

- [1] D.E. Sentochnik, G.M. Eliopoulos, in: C.R. Kahn, G.C. Wier (Eds.), *Joslin's Diabetes Mellitus*, Lea–Febiger, Pennsylvania, 1994, pp. 867–888.
- [2] D. Rotrosen, J.I. Gallin, *Ann. Rev. Immunol.* 5 (1987) 127–150.
- [3] G. Weissmann, J.E. Smolen, H.M. Korchak, *New Engl. J. Med.* 303 (1980) 27–31.
- [4] B.M. Babior, *J. Clin. Invest.* 73 (1984) 599–601.
- [5] J.S. Tan, J.L. Anderson, C. Watanakunakorn, J.P. Phair, *J. Lab. Clin. Med.* 85 (1975) 26–32.
- [6] F.Y. Chang, M.F. Shiao, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 29 (1995) 121–127.
- [7] J.M. Alexiewicz, D. Kumar, A. Smogorzewski, S.G. Massry, *Am. J. Kidney Dis.* 30 (1997) 98–104.
- [8] J.D. Bagdade, R.K. Root, R.J. Bulger, *Diabetes* 23 (1974) 9–15.
- [9] M. Delamatre, D. Naugendre, M. Moreno, M.C. Le Goff, H. Allanic, *Diabet. Med.* 14 (1997) 29–34.
- [10] W. Marhofer, E. Stein, E. Maeser, K. Federlin, *Diabetes Care* 15 (1992) 256–260.
- [11] N. Sato, H. Shimizu, K. Suwa, Y. Shimomura, I. Kobayashi, M. Mori, *Diabetes Care* 15 (1992) 1050–1052.
- [12] S. Inoue, Y. Lan, J. Muram, M. Tsuji, *Diabetes Res. Clin. Pract.* 33 (1996) 119–127.
- [13] J.F. Woessner, Jr., *FASEB J.* 5 (1991) 2145–2154.
- [14] D.L. Thiele, P.E. Lipsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990) 83–87.
- [15] Z. Werb, C.M. Alexander, in: W.N. Kelly, E.D. Harris, S. Ruddy, C.B. Sledge (Eds.), *Textbook of Rheumatology*, WB Saunders Company, Philadelphia, 1993, pp. 82–92.
- [16] R. Bansal, N. Ahmad, J. Kdwail, *Acta Diab. Lat.* 17 (1980) 255–266.
- [17] J.D. Bagdade, K.L. Nielson, R.J. Buger, *Am. J. Med. Sci.* 263 (1972) 451–456.
- [18] S.V. Shan, J.D. Wallin, S.D. Eilen, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 57 (1983) 402–409.
- [19] W. Marhofer, M. Stein, L. Schleinkofer, K. Federlin, *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 165–170.
- [20] W. Kemmler, D.F. Steiner, J. Borg, *J. Biol. Chem.* 248 (1973) 4544–4551.
- [21] S. Ansoorge, H. Kirschke, K. Friedrich, *Acta Biol. Med. Germ.* 36 (1977) 1723–1730.

TESIS COM
FALLA DE ...

- [22] G.L. Weir, J.L. Leary, in: C.R. Kahn, G.C. Wier (Eds.), *Joshi's Diabetes Mellitus*, Lea & Febiger, Pennsylvania, 1994, pp. 240–264.
- [23] D. Giugliano, A. Ceriello, G. Paolisso, *Diabetes Care* 19 (1996) 257–267.
- [24] M. Cantero, *Diabetes Care* 21 (1998) 326–327.
- [25] L. Llorente, Y. Richaud-Patin, A. Díaz-Borjón, J. Jakez-Ocampo, C. Alvarado-de la Barrera, *Clin. Exp. Immunol.* 116 (1999) 425–429.
- [26] J.W. Baynes, S.R. Thorpen, *Diabetes* 48 (1999) 11–19.
- [27] M. Delamare, D. Mougendre, M. Moreno, M.C. Le Goff, H. Allanic, B. Genetet, *J. Mal. Vasc.* 20 (1995) 107–112.
- [28] S.P. Wolff, *Brit. Med. Bull.* 49 (1993) 642–652.

Mecanismos de la respuesta inmune innata en pacientes con diabetes mellitus no insulino-dependiente evaluada por citometría de flujo

Luis Llorente-Peters ^a, Hortensia de-la-Fuente ^a, Yvonne Richaud-Patin ^a,
Claudia Alvarado-de-la-Barrera ^a, Alejandro Díaz-Borjón ^a,
Alfredo López-Ponce ^{b,c}, Israel Lerman-Garber ^b, Juan Jakez-Ocampo ^a

^a *Departamento de Inmunología y Reumatología, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México, D.F.*

^b *Departamento de Endocrinología y Metabolismo, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México, D.F.*

^c *Residente del Curso de Especialización en Medicina Interna, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, México, D.F.*

Resumen

Es un hecho bien descrito que las infecciones en pacientes con diabetes mellitus (DM) pueden ser más serias, aunque parece controversial una mayor susceptibilidad a estas. Los mecanismos de la respuesta inmune inespecífica pueden estar relacionados a la capacidad de defensa o a la susceptibilidad a diversos patógenos. El propósito de este estudio fue investigar la actividad de diversas enzimas involucradas en los mecanismos primarios de defensa en pacientes con DM no requirientes de insulina. Fueron incluidos veinte pacientes del género femenino con DM-2, con una hemoglobina glucosilada (HbA_{1c}) promedio de 8.19%; ninguna de ellas tenía evidencia clínica de alguna infección al momento del estudio. También fueron estudiadas 20 mujeres sanas como controles. Las enzimas evaluadas fueron dipeptidil-peptidasa 1 (DPP-1), catepsina B y D, niacín-adenosín-difosfato (NADPH) oxidasa y superóxido dismutasa (estas dos como evaluación de estallido oxidativo) y colagenasa. Se incubaron leucocitos aislados de sangre total con substratos específicos para estas enzimas en medio libre de pirógenos, y la actividad enzimática intracelular se analizó mediante citometría de flujo. La actividad de la colagenasa fue similar en las tres subpoblaciones de leucocitos estudiadas. La inducción de estallido oxidativo en monocitos fue comparable entre mujeres sanas y con DM-2. La actividad enzimática de las catepsinas B y D (en todas las subpoblaciones celulares), el estallido oxidativo (en leucocitos polimorfonucleares [PMN]), y la actividad de la DPP-1 (en linfocitos y monocitos) fueron mayores en las mujeres diabéticas que en aquellas sanas ($p < 0.05$). Estos resultados demuestran sobre todo una estimulación del estado funcional de varias enzimas intracelulares leucocitarias en la DM-2. Más

aún, un incremento en la inducción de estallido oxidativo y la consecuente producción de radicales libres podrían contribuir al desarrollo de complicaciones vasculares en esta entidad. Es necesario estudiar más a fondo otros mecanismos - ya sean los relacionados a la respuesta inmunológica específica o inespecífica- para determinar si los pacientes diabéticos son más susceptibles que la población general a padecimientos infecciosos. *Immunology Letters* 2000, 74: 239-244.

Palabras clave: leucocitos, enzimas intracelulares, diabetes, respuesta inmune no específica, citometría de flujo.

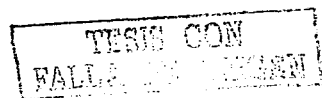
1. Introducción

Es un hecho comúnmente aceptado que las infecciones en pacientes con DM son más severas que en la población general [1]. La respuesta inmunológica inespecífica constituye la primera línea de defensa contra varios microorganismos en general y tiene un papel clave en el control de infecciones bacterianas. Este tipo de funciones está regulado por células fagocíticas, principalmente neutrófilos PMN y macrófagos, los cuales son capaces de eliminar microorganismos invasores mediante la liberación de varias sustancias químicas contenidas en gránulos (en el caso de los neutrófilos) o lisosomas (en el caso de los macrófagos) [2]. Otro mecanismo involucrado en la eliminación de patógenos es el estallido oxidativo. Con el estímulo preciso, tanto los macrófagos como las células PMN incrementan marcadamente su obtención de oxígeno del medio para sintetizar metabolitos tóxicos para los agentes infecciosos [2,3].

En pacientes con DM, la mayor incidencia de infecciones complicadas en tejidos blandos, vías aéreas bajas y tracto urinario se debe, cuando menos en parte,

a una función leucocitaria deficiente [1]. Los macrófagos y los PMN de estos pacientes han mostrado alteraciones en fagocitosis y actividad bactericida [4-6]. También se han reportado defectos funcionales en otras células encargadas de la respuesta inmunológica específica, como los linfocitos B [7]. Sin embargo, hay controversia en cuanto a la correlación del daño en las funciones leucocitarias y el descontrol metabólico de esta enfermedad [8,9]. Varios estudios han reportado una producción elevada de radicales libres intraleucocitarios en pacientes con DM [8,10], aunque también se ha sugerido que una deficiente producción de los mismos es la responsable de una menor capacidad para destruir microorganismos fagocitados [11,12].

Con el objeto de tener un panorama en estos pacientes acerca de los principales mecanismos involucrados en la respuesta inmunológica inespecífica, este estudio se diseñó para analizar la actividad de diversas enzimas que participan en la migración celular, inflamación, degranulación de PMN, proteólisis intracelular e inducción de estallido oxidativo en leucocitos de mujeres con DM-2.



2. Material y métodos

2.1. Sujetos

Se incluyeron 20 mujeres con DM no insulino-requirientes, con edades que iban de los 40 a los 64 años (edad promedio 53 ± 7 años), y con diagnóstico de DM-2 de entre 5 meses y 10 años (promedio 5 ± 3 años). No se incluyeron pacientes que presentaran estado hipersomolar no cetósico, cetoacidosis, embarazo o complicaciones crónicas como insuficiencia renal, retinopatía proliferativa, cardiopatía isquémica o neuropatía clínicamente significativa, determinada por síntomas como disestesias o parestesias. Se descartó la presencia de infecciones por medio de exploración física, examen general de orina, citología hemática completa, citología exfoliativa vaginal (Papanicolau) y radiografía simple postero-anterior de tórax.

El grupo control estuvo formado por 20 mujeres sanas cuyas edades iban de los 39 a los 61 años (promedio 52 ± 6 años). Cuatro pacientes y 3 controles se encontraban recibiendo terapia de reemplazo hormonal al momento del estudio. Se obtuvo consentimiento por escrito de todas las mujeres incluidas en el estudio después de haberseles informado de los propósitos y métodos de este.

2.2. Muestras

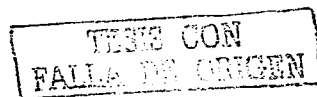
Se obtuvieron muestras de sangre periférica después de un ayuno nocturno de las 19:00 a las 07:45 horas. Cinco mililitros de sangre total heparinizada fueron lavados dos veces en medio PBS libre de pirógenos con el objeto de remover las enzimas extracelulares que hubieran podido interferir con los ensayos. Después de remover el sobrenadante, los eritrocitos fueron

lisados en solución FACS (Becton Dickinson Laboratories, San José, California) durante 20 minutos y los leucocitos fueron obtenidos mediante lavado de la solución por dos veces. Se ajustó la concentración de las células obtenidas a 4×10^6 células/ml en medio PBS.

Tres mililitros de sangre anticoagulada con EDTA se usaron para el ensayo por captura iónica de la medición cuantitativa del porcentaje de HbA_{1c} (Abbott Imx Glycated Hemoglobin Assay, Abbott Laboratories, Abbott Park, Illinois).

2.3. Análisis por citometría de flujo de las enzimas intracelulares

El análisis citoenzimológico usado en este estudio consiste en una técnica uricelular en la que un sustrato enzimático (Coulter-Beckmann, Hialeah, Florida), entra en el espacio intracelular de la célula estudiada. Cuando este compuesto se hidroliza por una enzima intracitoplásmica específica, se obtiene de la reacción un producto fluorescente que puede ser detectado por citometría de flujo. Para cada muestra probada (solución "en blanco" y solución con enzima), 50 μ l de la suspensión con células fueron calentados a 37 °C por 10 minutos. Después, tanto 25 μ l de medio PBS (solución "en blanco") o del correspondiente sustrato enzimático fueron añadidos al tubo de la muestra e incubados a 37 °C por el tiempo sugerido para cada enzima de acuerdo a las especificaciones del fabricante de los reactivos. Después de la segunda incubación, las muestras fueron almacenadas en hielo triturado por 3 minutos para detener la reacción enzima-sustrato, y se añadieron 0.3 ml de medio PBS libre de pirógenos para el análisis inmediato. Se realizó la citometría de



flujo en un sistema FACScan (Becton Dickinson), utilizando un software Consort 30. En base a sus características morfológicas correspondientes, se determinaron puertas electrónicas para PMN, monocitos y linfocitos con el objeto de analizar estas poblaciones separadamente. Se registró la intensidad de canal de fluorescencia (modo) para cada solución "blanco", enzima y subpoblación celular. Los resultados se expresaron como el índice obtenido del valor del modo "enzima" y el del modo "blanco" (índice del modo del canal de fluorescencia [*fluorescence channel mode ratio*, FCMR], o valor de intensidad de fluorescencia), para cada una de las subpoblaciones celulares. Las enzimas evaluadas y los substratos empleados fueron los siguientes:

Colagenasa. Para esta enzima se usó como sustrato Gly-Phe-Gly-Ala-rodamina (Rho) 110. Las colagenasas están involucradas en la migración celular, los mecanismos de defensa del huésped y la degranulación de PMN [13]. DPP-1. Se usó como sustrato para esta enzima Leu-Leu-Rho 110. Esta enzima se expresa en niveles elevados en células citotóxicas y se le ha implicado en el mantenimiento del crecimiento celular y la degradación de proteínas intracelulares [14].

Catepsinas B y D. Estas enzimas tienen un efecto cooperador en la migración celular, mecanismos de defensa del huésped, inflamación, degranulación de PMN y en el metabolismo de la insulina [15,16]. El sustrato empleado para su análisis fue Val-Lys-Rho 110.

NADPH oxidasa y superóxido dismutasa. También se estudió la inducción de estallido oxidativo por estas dos enzimas sobre el diclorofluoresceín-diacetato como sustrato, el cual después de desacetilarse queda atrapado adentro de la célula para convertirse en

diclorofluoresceína mediante la acción de H_2O_2 . Este compuesto contiene forbol-miristato-acetato, el cual activa a la NADPH oxidasa, la enzima responsable del estallido oxidativo.

2.4. Análisis estadístico

Los datos se analizaron mediante las pruebas de la "U" de Mann Whitney y de regresión lineal. Se estableció significancia estadística con una $p < 0.05$.

3. Resultados

Se evaluó por citometría de flujo la actividad de varias enzimas intracelulares en leucocitos obtenidos de pacientes con DM-2 y mujeres sanas. Se realizaron análisis por separado para cada enzima y solución "blanco" en PMN, monocitos y linfocitos. Los valores de FCMR se expresaron en forma de promedio \pm SEM y se presentaron en histogramas.

3.1. Colagenasa

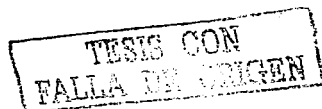
No se encontraron diferencias en cuanto a la actividad de la colagenasa en cualquier subpoblación celular, tanto en pacientes como en sujetos control.

3.2. DPP-1

Los linfocitos y los monocitos de las pacientes con DM-2 mostraron una actividad incrementada de DPP-1 cuando se les comparó contra las mismas poblaciones celulares de las mujeres sanas ($p < 0.05$).

3.3. Catepsinas B y D

En todas las subpoblaciones celulares de las mujeres con DM-2 se demostró una



actividad aumentada de estas dos enzimas cuando se les comparó con los controles ($p < 0.05$).

3.4. Estallido oxidativo (NADPH oxidasa y superóxido dismutasa)

Las células PMN de las pacientes diabéticas mostraron una mayor actividad de estallido oxidativo comparada con la misma subpoblación celular de las mujeres sin DM-2 ($p = 0.02$),

Los resultados arriba descritos se muestran en la tabla 1. La figura 1 muestra experimentos citométricos de flujo representativos de una paciente con DM-2 y de una mujer sana.

3.5. Control metabólico

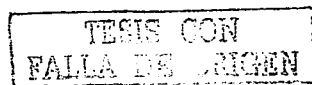
Se definió al control metabólico en base a los valores medidos de HbA_{1c}, los cuales son un reflejo de las concentraciones séricas promedio de glucosa durante los últimos 1-3 meses. Se consideró como un valor normal 6.1%; todos los sujetos control se encontraron por debajo de este valor. Se definió como un buen control de DM una HbA_{1c} por debajo de 8% (11 de 20 pacientes), como un control regular una HbA_{1c} de 8 a 10% (7 de 20 pacientes) y como un control pobre una HbA_{1c} de más del 10% (2 de 20 pacientes).

No se encontró alguna correlación entre las enzimas o subpoblaciones celulares estudiadas y las características clínicas de las pacientes, como edad, tiempo de diagnóstico de DM-2, control glucémico, tipo de tratamiento (incluyendo terapia de reemplazo hormonal), índice de masa corporal, presencia de hipertensión arterial sistémica o hábito tabáquico (datos no mostrados).

4. Discusión

Una complicación común en la DM es la presencia de infecciones eventualmente más severas, aunque hay controversia acerca de si estos pacientes tienen una susceptibilidad incrementada a este tipo de enfermedades tan sólo por su trastorno metabólico de base [1]. Una función leucocitaria anormal puede contribuir en parte a un deterioro en la respuesta normal a patógenos. Se ha descrito que las funciones quimiotácticas, fagocíticas y bactericidas se encuentran disminuidas en presencia de DM [9,17]. En este estudio, se analizaron varias enzimas involucradas en los mecanismos de la respuesta inmune no específica en leucocitos de mujeres con DM-2, no insulino-requirientes. No se encontró disminución de la actividad enzimática en las tres subpoblaciones de leucocitos estudiadas en las pacientes con DM-2, aunque sí un incremento en la actividad de DPP-1, catepsinas B y D e inducción de estallido oxidativo, no relacionado al control metabólico de las pacientes ni a sus características clínicas. Estudios previos han utilizado métodos de quimioluminiscencia para medir el estallido oxidativo en DM [18,19]. En el presente estudio se empleó la citometría de flujo, un método confiable con alta sensibilidad y especificidad para evaluar actividad enzimática.

Los presentes resultados mostraron una actividad elevada de DPP-1 en linfocitos y monocitos en pacientes con DM-2 comparada con la de mujeres no diabéticas. Esta enzima es propia de células con función citotóxica, como macrófagos, linfocitos T CD8+ y células NK [14]. Aunque en este estudio no se cuantificaron o evaluaron específicamente estas subpoblaciones celulares, los hallazgos obtenidos concuerdan con una función citotóxica



competente en la DM-2. Además, una función citotóxica íntegra es esencial para la defensa contra infecciones oportunistas [2].

Se encontró también un incremento en la actividad de catepsinas B y D en pacientes con DM-2. Como ya se comentó, estas enzimas participan en la migración celular, la degranulación de PMN, el procesamiento de antígenos y el metabolismo de la insulina [15,16]. Este último punto merece especial atención, ya que las catepsinas B y D participan en la conversión de pro-insulina a insulina en las células de Langerhans [20] y en los hepatocitos de rata [21]. La pro-insulina, cuando se encuentra elevada en sangre periférica, puede ser considerada como un marcador de riesgo para desarrollar DM-2 en un futuro [22]. Considerando lo anterior, parece tentador especular que los leucocitos pueden participar en la depuración o incluso en la conversión de pro-insulina en insulina en los pacientes diabéticos, contribuyendo de esta manera a la regulación y/o compensación de este trastorno metabólico. Parece necesaria más investigación para esclarecer el posible papel de los leucocitos, si es que tienen alguno, en el metabolismo de la pro-insulina.

Un hallazgo interesante fue el incremento del estallido oxidativo observado en las células PMN de las pacientes diabéticas. Aparte del papel bien conocido del daño por productos de oxidación a agentes infecciosos, vale la pena mencionar que una elevada producción de H_2O_2 por parte de los leucocitos en personas con DM puede contribuir al desarrollo de complicaciones vasculares [23,24]. Esto contrasta fuertemente con los hallazgos previos de los autores del presente trabajo, en donde el estallido oxidativo en mujeres ancianas sanas fue comparable o incluso reducido respecto al de sujetos controles [25]. Varios

estudios en modelos animales de diabetes han demostrado una reducción de estallido oxidativo y/o sus complicaciones después de administrarse suplementos anti-oxidantes [26]. Sin embargo, el efecto de este tipo de tratamientos en humanos no es concluyente [24,26].

En base a todo lo anterior, los resultados aquí presentados llevan a varias interpretaciones que, de ninguna manera, son mutuamente excluyentes u opuestas:

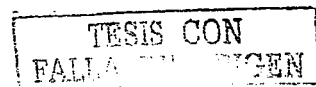
(i) La actividad funcional enzimática más elevada en leucocitos de pacientes con DM-2 puede consistir en un defecto inherente a la enfermedad -al menos en las enzimas estudiadas-, no necesariamente relacionado al control metabólico de esta o a diversas características clínicas de los pacientes. (ii) El perfil enzimático en pacientes con DM-2 aquí presentado no descarta alteraciones en otros mecanismos de defensa inespecíficos como opsonización, quimiotaxis y fagocitosis, los cuales, por otra parte, sí se han encontrado dañados en presencia de DM [9,17]. Aún más, se tienen que considerar otros mecanismos inmunes específicos como la respuesta humoral y celular. Otros factores, como las anomalías de la circulación microvascular presentes en la DM pueden facilitar el desarrollo de infecciones e impedir una adecuada respuesta al tratamiento antibiótico [27]. (iii) Probablemente lo que sugieren los datos aquí obtenidos es que hay un desequilibrio homeostático -cuando menos en lo que a actividad enzimática intracelular se refiere- que, por un lado, trata de compensar o adaptarse al trastorno metabólico de base y que, por otra parte, intenta superar la susceptibilidad a infecciones y/o la severidad de las mismas. Sin embargo, como resultado a lo anterior, las consecuencias pueden ser deletéreas para

el organismo, por ejemplo un elevado estallido oxidativo que conlleva a diversas anomalías en la regulación de la producción de radicales libres, asociadas a complicaciones vasculares en pacientes diabéticos [23, 24, 26-28].

El incremento en la actividad enzimática intraleucocitaria en pacientes con DM no insulino-requirientes refleja una exacerbación funcional de esta rama de la respuesta inmune no específica en particular. Otros factores involucrados – tanto específicos como no específicos– merecen particular atención para dilucidar si efectivamente los pacientes con DM son más susceptibles a agentes infecciosos.

Bibliografía

1. Sentochnik D.E., Eliopoulos G.M., en: Kahn C.R., Wier G.C. (eds.); *Joslin's Diabetes Mellitus*, Lea-Feblinger, Pennsylvania, 1994, pp. 867-888.
2. Rotrosen, D., Gallin, J.I.; *Ann Rev Immunol* 1987, 5: 127-150.
3. Weissmann G., Smolen, J.E., Korchak H.M.; *New Engl J Med* 1980, 303: 27-31.
4. Babior B.M.; *J Clin Invest* 1984, 73: 599-601.
5. Tan J.S., Anderson J.L., Watanakunarkorn C., Phai J.P.; *J Lab Clin Med* 1975, 85: 26-32.
6. Chang F.Y., Shaio M.F.; *Diabetes Res Clin Pract* 1995, 29: 121-127.
7. Alexiewicz J.M., Kumar D., Smogorzewski M., Massry S.G.; *Am J Kidney Dis* 1997, 30: 98-104.
8. Bagdade J.D., Root R.K., Bulger R.J.; *Diabetes* 1974, 23: 9-15.
9. Delamaire M., Maugendre D., Moreno M., Le Goff M.C., Allanic H.; *Diab Med* 1997, 14: 29-34.
10. Marhoffer W., Stein M., Maeser E., Federlin K.; *Diabetes Care* 1992, 15: 256-260.
11. Sato N., Shimizu H., Suwa K., Shimomura Y., Kobayashi I., Mori M.; *Diabetes Care* 1992, 15: 1050-1052.
12. Inoue S., Lan Y., Muran J., Tsuji M.; *Diabetes Res Clin Pract* 1996, 33: 119-127.
13. Woessner J.F.; *FASEB J* 1991, 2145-2154.
14. Thiele D.L., Lipsky P.E.; *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87: 83-87.
15. Werb Z., Alexander C.M., en: Kelly W.N., Harris E.D., Ruddy S., Sledge C.B. (eds.); *Textbook of Rheumatology*, W.B. Sanders Company, Philadelphia, 1993, pp. 82-92.
16. Bansal R., Ahmad N., Kdwall J.; *Acta Diab Lat* 1980, 17: 255-266.
17. Bagdade J.D., Nelson K.L., Buger R.J.; *Am J Med Sci* 1972, 263: 451-456.
18. Shan S.V., Wallin J.D., Eiten S.D.; *J Clin Endocrinol Metab* 1983, 57: 402-409.
19. Marhoffer W., Stein M., Schleinkofer L., Federlin K.; *J Biolumin Chemolumin* 1994, 9: 165-170.
20. Kemmler W., Steiner D.F., Borg J.; *J Biol Chem* 1973, 248: 4544-4551.
21. Anson S., Kirschke H., Friedrich K.; *Acta Biol Med Germ* 1977, 36: 1723-1730.
22. Weir J.L., Leany J.L., en: Kahn C.R., Wier G.C. (eds.); *Joslin's Diabetes Mellitus*, Lea-Feblinger, Pennsylvania, 1994, pp. 240-264.
23. Giugliano D., Ceriello A., Paolisso G.; *Diabetes Care* 1996, 19: 257-267.
24. Cantero M.; *Diabetes Care* 1998, 21: 326-327.
25. Llorente L., Richaud-Patin Y., Díaz-Borjón A., Jakez-Ocampo J., Alvarado-de-la-Barrera C.; *Clin Exp Immunol* 1999, 116: 425-429.
26. Baynes J.W., Thorpen S.R.; *Diabetes* 1999, 48: 11-19.
27. Delamaire M., Maugendre D., Moreno M., Le Goff M.C., Allanic H., Genetet B.; *J Mal Vasc* 1995, 20: 107-112.
28. Wolff S.P.; *Brit Med Bull* 1993, 49: 642-652.



Apéndices

Tabla 1. Actividad enzimática intracitoplásmica en leucocitos de pacientes diabéticas y sanas (controles). Los valores se expresan como promedios \pm error estándar del índice del modo de canal de fluorescencia (FCMR), o valor de intensidad de fluorescencia.
* $p < 0.05$ en comparación con los controles. NE = no evaluado.

Figura 1. Experimentos representativos en una paciente con DM-2 y una mujer sana. La actividad enzimática se midió mediante citometría de flujo. Los leucocitos aislados de una paciente con DM-2 se representan en los histogramas con áreas negras y los leucocitos de la mujer control en los histogramas con áreas grises. Las abscisas corresponden a la concentración leucocitaria por mm^3 y las ordenadas muestran el valor del índice de intensidad de fluorescencia (FCMR).

Fila superior de histogramas: PMN. Fila intermedia: monocitos. Fila inferior: linfocitos.
Etiquetas de las columnas: prueba "blanco", dipeptidil-peptidasa 1, catepsinas B y D, estallido oxidativo y colagenasa, respectivamente.

Facsímil original de la publicación del presente trabajo, como artículo original. Referencia: *Immunology Letters* 2000, 74: 239-244.

Tabla 1

Subpoblación celular	Colagenasa		Estallido oxidativo		DPP-1		Catepsinas B y D	
	Controles	DM-2	Controles	DM-2	Controles	DM-2	Controles	DM-2
Linfocitos	11.4 ± 3.1	10.5 ± 1.1	NE	NE	4.6 ± 0.6	6.0 ± 0.3'	25.5 ± 6.8	53.0 ± 6.0'
Monocitos	17.9 ± 3.0	15.3 ± 1.4	10.8 ± 0.6	13.7 ± 1.1	6.4 ± 0.4	7.9 ± 0.3'	25.6 ± 3.6	38.5 ± 4.3'
Granulocitos	22.5 ± 4.8	20.6 ± 1.7	18.5 ± 1.5	23.6 ± 1.0'	NE	NE	33.5 ± 8.9	54.0 ± 9.3'

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

TESIS CON
FALLA DE CENSURA

Figura 1

