



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"



"Determinación de la vía de apoptosis y la expresión de la quimiocina Mcp-1 en células de sangre periférica en pacientes Diabéticos Tipo 2 con infección en tejidos blandos".

T E S I S

que para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo presenta:

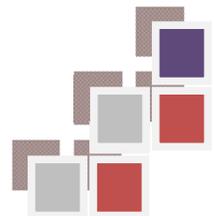
Miriam Hernández Atenógenes

**DIRECTOR, IMSS
ASESOR FES-Z, UNAM**

Dr. Mario Israel Vega Paredes
Dr. Rubén Marroquín Segura

- Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología, Hospital de Infectología "Dr. Daniel Méndez Hernández", Centro Médico Nacional "La Raza", IMSS.
- Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas, Hospital Infantil de México "Federico Gómez", SSA

Junio 22, 2009





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.

Agradecimientos

- ✓ **Dios:** te agradezco por darme esta oportunidad llamada vida, me has permitido ser la protagonista, productora y directora de mi vida. Sin embargo me falta mucho por recorrer y aprender. Gracias por ser esa luz sobre mis hombros, la guía de mi camino y por las bendiciones, la principal de ellas: Mi Familia.
- ✓ **Papá y Mamá:** ustedes me han heredado lo mas valioso que se le puede dar a una hija: amor, comprensión y su tiempo. Han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme, es un hecho que sin sus regaños y guía, yo no estaría por concluir algo tan importante. Yo soy una parte de lo que ustedes son, pero debo decirles que aun me falta mucho por aprender de ustedes. En los momentos más felices y amargos de mi vida; han reído y llorado conmigo, me brindaron su apoyo, su palabra de aliento; nunca me han dejado sola.

Este pequeño paso es de ustedes, porque sin las herramientas que ustedes me han brindado yo no habría tenido alas para volar.

¡Eso nunca podre pagarlo con nada! ¡Por esto y más Gracias!

Los amo y agradezco infinitamente que ustedes sean mis padres. NLD

- ✓ **Mamá:** tú eres una guía incondicional, eres un pedazo enorme de mi vida, a ti te debo mucho de lo que soy ahora. Has estado conmigo desde siempre, me enseñaste a caminar, las tareas de la escuela, a resolver los problemas, a ver mis errores y a levantarme de las caídas. ¡Gracias Mamá!
- ✓ **Papá:** tú eres el complemento de mi formación, me has enseñado a ser fuerte y a no perder la cabeza, eres junto con mi mama, el pilar principal. Deseo que te sientas orgulloso y que al final del día puedas decir: "No he vivido en vano". ¡Gracias Papá!
- ✓ **Dey:** eres pilar de mi vida, eres mi motivación, mi alegría, eres mi pequeña hija, juntas hasta el final. TA BB.
- ✓ **Axel.** Eres un chiquito muy especial al que debo decirle que al igual que Deyra son pieza clave en mi vida. TA, Axelito.
- ✓ **Hermanos (Araceli, Mamá Silvia y Rubén):** su tiempo, consejos, regaños y sobre todo apoyo a lo largo de todo este tiempo, es un tesoro que aprecio mucho y que ha marcado mi vida. No tengo como pagarles lo que han hecho por mi, me han ayudado en diversos aspectos. Nunca olviden que los quiero mucho y que les estoy agradecida por todo.
- ✓ **Abuelitos (Juanita y Ángel):** ustedes estuvieron en mi infancia, me cuidaron y me brindaron protección, así como enseñanzas e historias que han enriquecido mi vida, son unos ángeles protectores.
- ✓ **Nancy y Miguel.** Gracias por compartir las experiencias de la niñez y brindarme su apoyo.

A toda mi familia, mil gracias, por su apoyo incondicional y por la confianza que me han tenido.

¡GRACIAS!

A la UIMII debo agradecer que me abriera sus puertas y que me permitiera realizar este proyecto.

- ✓ **Dr. Mario Vega.** Le agradezco por aceptarme como su alumna, aprendí muchas cosas, tanto académicas como en el ámbito personal. Gracias por sus consejos, paciencia, enseñanzas y por el tiempo brindado a lo largo de este proyecto. Lo cual contribuyo a concluir esta labor.
- ✓ **Dr. Cesar González.** Le agradezco que me haya permitido realizar mi proyecto en la unidad y más aun que me haya apoyado en un momento muy difícil.
- ✓ **Berna:** Eres una persona a la cual debo agradecer lo que aprendí en mi estancia en la UIMII, me tuviste paciencia y me enseñaste una infinidad de cosas practicas y teóricas, siempre estabas dispuesto a explicar, además, eres un buen compañero. Por esto y muchas cosas más: ¡Gracias Berna!
- ✓ **JC.** Gracias por tu tiempo y enseñanzas de las técnicas las cuales fueron pieza importante para comprender el proyecto.
- ✓ **Bere.** Gracias por brindarme tu apoyo en un momento crítico de mi vida, en verdad muchas gracias.
- ✓ **Nancy.** Al igual que a todos debo darte las gracias por tu amistad y por estar presente en tiempos delicados.

UIEO

- ✓ **Dra. Sara Huerta.** Le agradezco el tiempo y espacio brindados en la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas, del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”, así como su tiempo y enseñanzas que me brindo a lo largo de este proyecto, las cuales permitieron llegar a la culminación del mismo.
- ✓ **Guille.** Muchas gracias por ayudarme con mi proyecto cuando estuve de estancia por el infantil.

Saber que se sabe lo que se sabe y que no se sabe lo que no se sabe; he aquí el verdadero saber.

Confucio

INDICE

Contenido

ABREVIATURAS.....	4
1. RESUMEN.....	6
2. INTRODUCCIÓN.....	7
2.1 Definición.....	7
2.2 Epidemiología.....	7
2.3 Fisiopatología.....	8
2.4 Complicaciones de la DM2.....	9
2.5 Infecciones en Tejidos Blandos (ITB).....	11
2.6 DM2/Apoptosis.....	11
2.7 Proteína Quimioatrayente de Monocitos (<i>Monocyte Chemoattractant Protein-1, MCP-1</i>)...	12
2.8 Apoptosis.....	15
2.8.1 Vía Extrínseca.....	18
2.8.2 Vía Intrínseca.....	18
3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	22
4. OBJETIVOS.....	23
4.1. General.....	23
4.2. Especificos.....	23
5. HIPOTESIS.....	24
6. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN.....	25
6.1. POBLACIÓN.....	25
6.2. CRITERIOS.....	25
6.2.1. Criterios de inclusión.....	25
6.2.2. Criterios de exclusión.....	25
6.2.3. Criterios de eliminación.....	26
6.3. VARIABLES.....	26
6.3.1. Independientes.....	26
6.3.2. Dependientes.....	26
7. MATERIALES Y METODOS.....	27
7.1. Purificación de células de sangre periférica.....	27
7.2. Preparación de laminillas.....	27
7.3. Citoinmunoquímica.....	27
7.4. Determinación Apoptosis mediante la técnica de TUNEL.....	29
7.5. Cuantificación de células positivas inmunoteñidas.....	29

7.6.	Análisis Estadístico.....	29
8.	RESULTADOS	31
8.1.	Descripción clínica.....	31
8.2.	Determinación de apoptosis por TUNEL.....	31
8.3.	Apoptosis determinada por la expresión de Caspasa-3 activa.....	32
8.4.	Análisis de la expresión de Caspasa-8 activa.....	33
8.5.	Análisis de la expresión de Caspasa-9 activa.....	33
8.6.	Análisis de la expresión de MCP1.....	34
8.7.	Análisis de la correlación entre la apoptosis y la expresión de Caspasa 8, 9 y MCP-1 en los pacientes con DM2/ITB.....	34
8.8.	Análisis de la correlación entre los niveles de glucosa y la apoptosis, expresión de Caspasa-8, 9 y MCP-1 en los pacientes con DM2/ITB.....	35
8.9.	Análisis de la expresión de MCP-1 y los niveles de glucosa en los diferentes subgrupos de pacientes con DM2/ITB.....	35
9.	DISCUSIÓN.....	36
10.	CONCLUSIONES.....	44
11.	ANEXO.....	45
11.1.	Tablas.....	45
11.2.	Figuras.....	47
11.2.1.	Apoptosis Cuantificada por TUNEL.....	47
11.2.2.	Apoptosis determinada por la expresión de Caspasa-3 activa.....	49
11.2.3.	Expresión de Caspasa-8 activa.....	51
11.2.4.	Expresión de Caspasa-9 activa.....	53
11.2.5.	Expresión de Mcp-1.....	55
11.3.	Gráficas de Correlaciones Estadísticas	57
12.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	61

ABREVIATURAS.

AGEs	Productos Avanzados de Glicación
AIF	Factor Inductor de Apoptosis
APAF-1	Factor Activador de Proteasa-1
Bcl-2	B Cell Leukemia/Lymphoma-2
BAX	B-cell lymphoma 2 (BCL-2)-associated protein X
BAK	BCL-2 antagonist/killer
BIM	BCL-2-interacting mediator of cell death
CARD	Dominio Reclutador de Caspasas
CMN	Células Mononucleares
C-3	Caspasa-3
C-8	Caspasa-8
C-9	Caspasa-9
DAG	Diacil Glicerol
DD	Dominio de Muerte
DED	Dominio Efector de Muerte
DM1	Diabetes Mellitus tipo1
DM2	Diabetes Mellitus tipo2
DM2/ITB	Diabetes Mellitus 2 e Infección en Tejidos Blandos
DR5	Receptor de Muerte 5
ENSA	Encuesta Nacional de Salud
Fas	CD95 (Fas/APO-1) Antígeno de apoptosis 1
FasL	CD178 (FasL/CD95L/TNFSF6) Factor Soluble TNF.
FN	Fascitis Necrozante
FGR	Filtrado glomerular renal
GLUT	Transportador de Glucosa
GLUT-4	Transportador-4 de Glucose
GF	Gangrena de Fournier
IFN-γ	Interferón gama
LPS	Lipopolisacarido
MCP-1	Proteína Quimioatrayente de Monocitos-1
MOMP	Permeabilización de la membrana mitocondrial
NFκB	Factor Nuclear Kappa B
NK	Células Asesinas Naturales
NOD	Diabéticos no Obesos
OMS	Organización Mundial de la Salud

PBS	Solución Amortiguadora de Fosfatos
PMN	Polimorfonucleares
PUMA	Modulador de apoptosis regulado por p53
ROCK1	RAS homologue (RHO)-associated coiled-coil-containing protein kinase 1
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SS	Solución Salina
SSA	Secretaría de Salud
Smac/DIABLO	Second mitochondria derived activator of caspases/ direct IAP binding protein with low pl.
TGF-α	Factor de Crecimiento Tumoral-alpha
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TNF-R	Receptor del Factor de Necrosis Tumoral.
TUNEL	Terminal-Deoxinucleotidyl-transferase mediated dUTP-digoxigenin nick end labelling.

“Determinación de la vía de apoptosis y la expresión de la quimiocina Mcp-1 en células de sangre periférica en pacientes Diabéticos Tipo 2 con infección en tejidos blandos”.

1. RESUMEN

La diabetes mellitus tipo 2 (DM2) constituye un problema de salud pública creciente. Es una enfermedad caracterizada por hiperglucemia, a consecuencia de defectos en la secreción de la insulina, en la acción o ambos, lleva a graves alteraciones en el metabolismo y al daño orgánico múltiple. Las Infecciones de Tejidos Blandos (ITB) son frecuentes en pacientes diabéticos, ya que cursan un estado continuo de hiperglucemia, aumentando la apoptosis de células de sangre periférica, por lo que son incapaces de enfrentar de manera eficiente una infección.

***Objetivo:** Determinar la vía de apoptosis y la expresión de la quimiocina MCP1 en células mononucleares (CMN) de sangre periférica de pacientes con DM2 e ITB y su correlación con los niveles de glucosa.*

***Materiales y Métodos:** Se analizaron CMN de 20 pacientes con DM2/ITB, 15 pacientes con DM2 controlada y 20 controles. Se purificaron mediante separación por gradiente, parte de las células fue sometida a choque térmico. Evaluamos apoptosis por medio de fragmentación de DNA por la técnica de TUNEL. Se realizó inmunotinción con los anticuerpos: anti- Caspase-3, Caspase-8 y Caspase-9 activas. Las laminillas se analizaron en un microscopio y se cuantificaron 200 células, utilizando un analizador de imágenes. La información se procesó utilizando un programa de análisis estadístico, se calcularon medias aritméticas y desviación estándar.*

***Conclusión:** Existe incremento en la apoptosis inducida en CMN de pacientes DM2/ITB. Demostramos la participación de la Caspasa 8 activa en la apoptosis que experimentan estas células, infiriendo que mueren preferentemente a través de la vía extrínseca. Expresan Caspasa 9, sin embargo no es significativo. Por primera vez se determinó la expresión de la quimiocina MCP-1, los valores de glucosa sanguínea correlacionan negativamente con su expresión, infiere de alguna manera que la inmunosupresión que presentan las células de los pacientes, es propiciada además de la linfocitosis ocasionada por la apoptosis; por la baja expresión de mediadores quimioatrayentes, como MCP1, en hiperglucemia.*

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Definición

La Diabetes Mellitus Tipo 2 (DM2) es un síndrome que se caracteriza por alteraciones del metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas, asociado a deficiencias en la secreción de insulina, de su acción, o de ambas ⁽¹⁾. Es una condición crónica que ocurre cuando el páncreas no produce suficiente insulina o el organismo es incapaz de utilizar la insulina que produce. Hay dos formas de diabetes: DM Tipo 1, los pacientes que la padecen producen poca o nada de insulina, DM Tipo 2, los pacientes no utilizan la insulina adecuadamente. Existe actualmente una tercera categoría la cual es denominada Diabetes Gestacional (GDM), que se desarrolla durante el embarazo pero usualmente desaparece después del nacimiento.

2.2 Epidemiología

La diabetes afecta actualmente a más de 246 millones de personas en el mundo y se espera que alcance los 366 millones en 2030. La mayoría de los casos se presentan en países en vías de desarrollo⁽²⁾. En el año 2007 México ocupó el noveno lugar mundial en incidencia de DM con una cifra de 6 millones (20-79 años), y de seguir la tendencia actual, en el año 2025 se ubicará en el séptimo sitio con 10 millones de personas que padecen esta enfermedad⁽³⁾. La prevalencia de diabetes mellitus en México es también de las más altas del mundo actualmente es de 9.4% y alcanzara un porcentaje de 12.2% para el año 2025⁽⁴⁾; y afecta además a individuos en edad productiva, si consideramos que más del 50% de los pacientes registrados en la Secretaría de Salud (SSA), tienen entre 35 y 60 años de edad. En México esta enfermedad paso del segundo lugar de mortalidad en el año 2004 al primer lugar en el 2007⁽⁵⁾.

La diabetes mellitus representa altos costos para el individuo, la sociedad y la mayoría de estos costos se derivan de varias complicaciones que se pueden reducir, aplazar e incluso prevenir si se controla. Además de la alta prevalencia y ser la primera causa de muerte, es la principal causa de demanda de atención médica en consulta

externa, una de las principales causas de hospitalización y la enfermedad que consume el mayor porcentaje del gasto de nuestras instituciones públicas⁽⁶⁾.

El Instituto Nacional de Salud Pública (INSP) estima que el impacto económico de la diabetes en México, genera un gasto anual de 317 millones solo para el cuidado de los pacientes; de los porcentajes más elevados del presupuesto en salud⁽⁷⁾. El INSP también indica que el gasto anual por diabetes equivale a: 4.7% del gasto público para la Secretaría de Salud (38 millones de dólares). 6.5% del gasto para IMSS e ISSTE (103 millones de dólares). El costo de la atención de los pacientes con enfermedades crónicas, como la diabetes, compromete la viabilidad del sistema de salud⁽⁸⁾

En 2004 murieron 15 mil personas más que en el año 2000 a consecuencia de las complicaciones de la diabetes. Actualmente una de cada tres muertes en México reporta diabetes como causa secundaria. En un estudio con pacientes diabéticos, informó que las causas más frecuentes de hospitalización fueron: las enfermedades en el sistema circulatorio (33%), desordenes inmunitarios, metabólicos, nutricionales y endocrinos (13%), sin embargo las infecciones son la segunda causa más frecuente en estos pacientes con un 14%.

2.3 Fisiopatología

En la DM2 hay dos factores involucrados: a) una disfunción de las células beta del páncreas, con falta de respuesta secretoria al estímulo de la glucosa sanguínea, y b) una resistencia periférica a los efectos biológicos de la insulina, tanto por disminución del número de los receptores insulínicos de la membrana celular, como de los receptores postmembrana, todo lo cual conduce a una excesiva producción de glucosa por el hígado y dificultades en la captación de ésta por el músculo y por los adipocitos. En otras palabras la resistencia insulínica puede ocurrir a cualquier nivel de la acción biológica de la insulina, desde su unión inicial a los receptores de la superficie celular, hasta su participación en la

cascada de fosforilación de la glucosa. Se ha constatado también su participación en el aumento en la secreción de glucagón⁽⁹⁾.

La resistencia a la insulina está directamente involucrada en la patogénesis de la DM2. Se describe como una respuesta biológica anormal a una determinada concentración de insulina; de hecho es un estado de hiperinsulinemia que se presenta como mecanismo compensador de la hiperglucemia. La resistencia a la insulina puede ocurrir en cualquier punto de la vía de señalización que lleva a la introducción de la glucosa a las células. Este proceso implica la unión de la insulina a su receptor en la membrana celular, lo que induce autofosforilación de los dominios citoplásmicos, que adquieren actividad de cinasa de proteínas y fosforilan otras proteínas como el substrato 1 del receptor de insulina (*Insulin Receptor Substrate-1, IRS-1*) que se une a trifosfato de inositol (*Inositol-3 Phosphate, IP-3*). El complejo IRS-1/IP-3 induce a su vez la fosforilación de diversas moléculas con capacidad de señalización intracelular que llevan, entre otras actividades, a la movilización de vesículas intracelulares que contienen la proteína transportadora de glucosa (*Glucose Transporter-4, GLUT-4*) desde el citosol a la membrana celular. La resistencia a la insulina puede deberse a defectos intrínsecos del receptor, a alteraciones en la vía de señalización o a defectos en los mecanismos de transporte de la glucosa al interior celular.

2.4 Complicaciones de la DM2

La diabetes es una enfermedad seria con múltiples complicaciones y de mortalidad prematura. Las complicaciones de la DM2 constituyen un problema para las instituciones de salud por el gasto en medicamentos, días de estancia hospitalaria y rehabilitación. Afectan a personas en edad productiva y tienen repercusiones en la calidad de vida y en la economía del país. Se ha destinado al menos 10% del total del presupuesto asignado al servicio médico, por complicaciones relacionadas con diabetes, en muchos países⁽¹⁰⁾,

La hiperglucemia es uno de los factores de riesgo reconocidos para la aparición y progresión de las alteraciones vasculares y neurológicas de la DM. La elevación mantenida en las concentraciones de glucosa provoca cambios en las proteínas plasmáticas y tisulares

con efectos indeseables. El aumento en la vía del poliol, los procesos de glucosilación no enzimático, el estrés oxidativo y el estrés carboxílico, son algunos mecanismos que explican el daño vascular inducido por la glucosa⁽¹¹⁾.

La nefropatía, retinopatía, neuropatía, cetoacidosis y estado hiperosmolar son algunas de las complicaciones más frecuentes en la DM⁽¹²⁾. Sin embargo estudios estadísticos basados en certificados de defunción, informan que la mayoría de las muertes están relacionadas con complicaciones cardiovasculares y renales más que cetoacidosis o hipoglucemia⁽¹³⁾. Un estudio con pacientes diabéticos, refirió que las causas más frecuentes de hospitalización fueron: las enfermedades en el sistema circulatorio (33%), desordenes inmunitarios, metabólicos, nutricionales y endocrinos (13%), sin embargo las infecciones son la segunda causa más frecuente en estos pacientes con un 14%. Destacan las infecciones de tejidos blandos, causa frecuente de hospitalización y de amputaciones.

Como ya se mencionó, con frecuencia la DM se asocia con infecciones, en especial cuando se presenta algún desequilibrio metabólico. Aunque la relación entre el control glucémico y el riesgo de adquirir infecciones no se conoce bien, se sabe que los pacientes diabéticos presentan una alta predisposición a adquirir infecciones intrahospitalarias, principalmente en situaciones post-operatorias o cuando se encuentran en terapia intensiva^(14;15). Los factores que contribuyen a incrementar la susceptibilidad a las infecciones en DM2 incluyen a las enfermedades vasculares periféricas (acompañadas generalmente por isquemia), neuropatía y disfunción del sistema inmune^(16;17).

En modelos experimentales se ha demostrado que la diabetes representa un riesgo adicional en las infecciones polimicrobianas. Los factores de riesgo adicionales para las infecciones necrozantes son la edad, el alcoholismo, enfermedad vascular, neoplasia, inmunodepresión, obesidad y insuficiencia renal crónica⁽¹⁾. En los ratones obesos diabéticos (modelo que corresponde a DM2) algunas bacterias como: *Escherichia coli*, *Bacterioides fragilis* y *Clostridium perfringens*, presentan un efecto sinérgico que resulta en mayor severidad de las infecciones polimicrobianas⁽¹⁸⁾. Los ratones NOD (que padecen DM1) establecen respuestas inflamatorias ineficientes, con menor producción de quimiocinas,

como la proteína inflamatoria 2 del macrófago (*Macrophage inflammatory protein-2, MIP-2*), reducción de estallido respiratorio y mayor daño en tejidos infectados por *Staphylococcus aureus*⁽¹⁹⁾.

2.5 Infecciones en Tejidos Blandos (ITB).

El término Tejido Blando se refiere al tejido que conecta, brinda soporte o rodea otras estructuras y órganos del cuerpo. Los tejidos blandos incluyen: tendones, ligamentos, fascias, tejido fibroso, tejido adiposo, membranas sinoviales, músculos y nervios

Las infecciones cutáneas y tejidos blandos constituyen un amplísimo grupo de cuadros clínicos de diversa etiología, patogenia y pronóstico localizados en la epidermis, dermis, tejido celular subcutáneo y/o músculo. La clasificación más utilizada de estos procesos es la que distingue tres grandes grupos: piodermas, infecciones necrozantes e infecciones secundarias a lesiones previas. La etiopatogenia de estas infecciones puede ser por cualquier tipo de microorganismo (virus, bacterias, hongos y parásitos), pero las bacterianas son las más frecuentes.

La infección de tejidos blandos es una de las complicaciones crónicas de la diabetes mellitus tipo 2; se caracteriza por alteraciones inmunológicas en la función de los leucocitos, como fagocitosis y quimiotaxis, y por alteraciones de los linfocitos que afectan la producción de citocinas, las cuales puede desempeñar un papel importante en la fisiopatología de la enfermedad.

2.6 DM2/Apoptosis

La apoptosis es un fenómeno que se encuentra involucrado en la patogenia de la diabetes y sus complicaciones. Se sabe que hay participación de apoptosis en el daño pancreático autoinmune en DM1⁽²⁰⁾. La apoptosis que se presenta en la hiperglucemia crónica se asocia con la degeneración vascular y neuronal de la diabetes. En ratas diabéticas se presenta la muerte celular de diversos tipos de neuronas, como las productoras de vasopresinas⁽²¹⁾ y de ganglios espinales⁽²²⁾, las corticales⁽²³⁾ y las del hipotálamo⁽²⁴⁾, así

como apoptosis en células mesangiales⁽²⁵⁾ lo que contribuye al daño microvascular de la neuropatía periférica. Se sabe que en pacientes diabéticos puede haber apoptosis asociada a neuropatía, aunque no se observa con claridad del modelo de rata diabética⁽²⁶⁾.

Las ratas diabéticas sufren daño renal asociado con apoptosis⁽²⁷⁾. En ratas diabéticas se encuentran células apoptóticas en la aorta⁽²⁸⁾. Por ello, se considera que la apoptosis participa en la aterogénesis⁽²⁹⁾ y en la cardiomiopatía dilatada⁽³⁰⁾. Se ha demostrado que el tratamiento de diversas líneas celulares con concentraciones elevadas de glucosa se asocia a un incremento en la apoptosis de las mismas. Así, se ha demostrado en células de páncreas de rata⁽³¹⁾, cultivos primarios de microglía (son células que tienen capacidad fagocitaria, se originan en la médula ósea representan el sistema mononuclear fagocítico en el sistema nervioso central) de rata⁽³²⁾, líneas celulares epiteliales de cristalino⁽³³⁾, células de túbulo proximal de riñón humano⁽³⁴⁾, células mesangiales murinas y humanas⁽³⁵⁾, células endoteliales⁽³⁶⁾, músculo liso de aorta humana⁽³⁷⁾, miocitos de corazón y células de miocardio de ratones diabéticos⁽³⁸⁾, entre otras.

2.7 Proteína Quimioatrayente de Monocitos (*Monocyte Chemoattractant Protein-1, MCP-1*)

Las quimiocinas son pequeñas proteínas secretadas por leucocitos y por células del endotelio vascular, así como en órganos linfoides.(8-11 kDa), tienen función en el reclutamiento de células, activación y diferenciación⁽³⁹⁾, juegan un papel importante en procesos fisiológicos como la hematopoyesis, angiogénesis; y patológicos como inflamación, aterosclerosis, infecciones, alergias y enfermedades autoinmunes^(40;41). Regulan el transporte de leucocitos mediante la adhesión de estos a la pared arterial, la iniciación de la migración transendotelial y la invasión a tejido, a través de un gradiente de concentración⁽⁴²⁾. Estas proteínas reclutan monocitos, macrófagos, Linfocitos T, eosinófilos y células asesinas naturales (*Natural Killer, NK*)⁽⁴³⁾. Las quimiocinas se unen a sus receptores, los cuales pertenecen a la super familia de receptores acoplados a proteínas G (*G-protein-coupled-receptor, GPCR*), y de esta manera median sus efectos biológicos⁽⁴⁴⁾.

La proteína quimioatrayente de monocitos (MCP-1 por sus siglas en inglés) o también conocida como el ligando-2 de la quimiocina con motivo CC (CCL2, por sus siglas en inglés); es una citocina pequeña, pertenece a la familia de quimiocinas con motivo CC (residuos de cisteína). Recluta monocitos, linfocitos T de memoria y células dendríticas a sitios de infección y tejidos dañados⁽⁴⁵⁾, y es la clave en el desarrollo de respuestas de tipo Th2 ⁽⁴⁶⁾. Es producida predominantemente por macrófagos y células endoteliales; en respuesta a diferentes señales: TNF- , IFN- γ , LPS, y lipoproteínas como LDL ⁽⁴⁷⁾. La síntesis y liberación de esta citocina juega un papel esencial en proceso de inflamación aguda y crónica. El receptor para MCP-1 es CCR2, se expresa predominantemente en monocitos y linfocitos T activados, incluyendo Linfocitos T de memoria.

Recientemente se ha observado que el tejido adiposo expresa adipocinas (citocina u hormona secretada por el tejido adiposo) como MCP-1 y TNF- , los cuales modulan una respuesta inflamatoria en el tejido, el metabolismo y la habilidad de almacenar triglicéridos (TGC) en el adipocito⁽⁴⁸⁾. El desarrollo del estado inflamatorio en este tejido está asociado a la resistencia a la insulina en músculo esquelético. La acción de estas citocinas afecta dramáticamente al adipocito incrementando los niveles de ácidos grasos libres (AGL), los cuales causan resistencia a la insulina en animales y humanos^(49;50).

Estudios realizados en ratones obesos informan que existe una gran producción de MCP-1 en tejido adiposo, incrementando las concentraciones sistémicas de esta proteína. En experimentos *in vitro* se observó que la liberación de MCP-1 puede ser estimulada con mediadores insulino-resistentes como: TNF- , IL-1 , IL-6, mientras que agentes anti-inflamatorios como IL-10 y antidiabéticos como metformina y tiazolidina reprimen la liberación de esta quimiocina. Los niveles elevados de MCP-1, en estudios *in vitro*, muestran que disminuye la ingesta de glucosa estimulada la expresión de diversos genes adipogénicos (LpL, adiposia, Glut-4, P2, receptor β -3-adrenergico), y, estos resultados sugieren que estos niveles elevados de MCP-1, contribuyen a un mal funcionamiento del adipocito y la patología asociada con hiperinsulinemia y obesidad, incluyendo la DM2 ⁽⁵¹⁾. Se

ha documentado que MCP-1 se encuentra expresada en varias enfermedades como aterosclerosis, esclerosis múltiple, asma y artritis reumatoide.

La diabetes mellitus se caracteriza por la activación continua y crónica de diversas células del sistema inmunológico innato, principalmente monocitos, macrófagos y neutrófilos, que conduce a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de citocinas proinflamatorias. De hecho, estas citocinas pueden estar elevadas incluso antes de la manifestación clínica de la diabetes. Además se presenta una acumulación acelerada de productos de glicación avanzada (Advanced Glycation End Product, AGE) que está muy relacionada con la hiperglucemia sostenida por la resistencia periférica a la insulina, y se incrementa cuando se ingieren grasas y proteínas que llevan a lipoperoxidación⁽³¹⁾.

Los productos finales del proceso avanzado de glicación han sido implicados en la patogénesis de la glomeruloesclerosis en diabetes. Azúcares reductores como glucosa reaccionan de manera no enzimática con los grupos amino de las proteínas formando bases de Schiff. La formación y acumulación de estos productos se ha relacionado en procesos normales de envejecimiento. Sin embargo en pacientes diabéticos se ha observado una producción acelerada. Recientemente se les ha vinculado en la patogénesis de complicaciones microvasculares y macrovasculares de pacientes con DM⁽⁵²⁾. La glicación de proteínas lleva a la liberación de citocinas, especies reactivas de oxígeno (*Reactive Oxygen Species, ROS*) y AGEs, que inducen un proceso inflamatorio crónico, activación del endotelio vascular con incremento de la expresión de moléculas de adhesión como VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) (CD106) o ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*) (CD54). MCP-1 por un lado y un incremento en la expresión de CD11b/18 en los monocitos, lo que aumenta su adherencia al endotelio normal o dañado y por otro lado, la glicación de las diferentes isoformas de la colágena altera su capacidad de modular la migración de los fagocitos, con la consecuente aterosclerosis. Por otro lado, el daño celular y vascular no solo se debe a la producción excesiva de ROS, sino a una afección cuantitativa y cualitativa de los sistemas de eliminación de ROS. El glutatión, por ejemplo, se consume por el estrés

oxidativo, por la producción excesiva de H_2O_2 pero también tiene una función defectuosa ya que, como todas las proteínas de la economía, sufre un proceso de glicación.

El estrés metabólico en diabetes, resultado de un metabolismo energético deficiente, el cual produce mediadores inflamatorios, puede incrementar el riesgo de un daño oxidativo. Se analizó la producción de MIP-2 y MCP-1 implicados en la patogénesis de la diabetes, y si sus efectos resultan afectados por la hipoxia, en ratas diabéticas y no diabéticas mantenidas bajo condiciones de normoxia o de hipoxia. En las ratas diabéticas se encontró un marcado incremento de MCP-1 comparado con las no diabéticas, en el caso de MIP-2 no se encontraron diferencias. Por lo tanto la hipoxia produce selectivamente estas quimiocinas, importantes en el proceso de diabetes^(52;53).

En un estudio realizado en cultivos de células mesangiales, se investigó la expresión de VEGF y MCP-1. Estas células se trataron con diferentes tipos de AGE, se encontró que el número de células viables y de DNA decreció significativamente, se incrementaron significativamente p53 y Bax, y la inducción de apoptosis. Además estos productos regulan los niveles de mRNAs para VEGF y la secreción de MCP-1⁽⁵²⁾.

MCP-1/CCL2 se ha implicado en el papel principal de reclutar monocitos/macrófagos en modelos animales de nefropatía. Diversos factores inducen la expresión renal de esta quimiocina. Pacientes con diabetes muestran niveles elevados de proteínas de fase aguda y elevado conteo de neutrófilos, lo que hace suponer un proceso inflamatorio. Se ha relacionado los niveles urinarios de esta quimiocina y la severidad de la enfermedad en pacientes con DM2⁽⁵⁴⁾. Y se ha correlacionado con el daño tubular, indicio que la expresión de esta proteína contribuye al daño renal.

Dada la participación de citocinas proinflamatorias en casos como el síndrome de respuesta inflamatoria sistémica, así como sepsis y otras enfermedades infecciosas, nuestro objetivo fue describir la participación de MCP-1 en pacientes diabéticos, en una condición de infección, como infección de tejidos blandos.

2.8 Apoptosis

La apoptosis, también conocida como muerte celular programada, es la forma de muerte celular que se caracteriza por condensación de la cromatina, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos que son eliminados por fagocitos adyacentes, por lo que no provoca respuesta inflamatoria⁽⁵⁵⁾. Es un mecanismo que permite la eliminación ordenada de células y, por tanto, participa en la morfogénesis, ontogenia y fisiología de las células, así como en la homeostasis de los aparatos y sistemas del organismo.

Aunque el proceso de apoptosis se desarrolla en varias horas, la remoción de los fragmentos apoptóticos es tan rápida que raramente se identifican células apoptóticas en condiciones normales.

La apoptosis es un proceso complejo en el que participan en cascada un grupo de cistein-proteasas, con especificidad sobre residuos de aspartato, conocidas como Caspasas. Todas las caspasas se sintetizan como zimógenos y experimentan un procesamiento proteolítico durante su activación, contienen un prodominio seguido de una subunidad pequeña (p10) y otra larga (p20)⁽⁵⁶⁾. Estas enzimas se pueden dividir en tres categorías; las Caspasas inflamatorias (4, 5, 11, 12,13 y 14), las Caspasas iniciadoras (8, 9, 10) y el tercer grupo las Caspasas efectoras (3, 6,7), cuyas preformas inactivas se encuentran como dímeros principalmente en el citosol y para ser activas requieren cortarse por las iniciadoras o por la granzima B, serin-proteasa presente solo en linfocitos T citotóxicos.

A diferencia de las Caspasas efectoras, las Caspasas iniciadoras se encuentran como monómeros no requieren de rompimiento proteolítico para activarse, sino de dimerización mediada por la interacción con proteínas adaptadoras y con los dominios intracitoplásmicos específicos de proteínas transmembranales que funcionan como receptores. Estos dominios se caracterizan por la presencia de una secuencia de aminoácidos (80-100), denominados Dominios de Muerte (Death Domain, DD), a su vez se

divide en la subfamilia Death Effector Domain (DED) y Caspase Recruitment Domain (CARD), la cual media la interacción con proteínas adaptadoras⁽⁵⁶⁾.

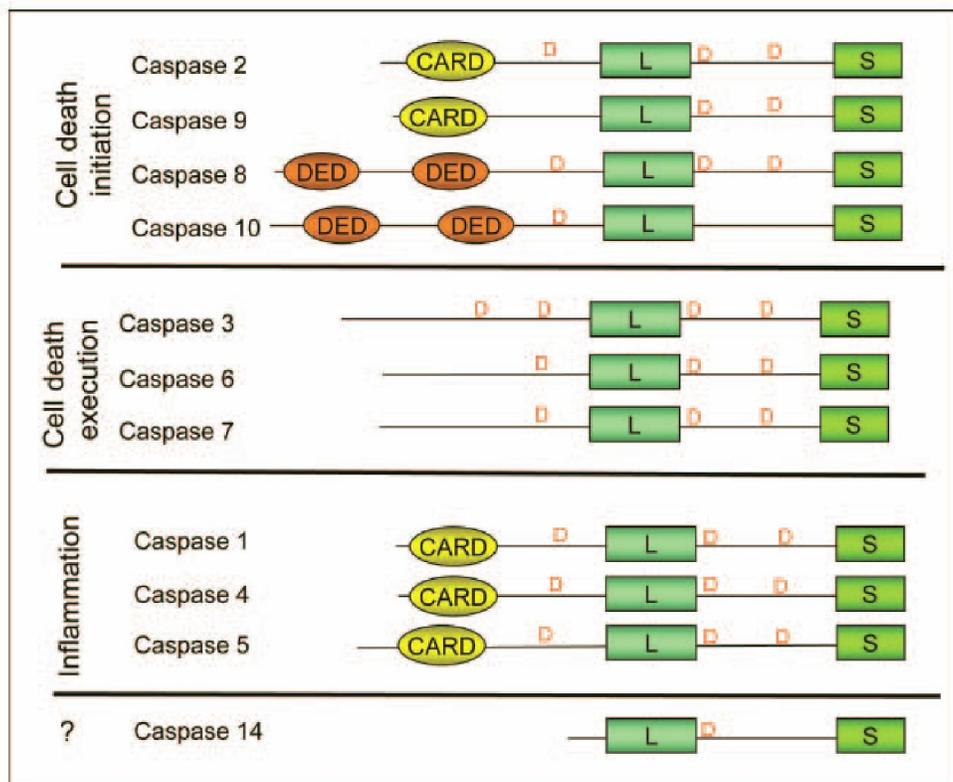


Figura 1. Clasificación de Caspasas. Se clasifican en tres grupos de acuerdo a su función. 1) Caspasas inflamatorias, los otros grupos están involucrados con el mecanismo de apoptosis (2) Caspasas iniciadoras en apoptosis y 3) Caspasas efectoras.

La activación de la cascada de Caspasas da como resultado el procesamiento de un número importante de proteínas celulares conocidas como sustratos celulares de muerte (*cell-death substrate, CDS*), estas proteínas incluyen actina, la cual mantiene la integridad de la célula, al degradarse resulta en la condensación de la cromatina y fragmentación nuclear. El procesamiento del inhibidor de DNasa activada por caspasa (*inhibitor of the caspase-activated DNase, ICAD*) produce la liberación de endonucleasas, que se traslocan al núcleo para fragmentar el DNA. La ruptura de proteínas del citoesqueleto, como actina, plectina, ROCK1 y gelsolina, conlleva a la fragmentación celular y la formación de cuerpos apoptóticos⁽⁵⁷⁾.

Esta dicotomía, de hecho define dos vías por las cuales una célula puede sufrir apoptosis. La vía extrínseca y la vía intrínseca.

2.8.1 Vía Extrínseca

La *vía extrínseca* depende de receptores celulares de la familia de Factor de Necrosis Tumoral (*Tumor Necrosis Factor Receptor, TNF*), entre los que se incluyen el TNFR1 (CD120a), DR3/TNF (*death receptor 3/TNF*) y Fas (CD95). Estos receptores forman trímeros y contienen dominios intracitoplásmicos, llamados dominios de muerte (death domains, DD). Cuando estos ligandos se unen a sus receptores en el exterior de la célula, los DD se unen a proteínas adaptadoras como el dominio de muerte asociado a Fas (*Fas associated Death Domain, FADD*), con excepción del TNFR1 (*CD120a*) que primero se une al dominio de muerte asociado a TRAIL (*TRAIL associated Death Domain, TRADD*). FADD tiene un dominio efector (*death effector domain, DED*) que a su vez se une a las Caspasas iniciadoras 10 y 8, formando el “complejo inductor de la señalización de muerte” que es capaz de dimerizar a las Caspasas efectoras⁽⁵⁸⁾.

2.8.2 Vía Intrínseca

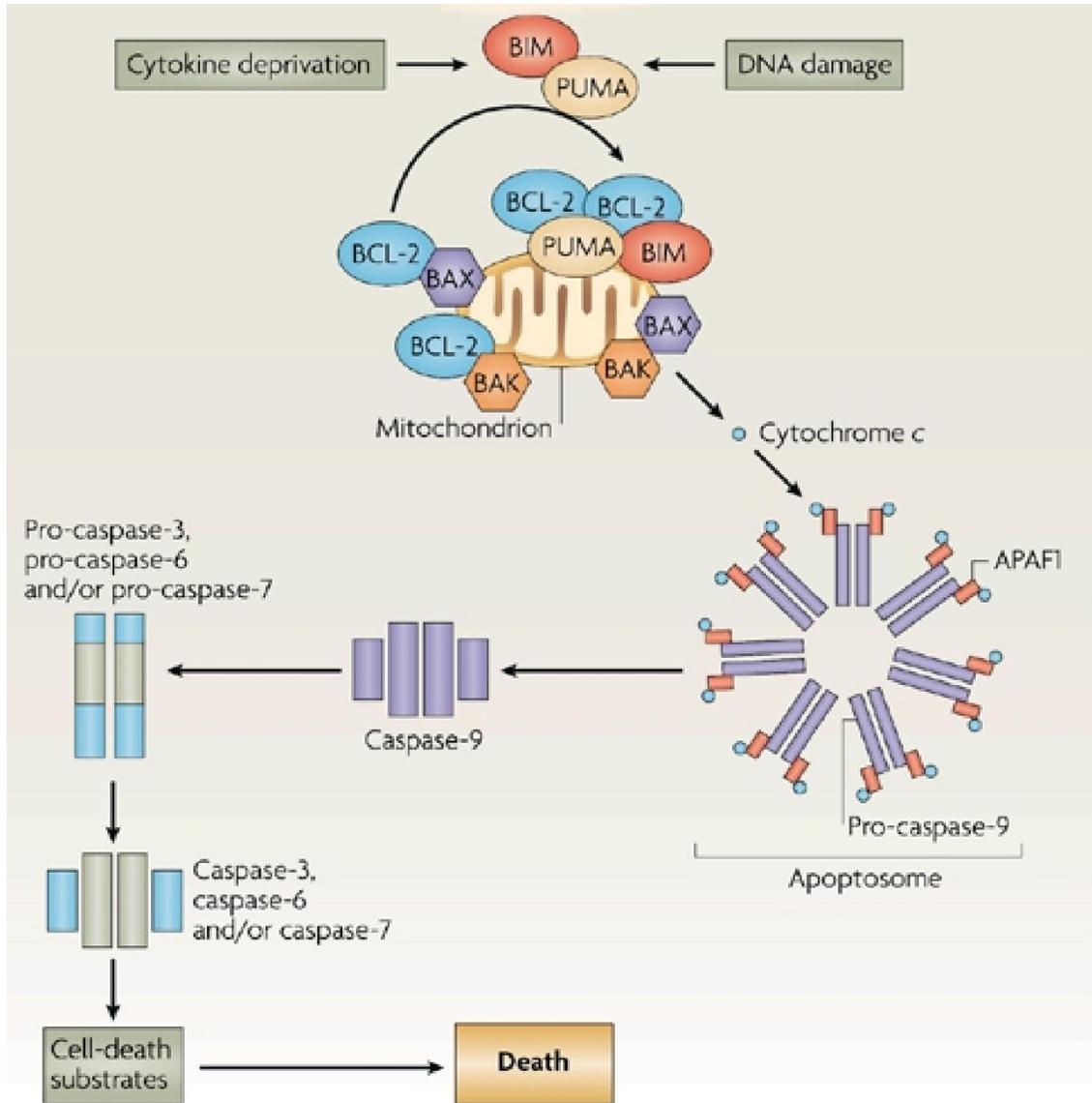
La vía intrínseca implica permeabilización de la membrana mitocondrial por alteraciones celulares como la hipoxia o disminución en el transporte de glucosa. En esta vía se libera el Citocromo C de la mitocondria y se une a Apaf-1 en presencia de ATP. La interacción entre estas proteínas ocasiona un cambio conformacional de Apaf-1, y deja expuesto un sitio CARD, ocurre una oligomerización de Apaf-1 por la interacción CARD-CARD, resultando en una estructura “tipo rueda”, conocida como apoptosoma. La Caspasa 9 tiene un dominio CARD el cual media la interacción específica con Apaf-1, y al procesarse la pro-Caspasa 9, esta activa a la Caspasa 3⁽⁵⁹⁾.

En condiciones normales APAF-1 se encuentra separado del citocromo C por la membrana mitocondrial. Sin embargo, cuando por alguna razón esta membrana se permeabiliza se libera al citosol y se inicia la cascada de evento que lleva a la apoptosis. El

proceso de permeabilización de la membrana mitocondrial (MOMP) se encuentra regulado por proteínas pertenecientes a la familia de Bcl-2 (B cell leukemia/lymphoma). Estas proteínas pueden dividirse en dos grupos, antiapoptóticas y proapoptóticas. Las proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-x, Bcl-xL, A1, Bcl-w y Mcl-1) previenen la permeabilización de la membrana mitocondrial y la liberación de citocromo C, en tanto que las proteínas proapoptóticas, que se clasifican de acuerdo a el número de dominios BH que contienen (Bcl-2 homology domains), pueden mediar la permeabilización de la membrana mitocondrial por si solas (Bax, Bak y Bok), o pueden activarse por otro subgrupo de proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2, denominadas solo dominio BH3 (Bim, Bid, Bad, Bmf, BNIP-3, Puma y Noxa)⁽⁵⁵⁾.

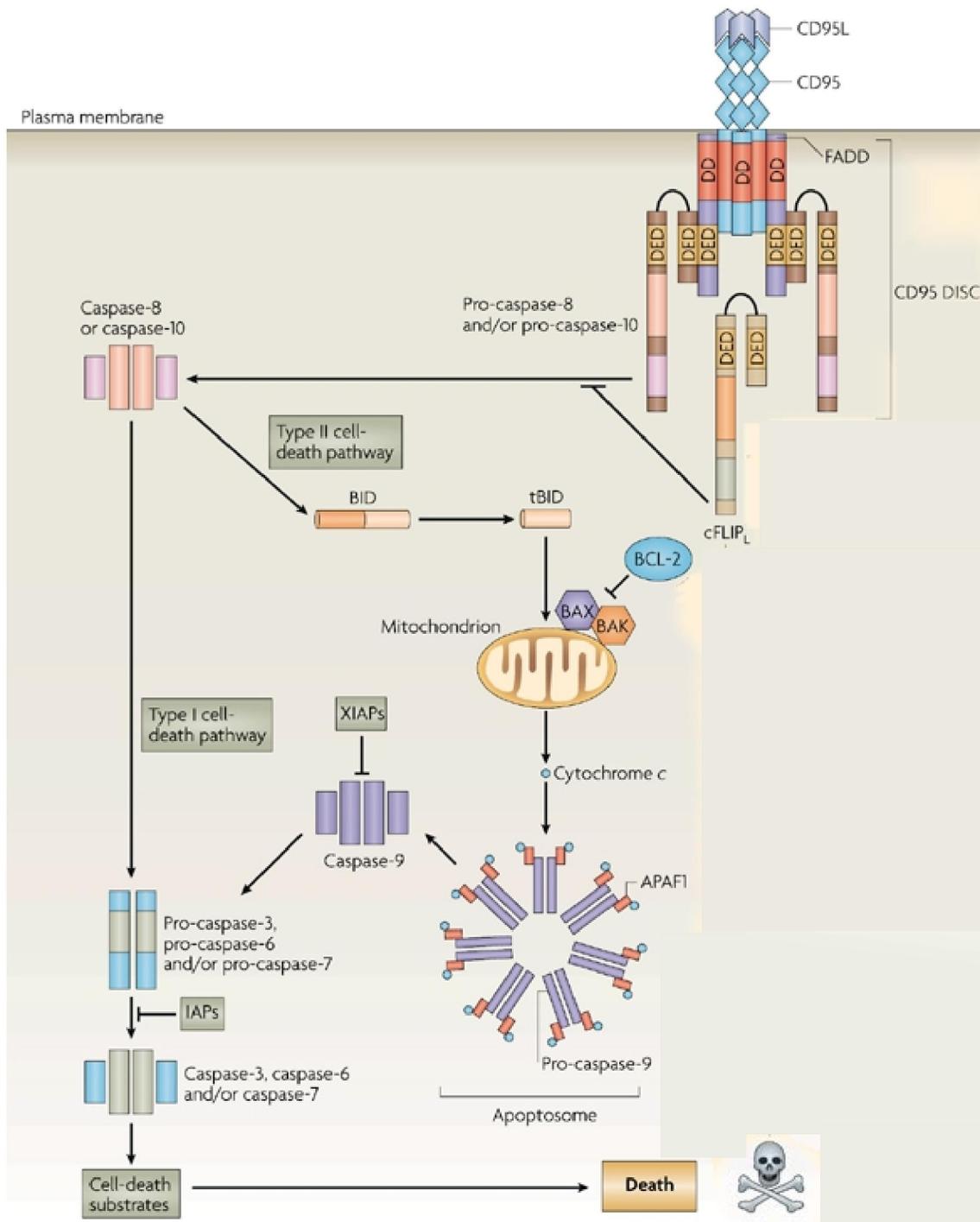
Existen otras proteínas que pueden promover la muerte o la sobrevivencia celular que se liberan cuando se permeabiliza la membrana mitocondrial. Entre ellas, se encuentran el factor inductor de apoptosis (*apoptosis-inducing factor, AIF*), que pueden promover muerte celular de manera independiente a la activación de Caspasas y otras proteínas, como Smac/DIABLO, que promueve apoptosis porque interfieren con la actividad de las proteínas inhibidores de apoptosis (*Inhibitor of Apoptosis Protein, IAP's*)^(55;59), las cuales se unen a las pro-Caspasas impidiendo su activación.

Durante el proceso de apoptosis se presentan cambios fisiológicos y morfológicos celulares desde etapas tempranas, los cuales se pueden detectar por diversas técnicas de laboratorio. Entre los primeros cambios de una célula en apoptosis se encuentra la exposición de la fosfatidil-serina en la superficie la cual puede determinarse por su capacidad de unir Anexina V y el aumento de la permeabilidad celular que puede medirse por la captación de yoduro de propidio mediante citometría de flujo. La actividad de caspasas se puede determinar directamente o mediante la detección de los productos de proteólisis mediante anticuerpos específicos contra los fragmentos. El rompimiento del DNA celular puede determinarse mediante electroforesis o bien mediante TUNEL.



Nature Reviews | Immunology

Figura 2. Vía Intrínseca. *BAX* y *BAK* están secuestradas y mantenidas en estado inactivo en la membrana externa de la mitocondria mediante la unión a proteínas antiapoptóticas, las cuales pertenecen a las proteínas de la familia BCL-2. Bajo estímulos las proteínas del dominio solo de BH3, como *BIM* o *PUMA* se activan, desplazan a los miembros de la familia de BCL-2, de proteínas como *BAX* y *BAK* y conllevan a la liberación de citocromo C de la mitocondria. Después el citocromo C se une a APAF-1 y a la pro-Caspasa-9, formándose el apoptosoma y activando a Caspasas efectoras y después a los sustratos de muerte que degradan al DNA.



Copyright © 2006 Nature Publishing Group
 Nature Reviews | Immunology

Figura 4. Apoptosis. *Via Extrinseca.* Estimulación con el ligandos de CD95 (CD95L) conlleva a la formación del complejo de señalización inductor de muerte CD95 (*CD95 DISC*), en donde se lleva a cabo la activación o procesamiento de Caspasa-8 y Caspasa-10. Elevados niveles de CD95 DISC y altas concentraciones de Caspasa-8 activa y Caspasa-10, directamente inducen la activación de Caspasas efectoras (Caspasa-3, Caspasa-6 y Caspasa-7). *Via Intrinseca.* Liberación de citocromo C de la mitocondria, resulta en la formación del apoptosoma, seguida de la activación de la pro-Caspasa-9, y activación de esta activa a Caspasas efectoras.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La diabetes es una enfermedad de muy alta prevalencia en nuestro país y es sin duda alguna el mayor reto que enfrenta el sistema nacional de salud. Además de ser la primera causa de muerte, es la principal causa de demanda de atención médica en consulta externa en hospitales, una de las principales causas de hospitalización y la enfermedad que consume el mayor porcentaje del gasto en instituciones públicas.

Las infecciones de tejidos blandos son complicaciones graves de la diabetes, que se presentan más frecuentemente en pacientes que no han llevado un control adecuado y cursan con descontrol metabólico. El proceso inflamatorio infeccioso y los productos tóxicos del metabolismo alterado tienen la capacidad de producir muerte celular programada. En trabajos previos de nuestro laboratorio se encontró un incremento significativo en la apoptosis inducida en CMN de los pacientes con DM2 e infección. Lo que puede ser uno de los mecanismos por los cuales el paciente se encuentra inmunodeprimido. Se demostró la participación de Fas y Fas-L en apoptosis de células de sangre periférica y su correlación con la concentración elevada de glucosa sanguínea, sin embargo no se determinó por qué vía se induce preferentemente muerte celular.

En procesos inflamatorios e infecciosos, las quimiocinas son elementos cruciales en las interacciones celulares, además de encargarse de reclutar células inflamatorias. Se ha relacionado los niveles urinarios de la quimiocina MCP-1 con la severidad de la enfermedad en pacientes con DM2, y se ha correlacionado con el daño tubular, con esto se interpreta que la expresión de esta proteína contribuye al daño renal.

Por ello, lo importante de este proyecto es identificar la vía de apoptosis y la expresión de MCP1, en las células de sangre periférica y si existe correlación con la concentración elevada de glucosa sanguínea en pacientes con DM2 que padecen infecciones en tejidos blandos. Si se conocen los mecanismos de inducción de apoptosis y de la supervivencia celular, se comprenderá mejor la fisiopatología del daño celular en las complicaciones de la diabetes y encontrar medidas terapéuticas más efectivas.

4. OBJETIVOS

4.1. General

Determinar la vía de apoptosis y la expresión de la quimiocina MCP1 en células mononucleares (CMN) de sangre periférica de pacientes con DM2 e infección en tejidos blandos y su correlación con los niveles de glucosa.

4.2. Específicos

- Determinar la presencia de apoptosis en CMN de sangre periférica (mediante las determinaciones de TUNEL y C-3 activa)
- Determinar la vía de apoptosis en CMN de sangre periférica (apoptosis inducida y espontánea) de pacientes DM2/ITB (mediante la determinación de las expresiones de Caspasa 8 y Caspasa 9 en su forma activa).
- Determinar la expresión de MCP1 en células de sangre periférica de pacientes con DM2/ITB

5. HIPOTESIS

En las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con Diabetes Mellitus tipo 2 e Infección en Tejidos Blandos, es posible demostrar que hay aumento en la apoptosis y la expresión de la quimiocina MCP-1, además la muerte celular se induce preferentemente por la vía apoptótica extrínseca, y que la expresión de esta quimiocina correlaciona de manera inversamente proporcional a la concentración de glucosa en sangre.

6. DISEÑO DE INVESTIGACIÓN

6.1. POBLACIÓN

Se realizó un estudio clínico transversal comparativo en una muestra de 20 pacientes con diagnóstico de DM2/ITB mayores de 30 años que fueron hospitalizados en el Hospital de Infectología "Dr. Daniel Méndez Hernández" del CMN "La Raza" del IMSS, 15 pacientes con DM2 controlada que asistían para su control a la consulta en la clínica multidisciplinaria "Los Reyes" de la FES-Zaragoza UNAM, así como 15 controles sanos no diabéticos que fueron proporcionados por el servicio de laboratorio clínico del Banco de Sangre del CMN "La Raza". Una vez seleccionados los pacientes que reunieron los criterios de inclusión, previa aceptación o firma de carta de consentimiento, se les practicó una evaluación clínica integral con atención especial a obtener los datos de control metabólico, así como la existencia de complicaciones agregadas y todos estos datos se registrarán en el expediente. Se les tomó muestras para estudios de gabinete y una muestra para realizar el estudio. Se realizó la purificación de células dentro de las dos primeras horas, y se almacenaron las laminillas para su posterior análisis mediante inmunocitoquímicas para determinar el porcentaje de apoptosis (TUNEL), la expresión de Caspasa 3, Caspasa-8 y Caspasa-9 activas, y la quimiocina MCP1.

6.2. CRITERIOS

6.2.1. Criterios de inclusión

Pacientes que aceptaron participar en el estudio, previo consentimiento informado por escrito. Se incluyeron pacientes con DM2 mayores de 30 años de edad, de ambos géneros, en tratamiento con hipoglucemiantes orales o insulina y con ITB.

6.2.2. Criterios de exclusión

Pacientes con DM1, acidosis láctica, coma hipoglucémico, cetoacidosis, cetoalcalosis diabética, pancreatitis aguda, cetoacidosis alcohólica, cetoalcalosis diabética, enfermedad terminal, cáncer, sospecha de infección por virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

6.2.3. Criterios de eliminación

Pacientes con información incompleta, con evidencia de insuficiencia renal aguda, sospecha de

acidosis láctica, complicaciones como la hipoglucemia, hipopotasemia grave, broncoaspiración, edemas cerebral, alcalosis de rebote o shock séptico

6.3. VARIABLES

6.3.1. Independientes

DM2

DM2/ITB

6.3.2. Dependientes

Apoptosis en pacientes DM2 controlada, DM/ITB y sanos

Expresión de Caspasa 8

Expresión de Caspasa 9

Expresión de MCP1

7. MATERIALES Y METODOS

7.1. Purificación de células de sangre periférica.

La purificación de las CMN de sangre periférica se realizó mediante la técnica de separación por gradiente, por centrifugación; empleando el reactivo “Lymphoprep” (Fresenius Kabi Norge AS, Axis-Shield PoC AS, Oslo, Norway Lys), de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Se mezcló 1:1 de sangre problema con solución salina (S.S) al 0.9 % NaCl, mientras que se midió el volumen del reactivo lymphoprep estéril de acuerdo al volumen total de mezcla sangre/S.S; guardando la relación 3 mL lymphoprep-10 mL mezcla y se colocó en un tubo Falcon de 15 mL, la cantidad adecuada de lymphoprep y se adicionó lentamente por las paredes del tubo la mezcla sangre/S.S; posteriormente se centrifugó a 1500 rpm por 30 minutos. Después se separó la capa de células y se colocó en otro tubo Falcon se adicionó una cantidad igual de solución salina a la capa extraída y se centrifugó nuevamente por 20 minutos a 1500 rpm, finalmente se decantó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 1 mL de SSF.

7.2. Preparación de laminillas.

Después de la purificación una parte de las células fue sometida a choque térmico a 38°C por 2 horas, posteriormente las CMN fueron teñidas y contadas con azul de tripano bajo microscopia de luz (20X), se realizó el cálculo para obtener 5×10^4 células/ μL . Este valor se multiplicó por el número de laminillas a elaborar y el valor obtenido se completó con SS de tal forma que a cada celda de la cito centrífuga se le adicionaron 200 μL de muestra para cada laminilla.

Después de dejar secar las laminillas se rotularon y se fijaron con formaldehído al 4% por 20 minutos. Después de haber transcurrido este tiempo se dejaron secar a temperatura ambiente y finalmente se almacenaron para su posterior inmunotinción.

7.3. Citoinmunohistoquímica.

Con la finalidad de disminuir las variaciones entre experimentos, la reacción para cada marcador se realizó en un solo tiempo en todos los grupos. A partir de las laminillas obtenidas por citocentrifugación se procedió a la inmunotinción. Se realizó la recuperación de antígeno con citrato de sodio (pH 6, 0.01M), por 20 min a 90 °C en baño María, posteriormente se realizaron 2 lavados para eliminar el exceso de citrato. Se eliminó la actividad de la peroxidasa endógena con metanol y peróxido de hidrógeno al 3% por 15 minutos. Se bloqueó la unión no específica de los anticuerpos al tejido, sumergiéndolos durante 60 minutos en suero normal de cerdo al 2%.

Posteriormente, se incubaron toda la noche a temperatura ambiente en cámaras húmedas con los anticuerpos correspondientes.

Anticuerpos.

- Anti-Caspasa 3 activa (Santa Cruz, Biotechnology Santa Cruz, CA. USA).
- Anti-Caspasa 8 activa(Santa Cruz, Biotechnology Santa Cruz, CA. USA)
- Anti-Caspasa 9 activa(Santa Cruz, Biotechnology Santa Cruz, CA. USA)
- Anti-MCP1 (Santa Cruz, Biotechnology Santa Cruz, CA. USA).

Reactivo TUNEL

- *In Situ* Cell Death Detection Kit, Polidioxanona, POD (Roche, Diagnostics, Mannheim, Germany).

Reactivo de Revelado Inmunohistoquímica

- Streptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (*Horseradish peroxidase, HRP*) (DAKO LSAB + kit, DAKO corporation).

Después de lavar con solución amortiguadora de fosfatos 1X (*Phosphate Buffered Saline, PBS*), las laminillas se incubaron con el segundo anticuerpo conjugado a biotina por 30 min a temperatura ambiente. Después de lavar se adicionó estreptavidina conjugada a HRP, por último el color se generó mediante la adición del substrato cromógeno denominado Diamino Bencidina (*Diamino Benzidine, DAB*) durante el tiempo requerido de cada marcador con respecto al control de isotipo; se detuvo la reacción con agua y se

contratiñó con hematoxilina. Las muestras se deshidrataron bajo el siguiente esquema: agua destilada, etanol 70%, etanol 90%, etanol 100% y xileno en baños de 5 minutos cada uno. Finalmente, las preparaciones se cubrieron con resina y se dejaron secar a temperatura ambiente.

7.4. Determinación Apoptosis mediante la técnica de TUNEL.

A partir de las laminillas obtenidas mediante citocentrifugación, se procedió a realizar la evaluación de la fragmentación de DNA mediante la técnica de TUNEL (Terminal-Deoxinucleotidyl-transferase mediated dUTP-digoxigenin nick end labelling). Brevemente, se incrementó la permeabilidad de la membrana celular mediante la adición de citrato de sodio (pH 6, 0.01M) el cual se adicionó por 20 minutos a 95° C en baño María. Se eliminó la actividad de la peroxidasa endógena con metanol y peróxido de hidrógeno al 3% por 15 minutos. Se bloqueó la unión no específica de los anticuerpos al tejido, sumergiéndolos durante 60 minutos en suero normal de cerdo al 2%. Posteriormente se procedió a adicionar la enzima transferasa terminal (*terminal transferase, TdT*), se hizo una mezcla de 50 µL de enzima con 450 µL de buffer, conteniendo oligonucleótidos conjugados con fluoresceína, la cual se incubó con las muestras por 60 minutos en a 37°C, en oscuridad. Se lavó 5 veces, 5 minutos con PBS 1X. Posteriormente se realizó la incorporación del anticuerpo anti-fluoresceína, para lo cual se adicionaron 20 µL de polidioxanona (PDO) y se incubó a 37 °C/30 minutos, se lavó 5 minutos con PBS 1X en 3 ocasiones. El desarrollo de color se realizó con la adición de DAB, monitoreando bajo el microscopio de luz. Cuando se observó la coloración café en las células se detuvo el registro del tiempo y se eliminó el exceso de DAB e inmediatamente se lavó con agua corriente para detener la reacción, se contratiñó con hematoxilina, se deshidrató y montó con resina sintética, se dejó secar mínimo 24 horas para hacer el análisis en el microscopio.

7.5. Cuantificación de células positivas inmunoteñidas.

Las laminillas se analizaron en un microscopio (Olimpus, BX-40) y las células positivas (color café) se cuantificaron en 4 campos para cada laminilla, utilizando un analizador de imágenes (Imagen-Pro Plus®, Media Cybernetics, Silver Spring, MD. USA).

7.6. Análisis Estadístico.

Se elaboró una base de datos y la información se procesó utilizando un programa de análisis estadístico (Prisma 4© de GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Los datos se presentaron mediante medias aritméticas de cada grupo y desviación estándar. La evaluación de la diferencia en el número de células positivas y la densidad de expresión de las reacciones inmunohistoquímicas se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Utilizado análisis de comparación múltiple de Tukey para identificar las diferencias entre grupos. $p \leq 0.05$ se consideró como significativa. Para los análisis de correlación se realizó una prueba de Spearman y regresión lineal.

8. RESULTADOS

8.9. Descripción clínica

Se estudiaron 20 pacientes con diagnóstico de DM2 e infección de tejidos blandos (DM2/ITB) (**Tabla 1**), 14 pacientes con DM2 control (Control, **Tabla 2**) y 20 personas sanas. Entre DM2/ITB se encontraron 14 hombres y 6 mujeres, en tanto que en los DM2 se encontraron 12 mujeres y dos hombres. La edad promedio de los DM2 fue de 59.9 años (39 a 80), en tanto que en aquellos con DM/ITB fue de 57.3 (41 a 74). El tiempo de evolución promedio del grupo DM2 fue de 8.8 años (1 a 25), en tanto que en los pacientes con DM2/ITB fue de 7.3 (1 a 20). La glicemia promedio para el grupo de DM2 fue de 141.9, mg/dL (99 a 200), en tanto que para el grupo de DM2/ITB fue de 254 mg/dL (103 a 634) (**Tabla 1**). De los cuales 7 presentaron fascitis, 9 enfermedad de Fournier, 3 abscesos y 1 pie diabético. El 55% de los pacientes con DM2/ITB presentó una clasificación del control metabólico grave, 20% moderado, 15% leve y 15% controlado. Mientras que la población de DM2/ITB, el 57% presentó control metabólico, 7% descontrol leve y 35% moderado, todos estos valores fueron al momento de la toma de la muestra.

8.10. Determinación de apoptosis por TUNEL.

En la **Figura 5** se presenta las fotografías de un paciente representativo de cada grupo, donde se muestra la apoptosis cuantificada por TUNEL. En general, se encontró mayor número de células TUNEL positivas en los pacientes con DM2/ITB, la apoptosis inducida (**F**) se encontró significativamente aumentada en comparación con la apoptosis espontánea en los mismos pacientes (**E**). En los casos de DM2 se encontró una leve tinción para TUNEL (**D**), en células sometidas a choque térmico, en comparación con las células de los mismos pacientes que no recibieron choque térmico (**C**). Para los casos de las muestras de los controles sanos, la tinción para TUNEL en el caso de las muestras sometidas a apoptosis inducida fue mínimo (**B**), en comparación con las mismas muestras en apoptosis espontánea (**A**). En algunas muestras, sobre todo en el grupo de DM2/ITB, se pueden observar cuerpos apoptóticos teñidos de color café característicos de apoptosis tardía. El

número de células TUNEL positivas se cuantificó mediante análisis densitométrico mediante un analizador de imágenes. Los resultados se muestran en las **Figura 6**. En relación al porcentaje de células positivas para TUNEL, se puede observar que no existe una diferencia significativa entre los grupos de pacientes en el caso de las muestras con apoptosis espontánea (menos del 5% de apoptosis en los diferentes grupos) ($p=0.2832$). Sin embargo, en las muestras sometidas a apoptosis inducida, se observa una clara diferencia la cual es estadísticamente significativa ($p=0.0001$) en el caso de las células provenientes de pacientes con DM2/ITB ($14.77 \pm 4.2 \%$), si se compara con el grupo de DM2 Control ($8.25 \pm 4.1\%$) y Sanos ($4.2 \pm 1.8\%$).

8.11. Apoptosis determinada por la expresión de Caspasa-3 activa.

La **Figura 7** muestra los hallazgos inmunocitoquímicas de la expresión de Caspasa 3 activa. En las muestras que fueron sometidas a choque térmico (**A, C, y E**), no se observa una clara expresión de Caspasa 3 activa en las CMN de pacientes con DM2, o DM2/ITB resultados muy similares a los encontrados en los controles. En el caso de las CMN proveniente de pacientes con DM2/ITB sometidos a apoptosis inducida (**F**), muestran una clara y alta expresión de Caspasa 3 activa, en comparación con las células provenientes de los pacientes con DM2 o los controles (**B y D**). Lo cual es muy consistente con los hallazgos obtenidos por TUNEL. La expresión de esta proteína fue principalmente citoplásmicos, aunque en algunas muestras, nuevamente en el grupo de DM2/ITB, se pudo observar tinción nuclear, lo cual denota translocación nuclear, paso muy importante para la inducción de la degradación del DNA. El análisis densitométrico de la expresión de Caspasa 3 activa (**Figura 8C**), muestra un comportamiento parecido a lo que encontramos con la tinción de TUNEL. Las células provenientes de los diferentes grupos no muestran una diferencia significativa en la expresión de Caspasa 3 activa cuando no son sometidas al choque térmico (**Figura 8A**) ($p=0.2809$). Mientras en al caso de las muestras sometidos a choque térmico, (**Figura 8B**), las células de pacientes con DM/ITB muestran un claro incremento en

la expresión de Caspasa 3 activa en comparación con las células de pacientes con DM2 y controles ($p=0.0129$, ANOVA).

8.12. Análisis de la expresión de Caspasa-8 activa.

La **Figura 9** muestra los resultados del análisis de la expresión de Caspasa-8 activa. De manera interesante se encontró que en general, la expresión de esta proteína se ve aumentada en el caso de las CMN sometidas a choque térmico de los pacientes tanto con DM2, como en los pacientes con DM2/ITB, si se comparan con los controles sanos. (**Figura 9B, D y F**). La densidad de la expresión para la Caspasa-8 activa se muestra en la **Figura 10C**, los resultados obtenidos mostraron que existe un aumento significativo en las muestras sometidas a choque térmico, en el grupo de DM2 y DM2/ITB si se compara con los controles sanos ($p=0.0023$, ANOVA). Cuando se compararon los grupos de células tratadas con choque térmico (inducida), se observa un incremento en el porcentaje de células de los pacientes del grupo DM2/ITB ($**p < 0.001$ vs grupo sanos, ANOVA), también se observa un incremento de los pacientes del grupo control sanos ($**p < 0.001$ vs grupo DM2 Control, ANOVA).

8.13. Análisis de la expresión de Caspasa-9 activa.

El análisis de la expresión de Caspasa-9 activa se muestra en la **Figura 11**. Se observa que existe un aumento en la expresión de esta proteína en las CMN de sangre periférica de los grupos DM2/ITB tratadas con choque térmico (**Figura 11F**). Sin embargo, en las CMN de pacientes con DM2 esta expresión fue mínima, tanto en las tratadas como en las no tratadas con choque térmico (**Figura 11C y D**), y en las células del grupo control sanos (**Figura 11A y B**) la expresión fue menor. La densidad de expresión de Caspasa-9 activa (**Figura 12C**) en las células tratadas con choque térmico de los pacientes con DM2/ITB muestra un incremento ($**p < 0.05$ vs grupo sanos, ANOVA), al ser comparada con las de los pacientes con DM2 o con el grupo control. De igual manera en el caso de las células tratadas con choque térmico de pacientes con DM2 controlada muestran un claro

incremento en la expresión de Caspasa-9 en comparación con los pacientes con el grupo control sanos (** $p < 0.01$ vs grupo DM2 Control, ANOVA)

8.14. Análisis de la expresión de MCP1.

Los resultados en el análisis de la expresión de MCP1 se muestran en la **Figura 13**. Se encontró que, la expresión de esta proteína se ve aumentada en el caso de las CMN de los pacientes, sometidas a choque térmico tanto con DM2, como en los pacientes con DM2/ITB, si se comparan con los controles sanos (**Figura 13B, D y F**).

La densidad de la expresión para MCP1 (**Figura 14C**), aumenta en las muestras sometidas a choque térmico, en el grupo de pacientes DM2/ITB si se compara con los controles sanos ($p = 0.0023$, ANOVA). Cuando se compararon los grupos de células tratadas con choque térmico (inducida), se observa incremento en el porcentaje de células de los pacientes del grupo DM2/ITB (** $p < 0.01$ vs grupo sanos, ANOVA) y del grupo DM2/ITB (** $p < 0.05$ vs grupo DM2 Control, ANOVA).

8.15. Análisis de la correlación entre la apoptosis y la expresión de Caspasa 8, 9 y MCP-1 en los pacientes con DM2/ITB.

Análisis de la posible correlación entre la expresión de Caspasa-8 activa y apoptosis en el grupo de pacientes con DM2/ITB. Los resultados informan que existe asociación entre la apoptosis y la expresión de esta proteína. En la **Figura 15** se muestra que el porcentaje de apoptosis en los pacientes con DM2/ITB muestra una correlación positiva con la expresión de Caspasa-8 en apoptosis inducida ($r = 0.5460$, $p = 0.033$). Al analizar la correlación entre la expresión de Caspasa-9 activa y la apoptosis (**Figura 16**), encontramos que existe una tendencia a una correlación negativa, sin embargo esta correlación no fue estadísticamente significativa ($r = -0.2284$, $p = 0.1974$). Se analizó la posible correlación entre la expresión de MCP1 y la apoptosis espontánea e inducida (**Figura 17**). El porcentaje de apoptosis en los pacientes con DM2/ITB muestra una correlación ligeramente positiva con la expresión de MCP1 en apoptosis inducida ($r = -0.2884$, $p = 0.3939$) y de la misma manera se

observa con la expresión de MCP-1 en CMN que no se sometieron a choque térmico ($r = 0.009$, $p = 0.4839$).

8.16. Análisis de la correlación entre los niveles de glucosa y la apoptosis, expresión de Caspasa-8, 9 y MCP-1 en los pacientes con DM2/ITB.

Se evaluó la posible correlación entre la concentración de glucosa en sangre de los pacientes con DM2/ITB, con el porcentaje de apoptosis, expresión de Caspasa 8 activa, Caspasa 9 activa y Mpc-1. Analizamos si existía una correlación entre el nivel de apoptosis con la glucosa en sangre (**Figura 18**) por lo que se realizó un análisis de Spearman, encontrando que el porcentaje de apoptosis inducida en los pacientes con DM2/ITB muestra una correlación positiva con los niveles de glucosa en sangre ($r = 0.0010$, $p = 0.9967$). Al analizar el nivel de expresión de Caspasa-8 con el nivel de glucosa en sangre (**Figura 19**), encontramos que no existe correlación ($r = 0.1077$, $p = 0.3404$). Para la Caspasa-9, los resultados obtenidos infieren que tampoco existe una correlación (**Dato no Mostrado**) entre la expresión de Caspasa-9 y la concentración sanguínea de glucosa ($r = 0.0163$, $p = 0.4640$). También se analizó si existía correlación entre la concentración de glucosa sanguínea, en apoptosis con la expresión de MCP-1 (**Figura 20**). Los resultados muestran que existe correlación negativa entre la glucosa sanguínea y la expresión de esta quimiocina ($r = -0.7163$, $p = 0.0228$).

8.17. Análisis de la expresión de MCP-1 y los niveles de glucosa en los diferentes subgrupos de pacientes con DM2/ITB.

Se analizó la expresión de MCP1 en las células de cada uno de los subgrupos de los pacientes con DM2/ITB (Absceso, Fascitis y Fournier), comparándose con los grupos controles (DM2 y sanos). Como se muestra en la **Figura 22**. Los resultados notifican claramente que el subgrupo de pacientes DM2/ITB con Fascitis presentan un claro incremento en la expresión de MCP1 cuando se compara con los demás subgrupos y los controles, (** $p = 0.0028$). También se analizó si existían diferencias entre los niveles de glucosa de estos subgrupos de pacientes con DM2/ITB al compararse entre ellos y el control

de DM2. Como se muestra en la **Figura 21 B**, no existe una diferencia significativa en el nivel de glucosa en los diferentes subgrupos de DM2/ITB ($p=0.2618$).

9. DISCUSIÓN.

La apoptosis es un mecanismo esencial por el cual las células se eliminan de manera controlada, limitando así el daño excesivo del entorno celular. Inicialmente, la apoptosis fue considerada como un mecanismo por el cual una población celular selecta puede ser activamente eliminada de un tejido específico durante la morfogénesis y la remodelación tisular; Sin embargo, ahora se sabe que este fenómeno tiene un papel importante en la resolución de la respuesta inmune.

La apoptosis de linfocitos juega un papel importante en la función apropiada de la respuesta inmune⁽⁶⁰⁾. Ya que intervienen en los procesos de maduración de los linfocitos B y T durante la selección positiva y negativa. La apoptosis también regula la magnitud de la respuesta inmune. Los linfocitos activados se eliminan cuando ha cedido un proceso infeccioso⁽⁶¹⁾. Sin embargo, cuando el mecanismo de apoptosis no funciona adecuadamente, el resultado puede ser un fuerte daño en el organismo.

Diferentes estudios informan que la hiperglicemia crónica incrementa la muerte celular por apoptosis, de manera específica por la vía intrínseca^(62;63). Por lo que una alta proporción de linfocitos en apoptosis en estados diabéticos puede explicar la función inmune deficiente en los diabéticos pobremente controlados⁽⁶⁴⁾. Existe evidencia de que la apoptosis participa en diversos procesos fisiopatológicos de la diabetes. Pues niveles elevados de azúcar inducen apoptosis de células endoteliales, que conlleva a complicaciones asociadas a la apoptosis como la aterosclerosis, neurodegeneración e insuficiencia renal^(21;65). Pues se ha observado que en ratas diabéticas se presenta apoptosis de neuronas productoras de vasopresina, de neuronas corticales, del hipotálamo y de ganglios espinales. En cultivos primarios de microglía de rata se presenta apoptosis en presencia de altas concentraciones de glucosa y si se le agrega LPS se observa un efecto sinérgico.

Un número de estudios han ofrecido evidencia que los pacientes diabéticos presentan leucocitosis⁽⁶⁶⁻⁶⁸⁾. De manera específica en la población de linfocitos⁽⁶⁴⁾. Esto puede jugar un

papel muy importante en el funcionamiento deficiente de la respuesta inmune y una alta incidencia de infecciones en los pacientes diabéticos sin control^(69;70). La disminución en el número de los linfocitos es probablemente una consecuencia clínica de la apoptosis que ocurre en estas células.

Varios estudios han demostrado una fuerte correlación entre la prevalencia de infecciones y el control metabólico de los pacientes^(71;72). Un estudio en células de sangre periférica obtenida de pacientes diabéticos muestra un incremento en la apoptosis al compararla con la de pacientes sanos⁽⁷³⁾. El mecanismo por el cual se induce este estado de apoptosis en las células de pacientes diabéticos poco controlados, aun no se conoce. Se ha proporcionado evidencia que prueba que la vía de inducción de apoptosis en los linfocitos de estos pacientes es mediado por la vía mitocondrial⁽⁶⁴⁾. Estudios propios prueban la implicación de la vía extrínseca de la apoptosis como un mecanismo inductor de apoptosis en células de sangre periférica de pacientes poco controlados y con infecciones asociada a sangre periférica⁽⁷⁴⁾. De varios estudios *in vitro* e *in vivo* se ha inferido la participación del sistema Fas/FasL en la patogenia de la diabetes^(75;76), ya que se ha demostrado que la inducción de apoptosis en la células del páncreas es promovido por la interacción de Fas con su ligando. Nosotros hemos demostrado que existe un incremento en la expresión de Fas en células de sangre periférica de pacientes con DM2 e infección de tejidos blandos, después de ser sometidas a choque térmico, así mismo estos pacientes presentan un notable incremento en la expresión del ligando de Fas⁽⁷⁴⁾. Estos hallazgos y los de otros autores justifican que exista apoptosis en células de sangre periférica de pacientes con diabetes y que esta apoptosis se incrementa en procesos infecciosos. Es muy probable que esta apoptosis sea debida al incremento en la expresión de Fas y su ligando.

El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar la vía de inducción de apoptosis mediante el nivel de expresión de algunas moléculas relacionadas con la inducción de este proceso. A diferencia de estudios anteriores, se determino la apoptosis en dos condiciones, en

células mononucleares de sangre periférica inmediatamente después de purificarse (apoptosis espontánea) y en células después de ser sometidas a un estrés térmico (apoptosis inducida). Como primer paso, se evaluó apoptosis mediante la determinación de la fragmentación de DNA, utilizando la técnica de TUNEL, y la activación de enzimas pro-apoptóticas, empleando la medición de la Caspasa 3 activa.

Las Caspasas son una familia de proteasas de cisteína-aspartato que juegan un crucial papel en la apoptosis. Como ya lo mencionamos existen dos principales vías de inducción de apoptosis: la vía extrínseca la cual involucra los receptores de TNF como TNFR1 y Fas, y la vía intrínseca o mitocondrial la cual involucra a los miembros de la familia de Bcl-2⁽⁷⁷⁾. La Caspasa 3 es una de las Caspasas efectoras críticas involucradas en ambas vías y su activación es crucial en la muerte celular ⁽⁷⁸⁾. En este trabajo se analizó apoptosis en células de sangre periférica mediante la fragmentación de DNA (TUNEL), y mediante la determinación de Caspasa 3 activa. Los resultados obtenidos se muestran en la **Figura 6 y 8** respectivamente, En la determinación de apoptosis espontánea por TUNEL se observa que no existe una diferencia significativa del porcentaje de apoptosis entre los tres grupos de estudio. Como sabemos el porcentaje de apoptosis en células de individuos normales es de alrededor de un 2-5%, lo cual se presenta en los tres grupos; controles (2%), DM2 (5.2%) y DM2/ITB (5.0%). Por otro lado, el porcentaje de apoptosis inducida es claramente mayor en el grupo de pacientes con DM2/ITB comparados con los otros dos grupos ($p=0.0001$). Los resultados obtenidos son consistentes con lo observado por otros autores⁽⁶⁴⁾, quienes sostienen que no existe diferencia significativa en el porcentaje de apoptosis en los pacientes con DM2 y los controles sanos. Sin embargo, es muy importante notar que se trata de apoptosis espontánea. En estudios anteriores realizados por este grupo de trabajo se mostró por primera vez, que a pesar de que no existe diferencia en la apoptosis espontánea en estos grupos, si observamos un aumento significativo en la apoptosis inducida, lo cual asegura que las CMN de los pacientes con DM2/ITB son más vulnerables a este proceso, que las de los DM2. Esta observación infiere que este tipo de células son más

susceptibles a sufrir muerte celular, ya se ha demostrado en diversos estudios, que la apoptosis es uno de los procesos de respuesta a los niveles elevados de glucosa en sangre, además de que se ha observado que existen mecanismos que pueden incrementar este efecto, como lo son: producción de ROS, AGEs, LPS, TNF y elevada producción de citocinas, estos tres últimos característicos de procesos infecciosos ⁽⁷⁹⁾.

Los resultados de la evaluación de Caspasa 3 activa, (**Figura 8**) en ella se observa que existe un aumento de la presencia de esta proteína, tanto de manera espontánea como inducida. En el grupo de pacientes con DM2/ITB, sin embargo, solo encontramos un aumento estadísticamente significativo ($p=0.0129$) en la apoptosis inducida en este grupo de pacientes con DM2/ITB, tiene correlación con el porcentaje de apoptosis observado en la **Figura 6**. Esta observación sugiere que la apoptosis inducida en pacientes con DM2/ITB se produce por la vía dependiente de Caspasas.

Por otro lado, se evaluó la densidad de la expresión de proteínas relacionadas con las vías de la apoptosis, Caspasa 8 activa y Caspasa 9 activa (**Figura 10 y 12**). Estos experimentos se realizaron debido a que se sabe que la apoptosis con frecuencia está relacionada con la activación de una familia de Caspasas, las cuales pueden activarse tanto por vía extrínseca como intrínseca. La vía extrínseca se activa mediante la unión ligando-receptor, en la cual participan receptores de membrana como Fas, TNF α , DR4/DR5, así como sus respectivos "ligandos de muerte", FasL, R-TNF 1/2 o TRAIL, con la subsiguiente formación del complejo de muerte, la activación de la cascada de Caspasas y la degradación de DNA. La activación de Caspasas inicia con la Caspasa-8, la cual está directamente relacionada con la vía extrínseca, ya que las Caspasas se sintetizan en forma de zimógenos, necesitan un procesamiento proteolítico para su activación y así activar a otras Caspasas. En tanto la vía intrínseca o mitocondrial es activada en respuesta a un estímulo, como el estrés, administración de drogas, radiaciones, etc. que lleva a la formación del apoptosoma, el cual

procesa de forma proteolítica la Caspasa 9 y posteriormente la Caspasa 3, que a su vez lleva a la degradación del DNA.

Al evaluar la expresión de Caspasa 8, se observó mayor expresión de esta tanto en condiciones espontáneas, como inducidas en el grupo de pacientes con DM2/ITB. Lo cual puede sugerir de manera importante que la apoptosis mostrada en las células de estos pacientes pudiera ser por la vía de ligandos como lo es el sistema Fas-Fas-L, donde se reclutan moléculas adaptadoras formándose el complejo de inductor de muerte (DISC), en donde se lleva a cabo la activación o procesamiento de Caspasa 8 y Caspasa 10. Elevados niveles de CD95 DISC y altas concentraciones de Caspasa 8 activa y Caspasa 10, directamente inducen la activación de Caspasas efectoras (Caspasa 3, Caspasa 6 y Caspasa 7). Por lo que las células sean más susceptibles a la apoptosis. Nuestros resultados demuestran que en pacientes con DM2/ITB, hay inducción de muerte celular vía extrínseca, ya que hay un incremento en la expresión de Caspasa 8 activa. Y estos datos son consistentes con la expresión de Fas y FasL, reportados con anterioridad por este grupo de trabajo ⁽⁸⁰⁾. Fas es un receptor transmembranal de la familia de TNF que se expresa constitutivamente en una variedad de tipos celulares, incluyendo linfocitos, eosinófilos, monocitos y neutrófilos, en tanto que su ligando Fas-L es una proteína transmembranal, que se expresa de forma inducida en algunos tipos celulares. Tanto Fas como su ligando Fas-L, son de suma importancia en la inducción de apoptosis en células que participan en la respuesta inmunitaria. Existen evidencias de que la exposición prolongada a glucosa incrementa la expresión de Fas, llevando a un efecto deletéreo sobre las células β pancreáticas, en ratones diabéticos tipo NOD, la concentración de glucosa actúa de manera anti o pro-apoptótica dependiendo de las condiciones de cultivo, ya que se ha observado que existe una inducción en la proliferación de este tipo de células por la glucosa en roedores como *Psammomys obesus*. Por otro lado, se ha observado un incremento en la expresión de Fas en células β pancreáticas de pacientes con DM2 comparados con los

controles, concluyendo que la apoptosis inducida por la hiperglucemia se lleva a cabo principalmente por la vía Fas-FasL.

En la **Figura 11**, se observa la expresión de Caspasa 9 activa, la cual es mayor en las CMN de los pacientes con DM2 y DM2/ITB que fueron sometidas a choque térmico, pero el nivel de expresión de esta proteína es significativamente menor que la Caspasa 8. Por lo que puede inferirse que ambas vías se encuentren activadas solo en las células sometidas a choque térmico y que padecen algún tipo de infección y DM2 controlados, por medio de una asa de regulación, en cuyo caso envuelve la activación de BID (tBID), mediante la interacción con la pro-Caspasa 8. Subsecuentemente, tBID libera al citocromo C de la mitocondria, se une a APAF-1 y a la pro-Caspasa 9, formándose el apoptosoma y activando a Caspasas efectoras y después a los sustratos de muerte que degradan al DNA. Lo cual explica porque la células de los pacientes con DM2 y DM2/ITB son más susceptibles a sufrir apoptosis, y que la vía de inducción de muerte celular se lleva a cabo primordialmente por la vía extrínseca.

Las proteínas quimioattractantes de monocitos y sus receptores juegan un papel muy importante en el desarrollo de la respuesta inflamatoria y es crucial para el reclutamiento de las células del sistema inmune hacia el sitio de la inflamación. Recientes estudios han implicado a MCP1 y su receptor, CCR2, en la regulación de la función de los adipositos. Estos estudios demostraron que MCP1 inhibe la entrada de glucosa estimulada por la insulina. CCR2 es el receptor para otros MCP's incluyendo MCP2 y MCP3⁽⁸¹⁾, y es necesario para el reclutamiento de monocitos/macrófagos en modelos murinos de aterosclerosis, artritis reumatoide e infecciones por micobacteria⁽⁸²⁾. Weisberg y Co. demostraron⁽⁸³⁾, que el receptor de MCP1 CCR2 juega un papel importante en el desarrollo de obesidad y está asociado a la inflamación tisular en el adiposito e importantemente en la resistencia sistémica a la insulina. Elevados niveles de MCP1 en circulación han sido encontrados en pacientes con diabetes tipo 1 y 2^(84;85). Estudios *In Vitro* han demostrado que los productos finales avanzados de glicación, altas concentraciones de glucosa, albúmina glicada y la LDL glicoxidizada incrementa la expresión de

MCP1⁽⁸⁶⁾. Recientemente Zhou y Co., reporto la identificación de una nueva proteína, designada MCP1P (Proteína Inducida por MCP1), la cual es expresada en monocitos humanos después de la estimulación con MCP1. La expresión de esta proteína conlleva a la regulación transcripcional de genes que resultan en la inducción de apoptosis⁽⁸⁷⁾.

En este estudio nosotros también analizamos la expresión de MCP1 en células mononucleares de sangre periférica de los pacientes con Diabetes e infección. La expresión de MCP1 se muestra en la **Figura 14**, donde observamos un claro incremento en la expresión de esta proteína en los pacientes con DM2/ITB comparado con los pacientes DM2 y los controles sanos. En los pacientes DM2 hay un incremento en la expresión de MCP1, sin embargo no es significativo comparado con los controles sanos. Esto es consistente con estudios que identifican a MCP1 como un gene que responde a estados de hiperglucemia, que frecuentemente acompañan a la obesidad y a la resistencia a la insulina. Estudios han demostrado que MCP1 se incrementa en ratones obesos, alterando la función de los adipocitos *In Vitro*, disminuyendo la entrada de glucosa a las células por medio de la insulina^(1;88)

En este trabajo se muestra que la expresión de MCP1, en los pacientes DM2/ITB, se ve incrementada en las CMN de estos pacientes y que puede ser causada por la hiperglucemia y por la infección.

Para establecer si existía alguna relación con la expresión de MCP1 con la apoptosis en las células de pacientes con DM2/ITB, realizamos un análisis de correlación entre la expresión de MCP1 con la proporción de células en apoptosis y los niveles de glucosa sanguínea en pacientes DM2/ITB (**Figura 17 y 20**). El análisis de correlación entre el porcentaje de apoptosis inducida, con la expresión de MCP1 mostró que no existía una correlación, lo que nos indica que muy probablemente la expresión de MCP1 en las células mononucleares de sangre periférica de los pacientes con DM2.ITB no juega algún papel en la inducción de apoptosis. Sin embargo un dato interesante es el que se observa en la **Figura 20** donde al correlacionar la expresión de MCP1 con los niveles de glucosa encontramos un correlación inversa. Como lo

mencionamos anteriormente la expresión de MCP1 está asociada a la hiperglucemia, sin embargo nuestros datos muestran que esta asociación no sucede en las células mononucleares de sangre periférica de estos pacientes. Si más bien, pareciera ser que la hiperglucemia inhibe la expresión de esta quimiocina o bien existe algún mecanismo que induce la secreción de esta, pues como se ha mostrado anteriormente por otros autores, existe un elevado nivel de expresión de MCP1 soluble en el suero de pacientes con DM2. Por lo que sería interesante analizar la presencia de MCP1 en el suero de estos pacientes. De igual manera esta relación inversa entre los niveles de glucosa y la expresión de MCP1 pudieran explicar de alguna manera la ineficiencia de los pacientes con DM2/ITB sin control en su capacidad de manejar estas infecciones. En la **Figura 21** se analizó la expresión de MCP-1 con respecto a las distintas infecciones y se encontró que existe un aumento en la expresión de MCP-1 en pacientes con Fascitis y un dato interesante es que estos pacientes tienen niveles menores de glucosa en sangre comparados con las otras infecciones, infiriendo que el nivel de glucosa en sangre es inversamente proporcional a la expresión de MCP-1 en estas células.

Posteriormente evaluamos la correlación entre el nivel de glucosa en sangre, con el porcentaje células en apoptosis y la expresión de Caspasa 8, y 9 activa (**Figura 18, 19**). Los resultados demostraron que existe cierta correlación negativa entre la apoptosis y los niveles de glucosa. Estos datos son interesantes ya que la literatura muestra que los niveles altos de glucosa inducen la generación de especies reactivas de oxígeno como óxido nítrico, superóxido y peroxinitrito. Las cuales activan proteínas involucradas en la apoptosis como Caspasas y proteínas de la familia de Bcl-2. Sin embargo, en este estudio se muestra que al menos en las células de sangre periférica de estos pacientes la condición de hiperglucemia pareciera inhibir la apoptosis, en estas células ante condiciones de inducción como lo es el choque térmico. Lo que indica que probablemente las condiciones de hiperglucemia induce un fenómeno de no respuesta a condiciones de estrés para la inducción de apoptosis.

10. CONCLUSIONES.

En este trabajo mostramos, que existe un incremento significativo en la apoptosis inducida en CMN de los pacientes DM2/ITB. Por otro lado, demostramos la participación de la Caspasa 8 en la vía de apoptosis que experimentan estas células, lo cual infiere que estas células, al expresar Fas y FasL en la apoptosis de sangre periférica (datos previos) y expresar Caspasa 8 en su forma activa, mueren a través de la vía extrínseca o de ligandos de muerte. Estas células expresan Caspasa 9, sin embargo no es significativo, pero cabe hacer notar que la hiperglucemia sostenida aumenta la producción de ROS y AGE los cuales preferentemente inducen la muerte a través de la vía mitocondrial, y de esta manera observamos un aumento. Por primera vez se demostró la expresión de la quimiocina MCP1 en CMN de pacientes DM2/ITB, mostramos que los valores de glucosa sanguínea correlacionan negativamente con la expresión de esta quimiocina. Estos hallazgos contribuyen a explicar mejor la fisiopatología de las infecciones en los pacientes con DM2, específicamente con Fascitis. De de manera interesante mostramos que los valores de glucosa sanguínea correlacionan negativamente con la expresión de esta quimiocina, lo que pudiera explicar de alguna manera que la inmunosupresión que presentan los pacientes con DM2 sin control, es propiciada además de la linfocitosis ocasionada por la apoptosis; por la baja expresión de mediadores quimioatrayentes como lo es MCP1 en estados de hiperglucemia.

11. ANEXO

11.1. Tablas

Paciente	Tiempo de Evolución (años)	Sexo	Edad	Glucosa (mg/dl)	Grado de Descontrol	Diagnostico	Grado de IRC	Complicación Aguda	Leucocitos	Desenlace	% de Apoptosis	
											Espontánea	Inducida
1	1	F	51	315	Severo	Fascitis cuello	Sin		11400	Alta	1	33
2	10	F	66	317	Severo	Absceso cara	Leve	Edo. Hiper	8400	Alta	20	S/D
3	10	F	60	193	Moderado	Fascitis perine	Sin			Alta	0	17
4	3	M	56	149	Leve	Fascitis MP	Leve		16500	Alta	0	4
5	8	M	47	455	Severo	Fournier	Leve	Edo. Hiper	14500	Alta	0	8
6	11	M	59	402	Severo	Sx Fournier	Leve	Ceto	11100	Deceso	0	35
7	9	M	57	634	Severo	Sx fournier	Leve	Edo. Hiper	4660	Alta	0	15
8	11	M	43	229	Moderado	Fournier	Sin		6700	Alta	0	
9	20	M	74	336	Severo	Absceso geniano	Leve		11400	Alta	0	7
10	15	M	59	300	Severo	Pie Diabético	Moderada		10400	Alta	0	2
11	10	M	64	279	Severo	Fascitis MPD	Leve		6000	Alta	0	2
12	1	M	49	103	Controlado	Absceso cuello	Leve	Edo. Hiper	4200	Deceso	0	0
13	1	M	44	127	Leve	Fascitis cadera	Sin		9300	Alta	0	4
14	5	F	72	448	Severo	Fournier	Severa	Edo. Mixto	7000	Deceso	4	8
15	18	F	65	208	Moderado	Sx Fournier	Moderada		19100	Alta	12	32
16	6	M	53	311	Severo	Fascitis Abdominal	Sin		13100	Alta	16	34
17	1	F	63	112	Leve	Sx Fournier	Sin		19300	Alta	49	84
18	1	M	41	107	Controlado	SX Fournier	Sin		13.5	Alta	2	3
19	3	M	59	178	Moderado	Sx Fournier y Fascitis Abdominal	Sin	Edo. Hiper	9400	Deceso	0	S/D
20	1	M	63	148	Leve	Fascitis Abdominal y Perine	Sin		5700	Alta	2	17
Promedio	7.25		57.25	268							5.3	21

Tabla 1. Características generales de los pacientes con DM2 controlados y DM2 con infección (DM2/ITB).

Paciente	Tiempo de Evolución (años)	Sexo	Edad	Glucosa (mg/dl)	Tratamiento	% de Apoptosis	
						Espontánea	Inducida
1	1	M	52	120	Hipo-glucemiante	5	12
2	15	F	66	120	Hipo-glucemiante	12	4
3	20	F	66	133	Hipo-glucemiante	5	8
4	25	F	75	161	Hipo-glucemiante	13	8
5	16	F	76	99	Hipo-glucemiante	1	19
6	4	F	49	145	Metformina	0	4
7	6	F	50	160	Dieta	4	
8	5	F	39	115	Glibenclamida	3	4
9	15	F	73	161	Hipo-glucemiante	3	S/D
10	1	M	56	134	Glibenclamida	4	10
11	8	F	65	200	Glibenclamida	0	8
12	1	F	80	150	Mibenclamida	0	1
13	1	F	42	110	Dieta	15	1
14	5	F	49	157	Biloclón	5	21
Promedio	9.4		59.9	142		4.7	8.3

Tabla 2. Características clínicas del grupo de estudio de pacientes con DM2 controlada y su porcentaje de apoptosis en células de sangre periférica.

11.2. Figuras

11.2.1. Apoptosis Cuantificada por TUNEL.

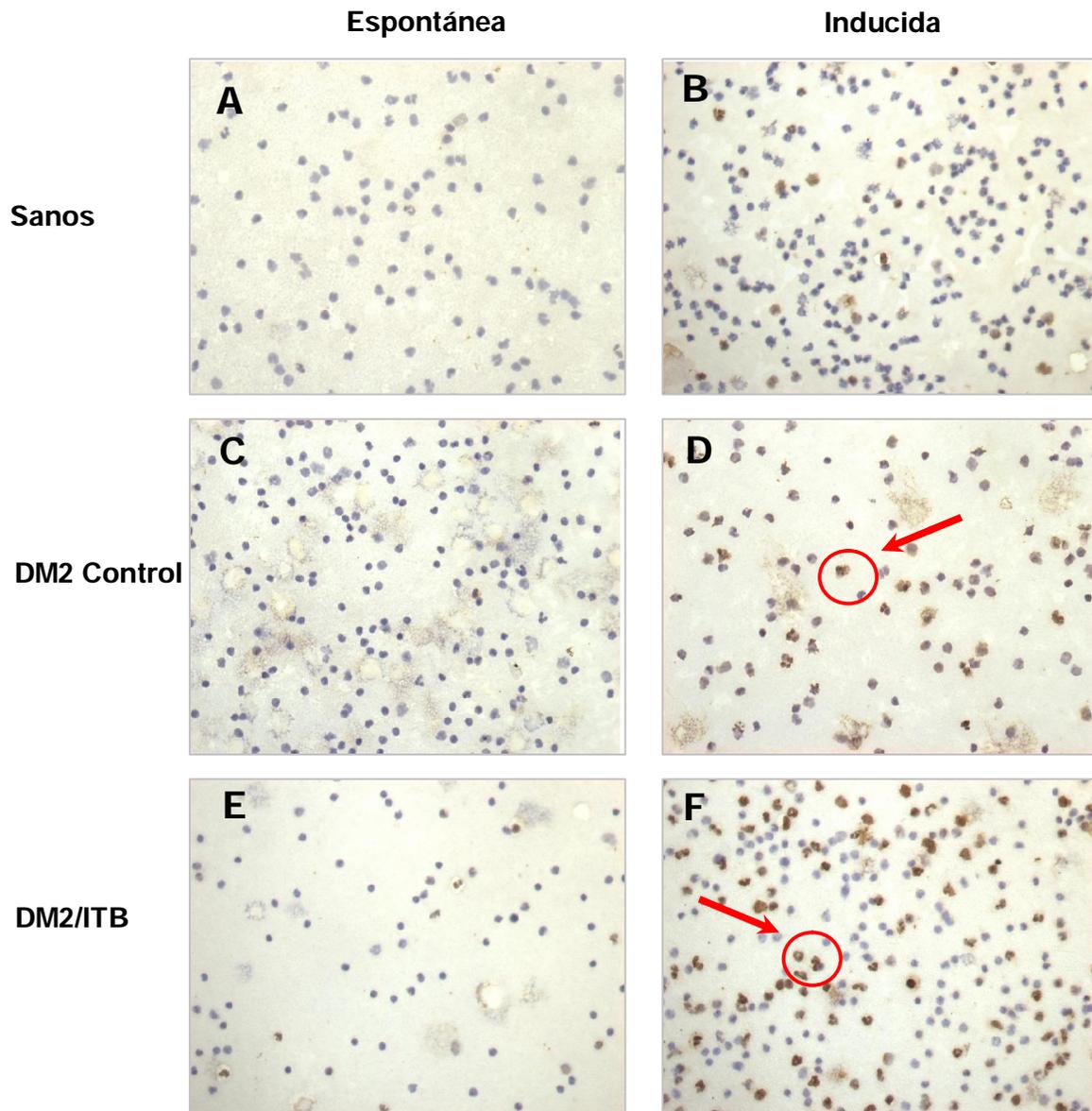


Figura 5. Fotografía representativa de las células TUNEL-positivas. Los controles sanos, se muestra negativos para la detección de la fragmentación de DNA (TUNEL), (A y B) lo cual representa la apoptosis celular. En la muestras de pacientes con DM2/ITB se muestra claramente un incremento de la apoptosis en las muestras sometidas al choque térmico (F), se muestra la presencia de apoptosis celular principalmente en el núcleo y citoplasma de las células En las muestras de los pacientes con DM2 y en los controles se observa una discreta presencia de células positivas para TUNEL, en las muestras sometidas al choque térmico (D). 40X.

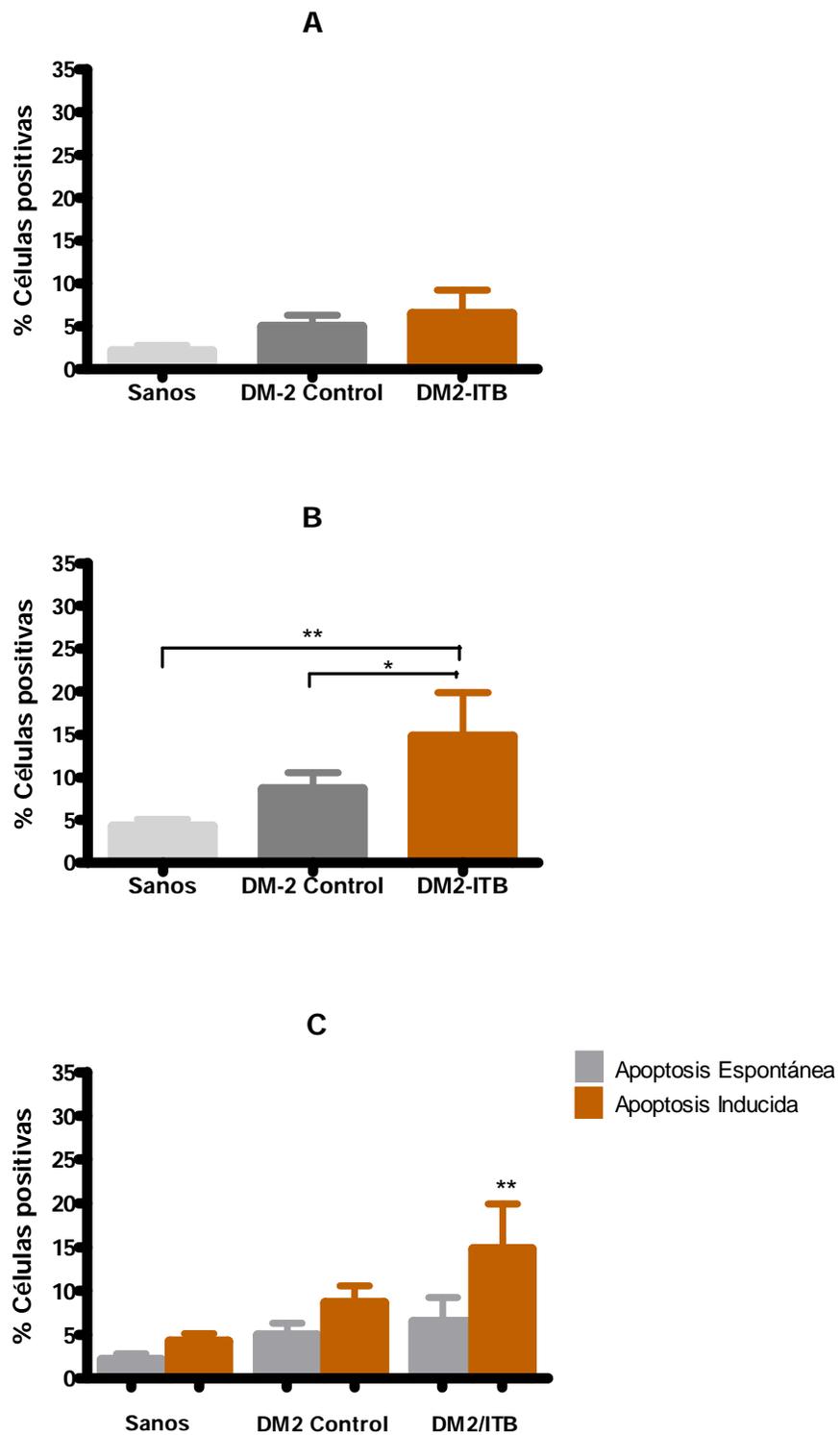


Figura 6. Porcentaje de células positivas para TUNEL. En células de sangre periférica no tratadas (A) o tratadas con calor (B). Cada barra representa la media del número de células de cada uno de los pacientes. Se observa claramente un incremento en el porcentaje de células de los pacientes del grupo de Diabéticos con infección ($p= 0.0001$). C) Comparación de la expresión de células positivas para TUNEL en apoptosis espontánea e inducida.

11.2.2. Apoptosis determinada por la expresión de Caspasa-3 activa.

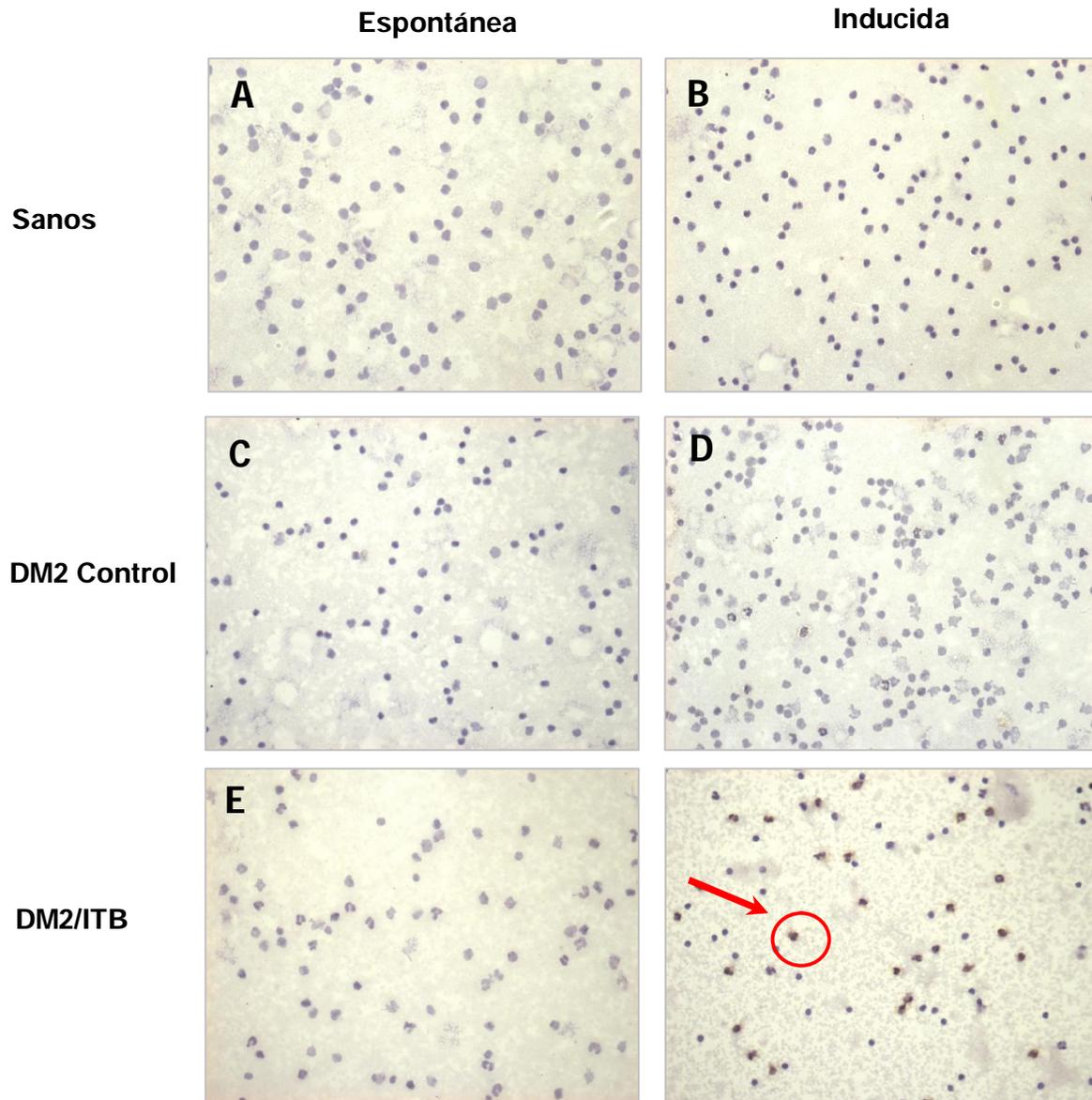


Figura 7. Fotografía representativa de las células caspasa 3 activa positivas. Se muestra claramente una nula positividad en las células de sangre periférica de los controles sanos y los DM2 en condiciones espontáneas (A y C), mientras que hay una ligera positividad en las células de pacientes con DM2/ITB (E). Sin embargo, las células de los controles y los pacientes con DM2 muestran una discreta positividad cuando las células son sometida a choque térmico (B y D), mientras que las células sometidas a choque térmico de pacientes con DM2/ITB muestran una gran positividad para caspasa 3 (F). 40X.

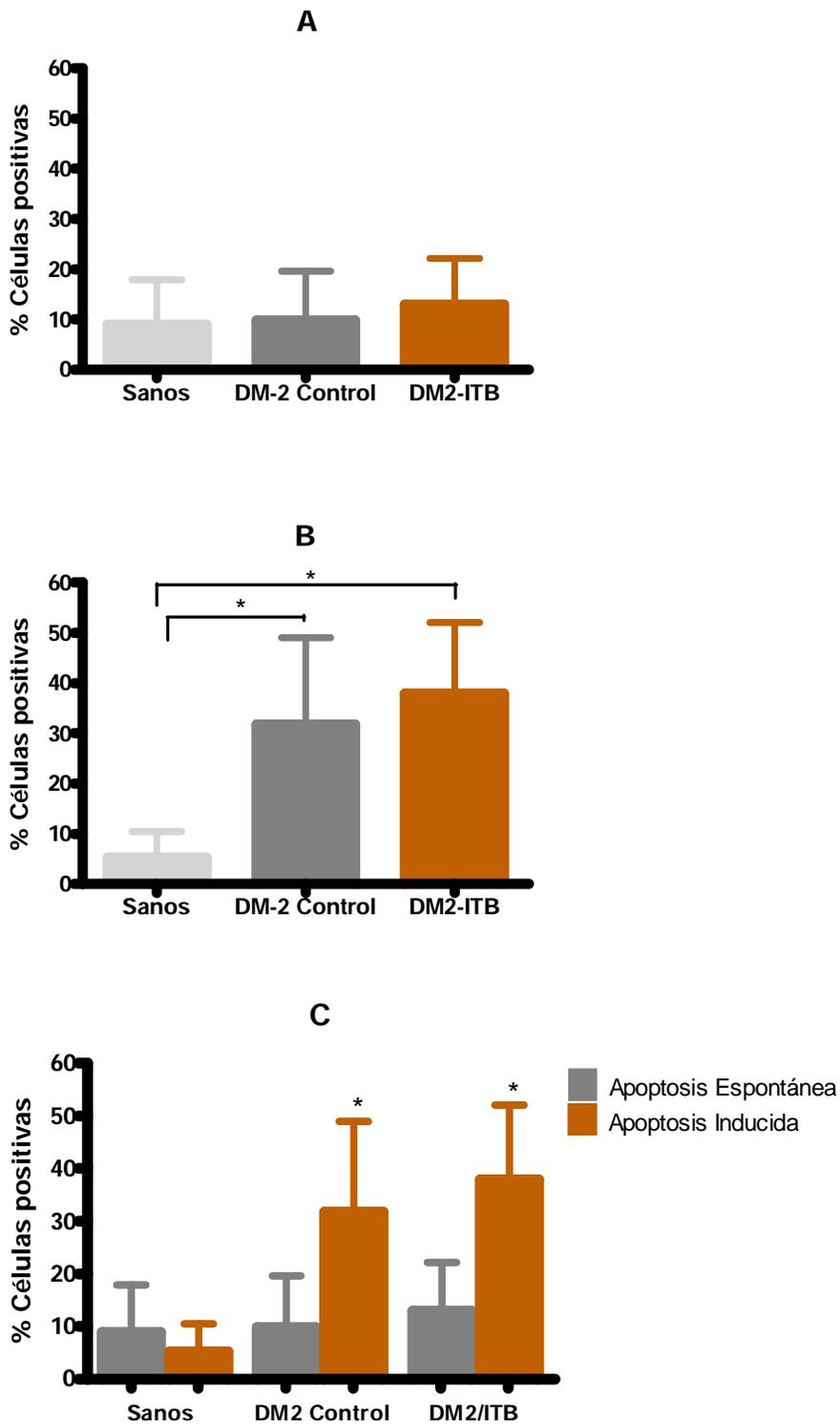


Figura 8. Densidad de la expresión del marcador Caspasa 3- activa. Cada barra representa la media de los diferentes pacientes analizados por inmunocitoquímica para C-3 activa en células de sangre periférica, (A) espontánea, (B) Inducida. C) Se observa claramente un incremento en la densidad de células de los pacientes del grupo DM2/ITB ($*p= 0.0129$) en la apoptosis inducida.

11.2.3. Expresión de Caspasa-8 activa.

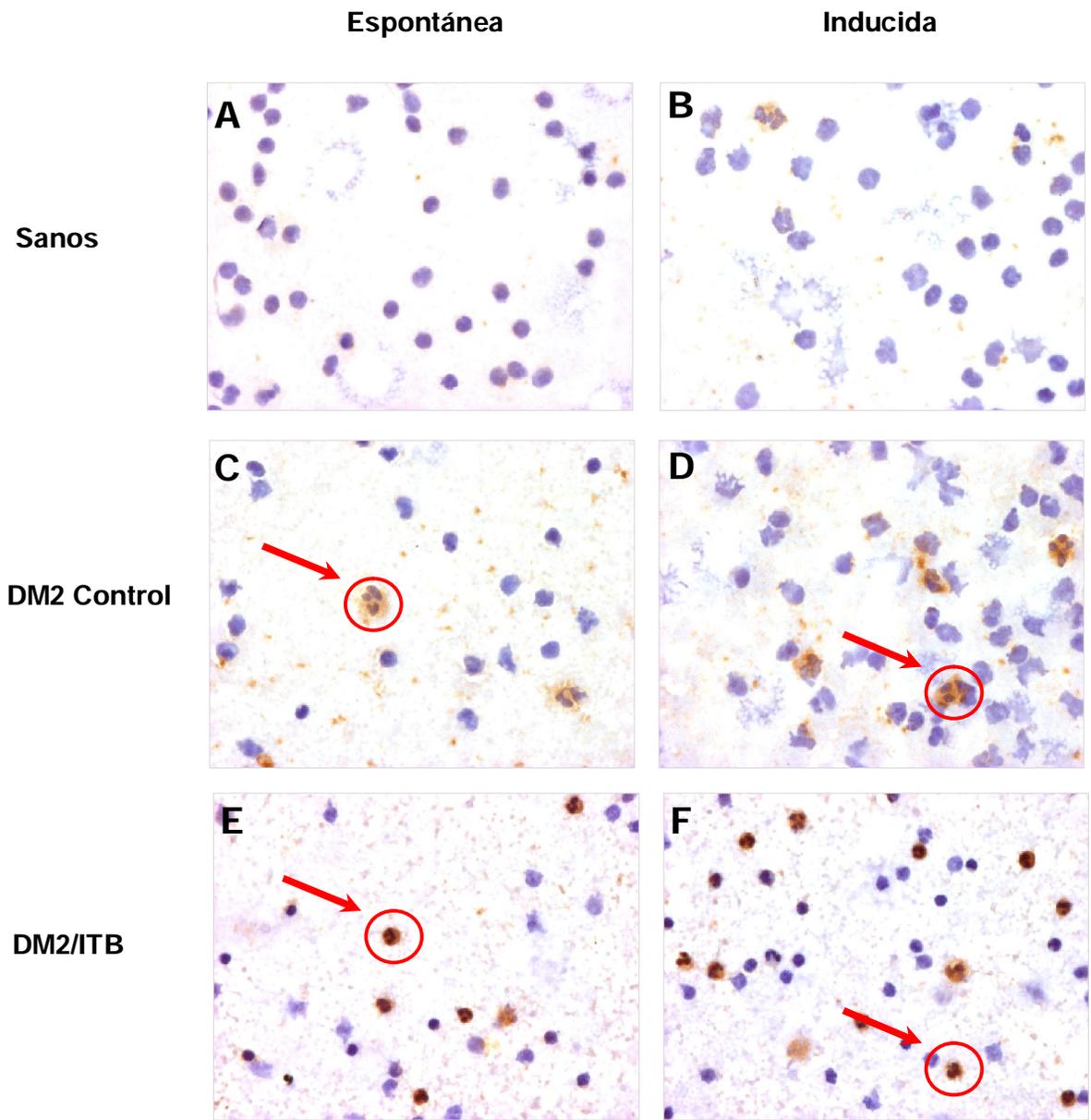


Figura 9. Fotografía representativa de las células caspasa-8 activa positivas. Positividad en células de sangre periférica de manera espontánea (A, C y E) o inducida por choque térmico (B, D y F). Nótese el incremento en la expresión de C-8 activa en apoptosis inducida. 40X.

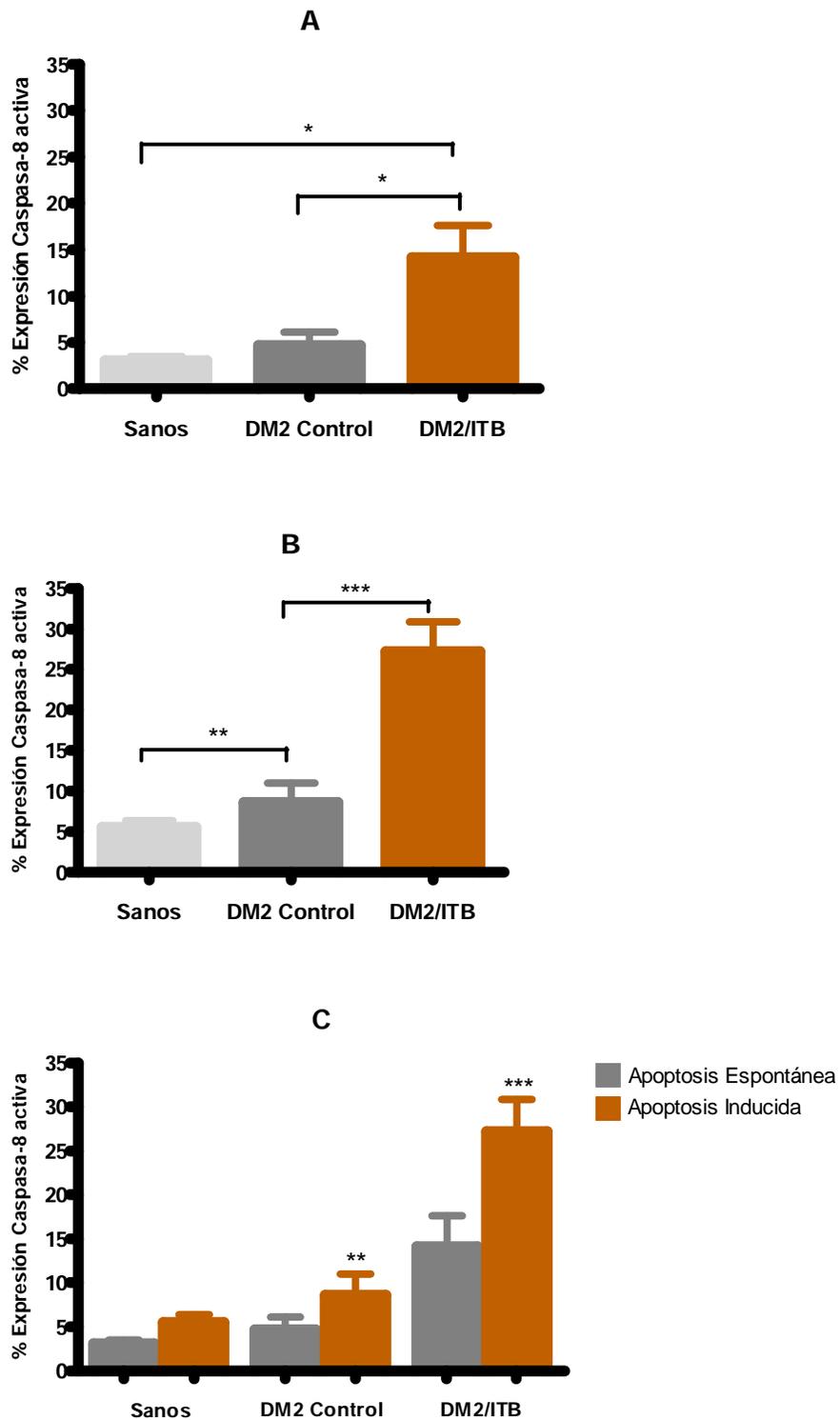


Figura 10. Densidad de la expresión de Caspasa 8. A) Apoptosis Espontánea (** $p=0.0023$, ANOVA), B) Inducida (** $p<0.0001$, ANOVA). C) Cada barra representa la media del número de células de cada uno de los pacientes. Se observa incremento en el porcentaje de células de los pacientes del grupo DM2/ITB (** $p < 0.001$ vs grupo sanos, ANOVA), también se observa incremento de los pacientes del grupo sanos (** $p < 0.001$ vs grupo DM2 Control, ANOVA).

11.2.4. Expresión de Caspasa-9 activa.

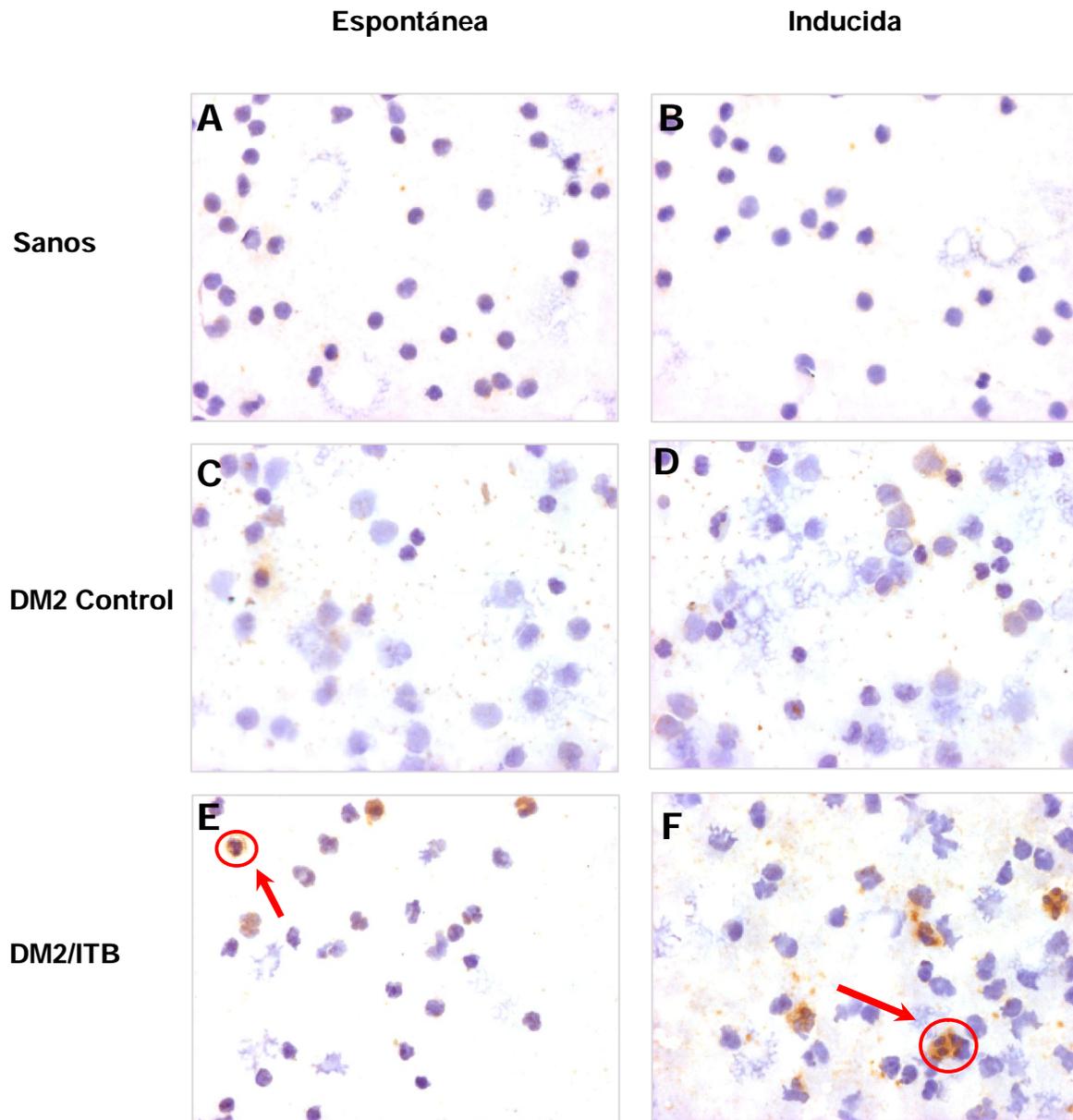


Figura 11. Fotografía representativa de las células caspasa-9 activa positivas. Positividad en células de sangre periférica de manera espontánea (A, C y E) o inducida por choque térmico (B, D y F). Nótese el incremento en la expresión de C-9 activa en apoptosis inducida. 40X.

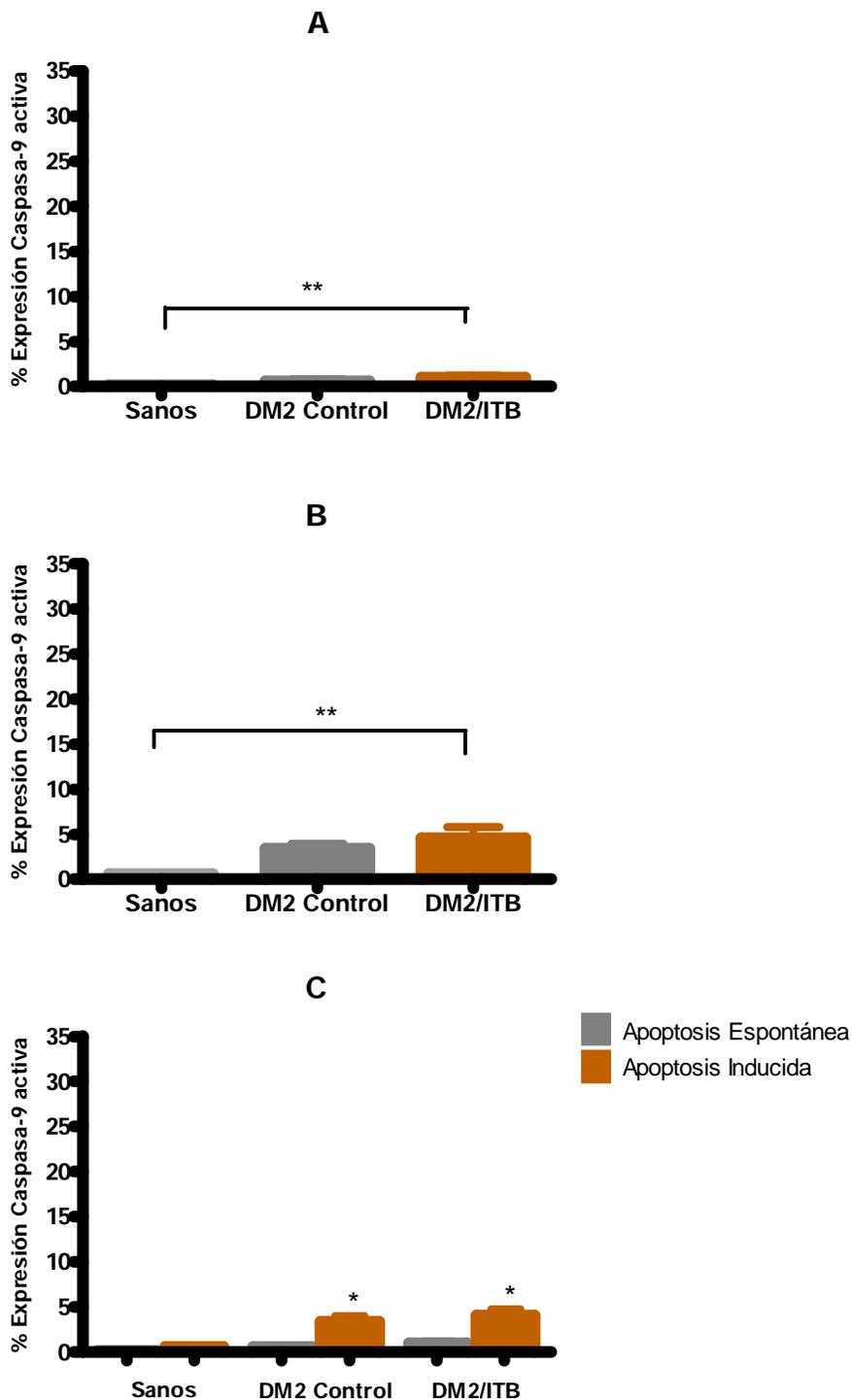


Figura 12. Densidad de la expresión de Caspasa 9. A) Apoptosis espontánea (** $p= 0.0046$, ANOVA) posteriormente se realizó la prueba de Tukey, encontrando que hay diferencia significativa en el grupo DM2/ITB comparado con el grupo control sano (* $p<0.05$ vs. grupos sanos). B) inducida (** $p= 0.0034$, ANOVA), hay diferencia en el grupo DM2/ITB comparado con el grupo control sano (* $p<0.05$ vs. grupos sanos) C) se observa incremento en el porcentaje de células de los pacientes del grupo DM2/ITB apoptosis inducida comparada con la espontánea (* $p < 0.05$ vs. DM2/ITB espontánea), lo mismo ocurre en el grupo DM2 Control inducida (* $p < 0.05$ vs. DM2/ITB).

11.2.5. Expresión de Mcp-1

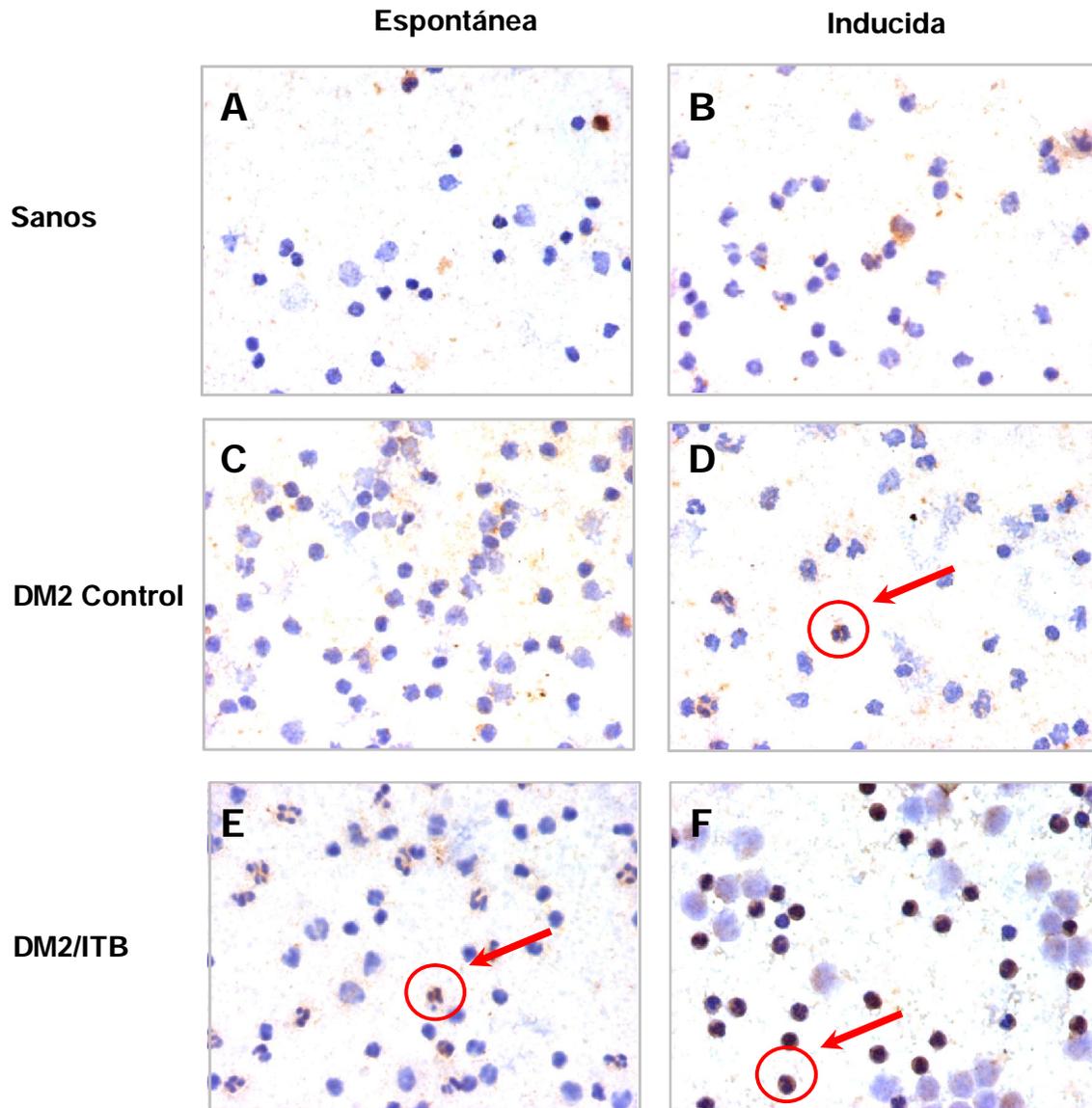


Figura 13. Fotografía representativa de las células MCP-1 positivas. Positividad en células de sangre periférica de manera espontánea (A, C y E) o inducida por choque térmico (B, D y F). Nótese el incremento en la expresión de MCP-1 en el grupo DM2/ITB. 40X.

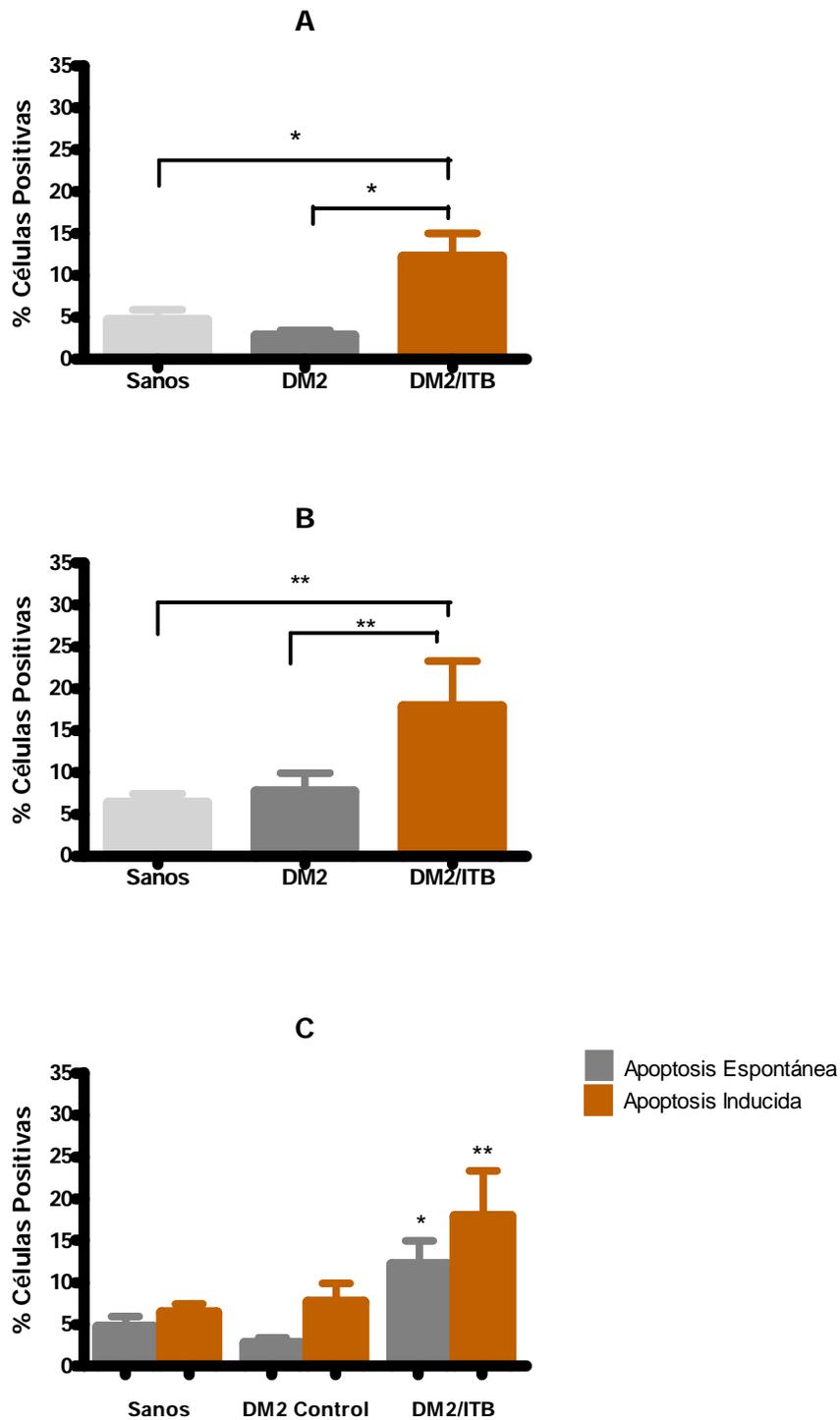


Figura 14. Densidad de la expresión de Mcp-1. **A)** Apoptosis espontánea, mediante una prueba de análisis de varianza y posteriormente Tukey, se observa un incremento en la expresión de esta quimiocina en las células de pacientes DM2/ITB comparado con los sanos ($*p < 0.05$ vs. grupos sanos) y los DM2 control ($*p < 0.05$ vs. Grupo DM2 control). **B)** apoptosis inducida, no hay diferencia estadística significativa ($p > 0.05$, ANOVA). **C)** Se compararon ambas condiciones (espontánea e inducida) y se encontró diferencia en el grupo DM2/ITB comparado con los sanos ($p < 0.005$ vs. grupo sanos)

11.3. Gráficas de Correlaciones Estadísticas

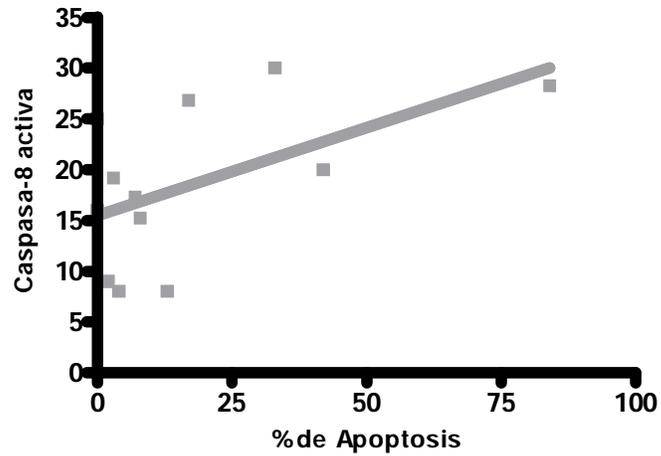


Figura 15. El porcentaje de apoptosis en las células de pacientes con DM2/ITB muestra una correlación con la expresión de Caspasa-8 inducida ($r = 0.5460$, $p = 0.033$). Resultados calculados con la prueba de Pearson.

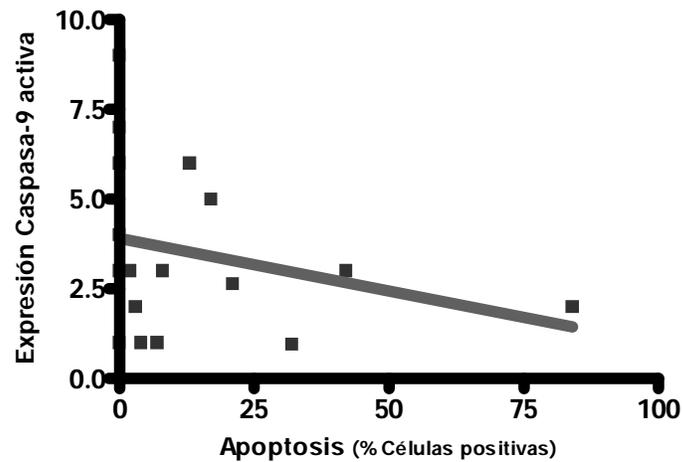


Figura 16. El porcentaje de apoptosis en las células de los pacientes con DM2/ITB no muestra una correlación con la expresión de Caspasa-9 inducida ($r = -0.2284$, $p = 0.1974$).

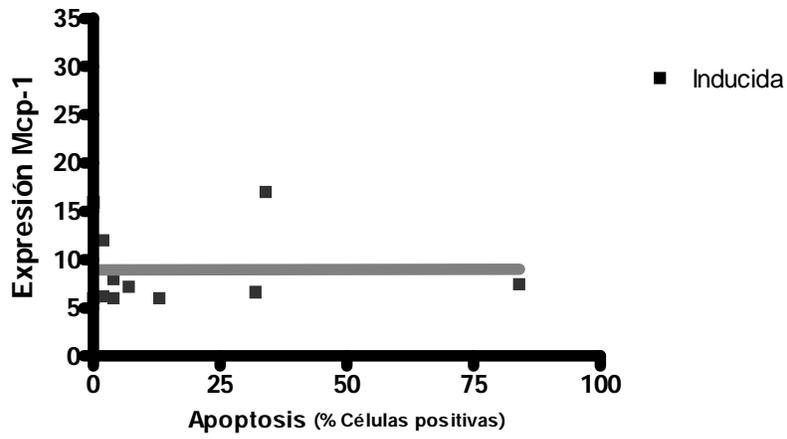


Figura 17. El porcentaje de apoptosis en las células de los pacientes con DM2/ITB no muestra una correlación con la expresión de Mcp-1 en apoptosis inducida ($r= 0.009$, $p= 0.4839$).

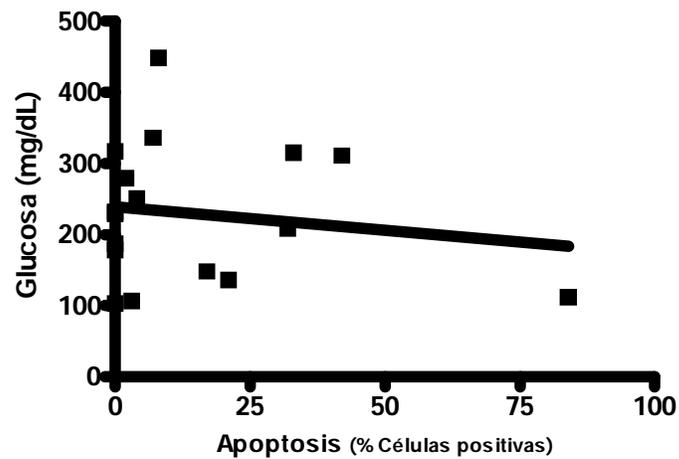


Figura 18. El porcentaje de apoptosis (TUNEL) inducida en las células de los pacientes con DM2/ITB no presenta correlación con los niveles de glucosa en sangre ($r=0.0010$, $p= 0.9967$).

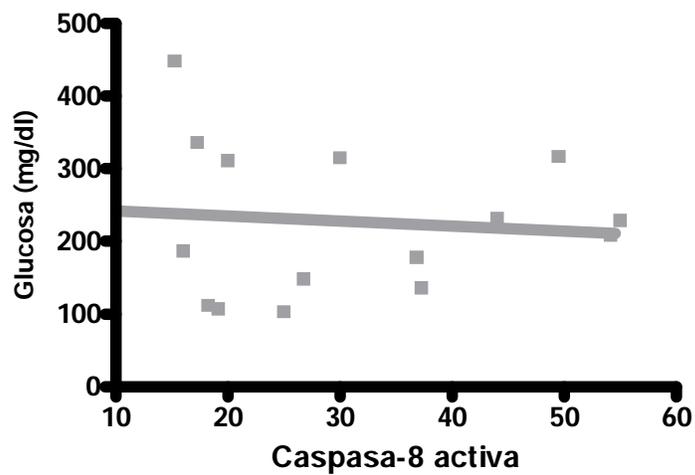


Figura 19. Los niveles elevados de glucosa en sangre de los pacientes con DM2/ITB no presentan correlación con la expresión de Caspasa-8 en apoptosis inducida ($r= 0.1077$, $p= 0.3404$).

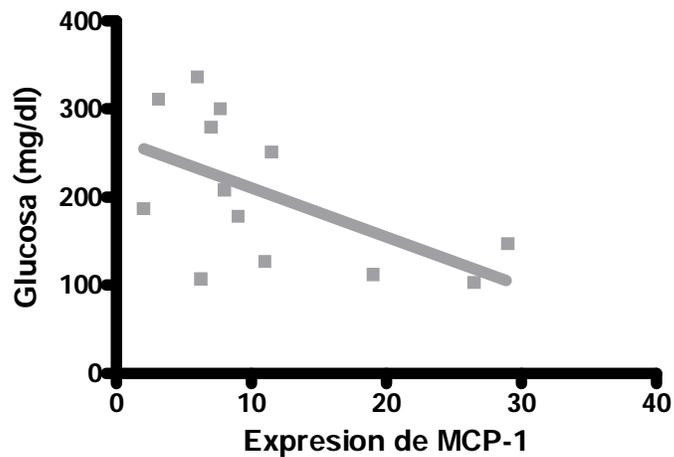


Figura 20. Los niveles elevados de glucosa en sangre de los pacientes con DM2/ITB muestran una correlación negativa con la expresión de MCP-1 en apoptosis inducida ($r= -0.5610$, $p= 0.0460$).

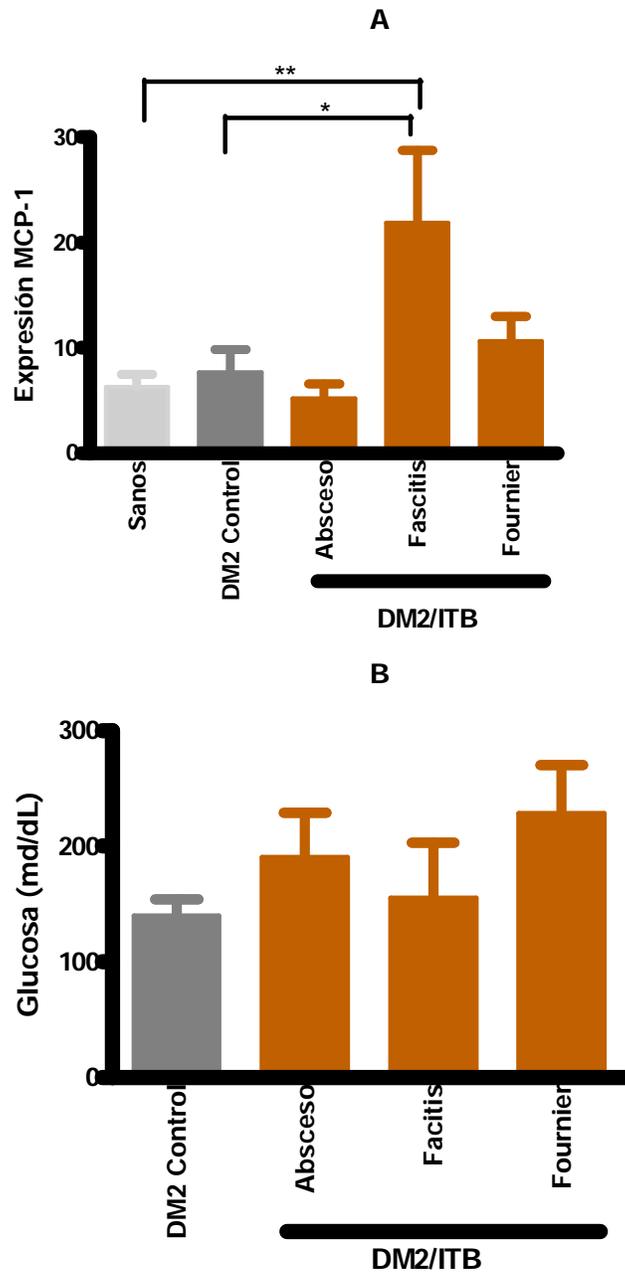


Figura 21. Expresión de MCP-1 en células de sangre periférica de pacientes con diferentes tipos de infección en tejidos blandos y la concentración de glucosa en sangre. A) Expresión de MCP-1 en cada tipo de infección, B) Expresión de MCP-1 comparada con los niveles de glucosa en sangre.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1) King H. Diabetes and the World Health Organization. Progress towards preventions and control. 16[1], 387-390. 1993.
- (2) International Diabetes Federation. [base de datos en Internet] USA: Diabetes Prevalence. 2009. [acceso 17 de Diciembre 2008] Disponible en: http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/
- (3) Zárate Herreman Margarita. Manual para la Vigilancia Epidemiológica de la Diabetes Mellitus Tipo 2. Sistema de Vigilancia Epidemiológica Hospitalaria de Diabetes Tipo 2. 2009.
- (4) Who's Certified [base de datos en Internet] USA: Prevalence of diabetes worldwide. c 2009. [acceso 17 de Diciembre 2008]. Disponible en: http://www.who.int/diabetes/facts/world_figures/en/
- (5) Prevalence Estimates Diabetes, 2007. [base de datos en Internet] USA: Diabetes Atlas. International Diabetes Federation. 2009. Disponible en: <http://www.eatlas.idf.org/atlas.html?id=0>
- (6) Programa Nacional de Salud 2007-2012. First ed. México: Secretaría de Salud, 2007.
- (7) Sesión Plenaria: "El desafío en la atención de la Diabetes-Riesgo Cardiometabólico: un tsunami anunciado". 13 Congreso de Investigación en Salud Pública. 13 Congreso de Investigación en Salud Pública; 9 A.D. Mar 4; 2009.
- (8) Gabir MM, Hanson RL, Dabelea D, Imperatore G, Roumain J, Bennett PH et al. The 1997 American Diabetes Association and 1999 World Health Organization criteria for hyperglycemia in the diagnosis and prediction of diabetes. *Diabetes Care* 2000; 23(8):1108-1112.
- (9) Olefsky JM NJ. Insuline Resistance and non-insuline-dependent diabetes mellitus: cellular and molecular mechanisms. 980S-986S. 2008.
- (10) Roglic G, Unwin N, Bennett PH, Mathers C, Tuomilehto J, Nag S et al. The burden of mortality attributable to diabetes: realistic estimates for the year 2000. *Diabetes Care* 2005; 28(9):2130-2135.
- (11) Brownlee M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature* 2001; 414(6865):813-820.
- (12) Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW et al. National Kidney Foundation practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Ann Intern Med* 2003; 139(2):137-147.
- (13) Morrish NJ, Wang SL, Stevens LK, Fuller JH, Keen H. Mortality and causes of death in the WHO Multinational Study of Vascular Disease in Diabetes. *Diabetología* 2001; 44 Suppl 2:S14-S21.
- (14) Rea WJ, Wyrick WJ, Jr. Necrotizing fasciitis. *Ann Surg* 1970; 172(6):957-964.
- (15) Peleg AY, Weerathna T, McCarthy JS, Davis TM. Common infections in diabetes: pathogenesis, management and relationship to glycaemic control. *Diabetes Metab Res Rev* 2007; 23(1):3-13.
- (16) Liu R, Desta T, He H, Graves DT. Diabetes alters the response to bacteria by enhancing fibroblast apoptosis. *Endocrinology* 2004; 145(6):2997-3003.
- (17) Laing P. The development and complications of diabetic foot ulcers. *Am. J. Surg* 1998; 176(2A Suppl):11S-19S.
- (18) Mastropaolo MD, Evans NP, Byrnes MK, Stevens AM, Robertson JL, Melville SB. Synergy in polymicrobial infections in a mouse model of type 2 diabetes. *Infect Immun* 2005; 73(9):6055

- (19) Bailiff NL, Nelson RW, Feldman EC, Westropp JL, Ling GV, Jang SS et al. Frequency and risk factors for urinary tract infection in cats with diabetes mellitus. *J Vet Intern Med* 2006; 20(4):850-855.
- (20) Rasilainen S, Ylipaasto P, Roivainen M, Lapatto R, Hovi T, Otonkoski T. Mechanisms of coxsackievirus B5 mediated beta-cell death depend on the multiplicity of infection. *J Med Virol* 2004; 72(4):586-596.
- (21) Klein JP, Hains BC, Craner MJ, Black JA, Waxman SG. Apoptosis of vasopressinergic hypothalamic neurons in chronic diabetes mellitus. *Neurobiol Dis* 2004; 15(2):221-228.
- (22) Schmeichel AM, Schmelzer JD, Low PA. Oxidative injury and apoptosis of dorsal root ganglion neurons in chronic experimental diabetic neuropathy. *Diabetes* 2003; 52(1):165-171.
- (23) Guo C, Quobadari A, Shangguan Y, Hong S, Wiley JW. Diabetic autonomic neuropathy: evidence for apoptosis in situ in the rat. *Neurogastroenterol Motil* 2004; 16(3):335-345.
- (24) Li PA, Rasquinha I, He QP, Siesjo BK, Csiszar K, Boyd CD et al. Hyperglycemia enhances DNA fragmentation after transient cerebral ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* 2001; 21(5):568-576.
- (25) Mishra R, Emancipator SN, Kern T, Simonson MS. High glucose evokes an intrinsic proapoptotic signaling pathway in mesangial cells. *Kidney Int* 2005; 67(1):82-93.
- (26) Vincent AM, Brownlee M, Russell JW. Oxidative stress and programmed cell death in diabetic neuropathy. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 959:368-383.
- (27) Bamri-Ezzine S, Ao ZJ, Londono I, Gingras D, Bendayan M. Apoptosis of tubular epithelial cells in glycogen nephrosis during diabetes. *Lab Invest* 2003; 83(7):1069-1080.
- (28) Chu Y, Faraci FM, Ooboshi H, Heistad DD. Increase in TUNEL positive cells in aorta from diabetic rats. *Endothelium* 1997; 5(4):241-250.
- (29) Nigris F., Tajana G, Condorelli M, D'Armiento FP, Sica G, Lerman LO et al. Glycooxidation of low-density lipoprotein increases TUNEL positivity and CPP32 activation in human coronary cells. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1010:710-715.
- (30) Cai L, Kang YJ. Cell death and diabetic cardiomyopathy. *Cardiovasc Toxicol* 2003; 3(3):219-228.
- (31) Mellado-Gil JM, Aguilar-Diosdado M. High glucose potentiates cytokine- and streptozotocin-induced apoptosis of rat islet cells: effect on apoptosis-related genes. *J Endocrinol* 2004; 183(1):155-162.
- (32) Wang JY, Yang JM, Wang JY, Tao PL, Yang SN. Synergistic apoptosis induced by bacterial endotoxin lipopolysaccharide and high glucose in rat microglia. *Neurosci Lett* 2001; 304(3):177-180.
- (33) Ramana KV, Friedrich B, Bhatnagar A, Srivastava SK. Aldose reductase mediates cytotoxic signals of hyperglycemia and TNF-alpha in human lens epithelial cells. *FASEB J* 2003; 17(2):315-317.
- (34) Verzola D, Bertolotto MB, Villaggio B, Ottonello L, Dallegri F, Salvatore F et al. Oxidative stress mediates apoptotic changes induced by hyperglycemia in human tubular kidney cells. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15 Suppl 1:S85-S87.
- (35) Kang BP, Frencher S, Reddy V, Kessler A, Malhotra A, Meggs LG. High glucose promotes mesangial cell apoptosis by oxidant-dependent mechanism. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003; 284(3):F455
- (36) Recchioni R, Marcheselli F, Moroni F, Pieri C. Apoptosis in human aortic endothelial cells induced by hyperglycemic condition involves mitochondrial depolarization and is prevented by N-acetyl-L-cysteine. *Metabolism* 2002; 51(11):1384-1388.

- (37) Peiro C, Lafuente N, Matesanz N, Cercas E, Llergo JL, Vallejo S et al. High glucose induces cell death of cultured human aortic smooth muscle cells through the formation of hydrogen peroxide. *Br J Pharmacol* 2001; 133(7):967-974.
- (38) Fiordaliso F, Leri A, Cesselli D, Limana F, Safai B, Nadal-Ginard B et al. Hyperglycemia activates p53 and p53-regulated genes leading to myocyte cell death. *Diabetes* 2001; 50(10):2363-2375.
- (39) Lee I, Wang L, Wells AD, Ye Q, Han R, Dorf ME et al. Blocking the monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 chemokine pathway induces permanent survival of islet allografts through a programmed death-1 ligand-1-dependent mechanism. *J Immunol* 2003; 171(12):6929-6935.
- (40) Herder C, Haastert B, Muller-Scholze S, Koenig W, Thorand B, Holle R et al. Association of systemic chemokine concentrations with impaired glucose tolerance and type 2 diabetes: results from the Cooperative Health Research in the Region of Augsburg Survey S4 (KORA S4). *Diabetes* 2005; 54 Suppl 2:S11-S17.
- (41) Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2001; 2(2):108-115.
- (42) Lee I, Wang L, Wells AD, Ye Q, Han R, Dorf ME et al. Blocking the monocyte chemoattractant protein-1/CCR2 chemokine pathway induces permanent survival of islet allografts through a programmed death-1 ligand-1-dependent mechanism. *J Immunol* 2003; 171(12):6929-6935.
- (43) Gavrillin MA, Gulina IV, Kawano T, Dragan S, Chakravarti L, Kolattukudy PE. Site-directed mutagenesis of CCR2 identified amino acid residues in transmembrane helices 1, 2, and 7 important for MCP-1 binding and biological functions. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 327(2):533-540.
- (44) Homey B, Muller A, Zlotnik A. Chemokines: agents for the immunotherapy of cancer? *Nat Rev Immunol* 2002; 2(3):175-184.
- (45) Xu LL, Warren MK, Rose WL, Gong W, Wang JM. Human recombinant monocyte chemotactic protein and other C-C chemokines bind and induce directional migration of dendritic cells in vitro. *J Leukoc Biol* 1996; 60(3):365-371.
- (46) Yoshimura T, Yuhki N, Moore SK, Appella E, Lerman MI, Leonard EJ. Human monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1). Full-length cDNA cloning, expression in mitogen-stimulated blood mononuclear leukocytes, and sequence similarity to mouse competence gene JE. *FEBS Lett* 1989; 244(2):487-493.
- (47) Fantuzzi L, Spadaro F, Vallanti G, Canini I, Ramoni C, Vicenzi E et al. Endogenous CCL2 (monocyte chemotactic protein-1) modulates human immunodeficiency virus type-1 replication and affects cytoskeleton organization in human monocyte-derived macrophages. *Blood* 2003; 102(7):2334.
- (48) Guilherme A, Virbasius JV, Puri V, Czech MP. Adipocyte dysfunctions linking obesity to insulin resistance and type 2 diabetes. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9(5):367-377.
- (49) Curat CA, Miranville A, Sengenès C, Diehl M, Tonus C, Busse R et al. From blood monocytes to adipose tissue-resident macrophages: induction of diapedesis by human mature adipocytes. *Diabetes* 2004; 53(5):1285-1292.
- (50) Kelley DE, Mokan M, Simoneau JA, Mandarino LJ. Interaction between glucose and free fatty acid metabolism in human skeletal muscle. *J Clin Invest* 1993; 92(1):91-98.
- (51) Sartipy P, Loskutoff DJ. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(12):7265-7270.
- (52) Yamagishi S, Inagaki Y, Okamoto T, Amano S, Koga K, Takeuchi M et al. Advanced glycation end product-induced apoptosis and overexpression of vascular endothelial growth factor

and monocyte chemoattractant protein-1 in human-cultured mesangial cells. *J Biol Chem* 2002; 277(23):20309-20315.

- (53) Marisa C, Lucci I, Di GC, Bianchi G, Grilli A, Patrino A et al. MCP-1 and MIP-2 expression and production in BB diabetic rat: effect of chronic hypoxia. *Mol Cell Biochem* 2005; 276(1-2):105-111
- (54) Ruster C, Wolf G. The role of chemokines and chemokine receptors in diabetic nephropathy. *Front Biosci* 2008; 13:944-955.
- (55) Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000; 407(6805):770-776.
- (56) Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* 2005; 4(2):139-163.
- (57) Krammer PH, Arnold R, Lavrik IN. Life and death in peripheral T cells. *Nat Rev Immunol* 2007; 7(7):532-
- (58) Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 2000; 407(6805):789-795.
- (59) Kukhta VK, Marozkina NV, Sokolchik IG, Bogaturova EV. Molecular mechanisms of apoptosis. *Ukr Biokhim Zh* 2003; 75(6):5-9.
- (60) Porter BO, Malek TR. Prostaglandin E2 inhibits T cell activation-induced apoptosis and Fas-mediated cellular cytotoxicity by blockade of Fas-ligand induction. *Eur J Immunol* 1999; 29(7):2360-2365.
- (61) Newton K, Kurts C, Harris AW, Strasser A. Effects of a dominant interfering mutant of FADD on signal transduction in activated T cells. *Curr Biol* 2001; 11(4):273-276.
- (62) Radziszewska A, Schroer SA, Choi D, Tajmir P, Radulovich N, Ho JC et al. Absence of Caspase-3 Protects Pancreatic β -Cells from c-Myc-induced Apoptosis without Leading to Tumor Formation. *J Biol Chem* 2009; 284(16):10947-10956.
- (63) Kim HS, Kim S, Lee MS. IFN- γ sensitizes MIN6N8 insulinoma cells to TNF- α -induced apoptosis by inhibiting NF- κ B-mediated XIAP upregulation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 336(3):847-853.
- (64) Otton R, Soriano FG, Verlengia R, Curi R. Diabetes induces apoptosis in lymphocytes. *J Endocrinol* 2004; 182(1):145-156.
- (65) Meng L, Cui L. Inhibitory effects of crocetin on high glucose-induced apoptosis in cultured human umbilical vein endothelial cells and its mechanism. *Arch Pharm Res* 2008; 31(3):357-363.
- (66) Eastman S, Markholst H, Wilson D, Lernmark A. Leukocytosis at the onset of diabetes in crosses of inbred BB rats. *Diabetes Res Clin Pract* 1991; 12(2):113-123.
- (67) Flood RG, Chiang VW. Rate and prediction of infection in children with diabetic ketoacidosis. *Am J Emerg Med* 2001; 19(4):270-273.
- (68) Lavabre-Bertrand T, Bourquard P, Chiesa J, Bertheas MF, Lefort G, Taib J et al. Diabetes insipidus revealing acute myelogenous leukaemia with a high platelet count, monosomy 7 and abnormalities of chromosome 3: a new entity? *Eur J Haematol* 2001; 66(1):66-69.
- (69) Pallavicini MG, Nichols WK. Inhibition of lymphocyte blastogenesis by factor(s) in alloxan-diabetic rat plasma. *Diabetes* 1976; 25(7):614-622.
- (70) Yokono K, Kawase Y, Nagata M, Hatamori N, Baba S. Suppression of concanavalin A-induced responses in splenic lymphocytes by activated macrophages in the non-obese diabetic mouse. *Diabetologia* 1989; 32(1):67-73.
- (71) Rayfield EJ, Ault MJ, Keusch GT, Brothers MJ, Nechemias C, Smith H. Infection and diabetes: the case for glucose control. *Am J Med* 1982; 72(3):439-450.

- (72) Reinhold D, Ansorge S, Schleicher ED. Elevated glucose levels stimulate transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1), suppress interleukin IL-2, IL-6 and IL-10 production and DNA synthesis in peripheral blood mononuclear cells. *Horm Metab Res* 1996; 28(6):267-270.
- (73) Otton R, Soriano FG, Verlengia R, Curi R. Diabetes induces apoptosis in lymphocytes. *J Endocrinol* 2004; 182(1):145-156.
- (74) Margarita Esquer-Mendivil. Determinación de apoptosis en células de sangre periférica y su correlación clínica en pacientes diabéticos tipo 2 con infecciones en tejidos blandos. Escuela Superior de Medicina, Instituto Politecnico Nacional, 2009.
- (75) Maedler K, Spinass GA, Lehmann R, Sergeev P, Weber M, Fontana A et al. Glucose induces beta-cell apoptosis via upregulation of the Fas receptor in human islets. *Diabetes* 2001; 50(8):1683-1690.
- (76) Yamada K, Ichikawa F, Ishiyama-Shigemoto S, Yuan X, Nonaka K. Essential role of caspase-3 in apoptosis of mouse beta-cells transfected with human Fas. *Diabetes* 1999; 48(3):478-483.
- (77) Woo M, Hakem R, Mak TW. Executionary pathway for apoptosis: lessons from mutant mice. *Cell Res* 2000; 10(4):267-278.
- (78) Porter AG, Janicke RU. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 1999; 6(2):99-104.
- (79) Hatanaka E, Monteagudo PT, Marrocos MS, Campa A. Neutrophils and monocytes as potentially important sources of proinflammatory cytokines in diabetes. *Clin Exp Immunol* 2006; 146(3):443
- (80) Esquer Mendivil M, Vega P, Mario I. Determinación de apoptosis en células de sangre periférica en pacientes diabéticos tipo 2 con infecciones en tejidos blandos. UIMM CMN "La Raza", IMSS, 2007.
- (81) McQuibban GA, Gong JH, Tam EM, McCulloch CA, Clark-Lewis I, Overall CM. Inflammation dampened by gelatinase A cleavage of monocyte chemoattractant protein-3. *Science* 2000; 289(5482):1202-1206.
- (82) Charo IF, Peters W. Chemokine receptor 2 (CCR2) in atherosclerosis, infectious diseases, and regulation of T-cell polarization. *Microcirculation* 2003; 10(3-4):259-264.
- (83) Weisberg SP, Hunter D, Huber R, Lemieux J, Slaymaker S, Vaddi K et al. CCR2 modulates inflammatory and metabolic effects of high-fat feeding. *J Clin Invest* 2006; 116(1):115-124.
- (84) Blaha V, Andrys C, Smahelova A, Knizek J, Hyspler R, Solichova D et al. Effect of atorvastatin on soluble CD14, CD40 Ligand, sE- and sP-selectins and MCP-1 in patients with type 2 diabetes mellitus: relationship to cholesterol turnover. *Pharmacol Res* 2006; 54(6):421-428.
- (85) Mine S, Okada Y, Tanikawa T, Kawahara C, Tabata T, Tanaka Y. Increased expression levels of monocyte CCR2 and monocyte chemoattractant protein-1 in patients with diabetes mellitus. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 344(3):780-785.
- (86) Ihm CG, Park JK, Hong SP, Lee TW, Cho BS, Kim MJ et al. A high glucose concentration stimulates the expression of monocyte chemotactic peptide 1 in human mesangial cells. *Nephron* 1998; 79(1):33-37.
- (87) Zhou L, Azfer A, Niu J, Graham S, Choudhury M, Adamski FM et al. Monocyte chemoattractant protein-1 induces a novel transcription factor that causes cardiac myocyte apoptosis and ventricular dysfunction. *Circ Res* 2006; 98(9):1177-1185.
- (88) Sartipy P, Loskutoff DJ. Monocyte chemoattractant protein 1 in obesity and insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(12):7265-7270.