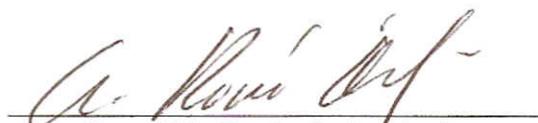
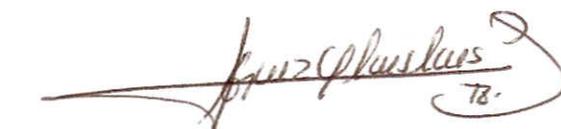


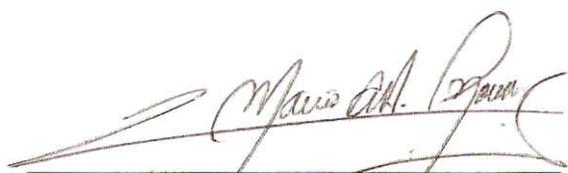
Los integrantes del jurado, designados por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, aprobaron la presente tesis el día 28 de junio del 2002.

  
Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz  
**PRESIDENTE**

  
M. en Biol. Exp. Edith Cortés Barberena  
**SECRETARIO**

  
Dr. José Luis Gómez Olivares  
**VOCAL**

  
Dr. Miguel Betancourt Rule  
**VOCAL**

  
Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano  
**VOCAL**



**Universidad Autónoma Metropolitana**

*Unidad Iztapalapa*

*División de Ciencias Biológicas y de la Salud*

---

**ESTUDIO DEL PROCESO DE  
APOPTOSIS EN CÉLULAS DE RATA  
DESNUTRIDA EXPERIMENTALMENTE  
DURANTE LA LACTANCIA**

**T E S I S**

Que para obtener el grado de:  
**MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**P R E S E N T A**

**Biol. Exp. Higinio Estrada Juárez**

TUTOR:

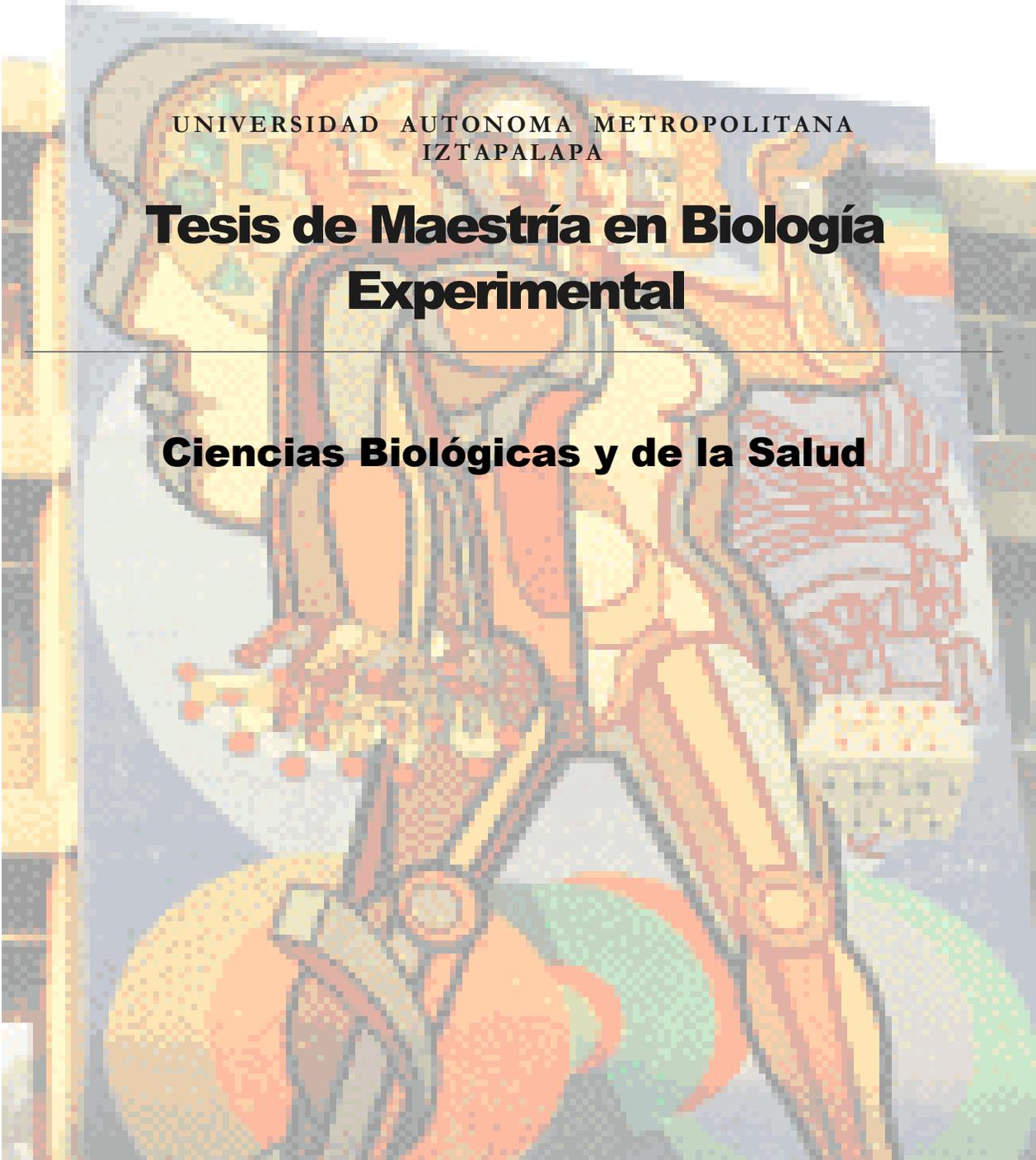
**Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz.**

ASESORES:

**Dr. José Luis Gómez Olivares  
M. en Biol. Exp. Edith Cortés Barberena**

MEXICO, D. F.

JUNIO DE 2002



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA  
IZTAPALAPA

# **Tesis de Maestría en Biología Experimental**

**Ciencias Biológicas y de la Salud**

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa  
Av. San Rafael Atlixco # 186 Col. Vicentina C. P. 09340.  
México, D. F

**LA MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL DE LA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA -  
IZTAPALAPA SE ENCUENTRA DENTRO DEL PADRÓN DE  
EXCELENCIA DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y  
TEGNOLOGÍA SEGÚN EL CONVENIO 309-0**

**AGRADEZCO AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y  
TEGNOLOGÍA LA BECA PRESTAMO OTORGADA CON EL  
NÚMERO 153494**

**ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LABORATORIO DE  
BIOLOGÍA CELULAR Y CITOMETRÍA DE FLUJO, DEL  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA  
SALUD, EN LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
METROPOLITANA - IZTAPALAPA DENTRO DEL  
PROYECTO APOYADO POR FOMES No. 98-35-28**

# AGRADECIMIENTOS

---

A la Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz por sus comentarios en la dirección de esta tesis, pero más aún por su apoyo incondicional a lo largo de mi estancia en el Laboratorio de Biología Celular y Citometría de flujo.

Al Dr. José Luis Gómez Olivares por su preocupación y dedicación en la elaboración de este trabajo, y que dejó de ser mi asesor para convertirse en un amigo

A la M. en Biol. Exp. Edith Cortés Barberena por su paciencia, pero sobre todo su interés en la realización de este trabajo

Al Dr. Miguel Betancourt Rule por sus apreciable asesoría y comentarios que hicieron de éste un mejor trabajo

Al Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano por su apoyo y comprensión en la revisión de este trabajo

A La M. V. Z. Rocío González Vieyra y a todo el personal del Bioterio de la UAM-Iztapalapa por proporcionarme el material biológico indispensable para la elaboración del presente estudio

A la Biol. Exp. Leticia Cortés por la valiosa enseñanza de las técnicas usadas en este trabajo

A Lupita Sandoval por el valioso cuidado que tuvo de los animales de laboratorio, pero sobre todo por su buen humor que siempre hizo agradable el trabajo

A la M. en C. Leonor Rodríguez y todos mis compañeros del Laboratorio de Biología celular y Citometría de flujo por permitirme compartir con ellos no solo las instalaciones, sino también gratos momentos

A la Dra. Laura Pérez Flores, al M. en C Fernando Díaz de León y a todos lo chicos del Laboratorio de Bioquímica y Fisiología Vegetal por su desinteresado apoyo, y adoptarme como parte de su equipo

# DEDICATORIAS

---

*A Dios por permitirme concluir otro ciclo*

*A mis Padres Higinio y Lupita  
que me dieron el más grande regalo  
y que con su cariño y ejemplo  
me enseñaron a superar cualquier obstáculo*

*A mi Betty por su amor y paciencia  
que me alienta a seguir siempre adelante*

*A Monse por ser la chispa  
que alegra mi vida*

*A Mony, Alex y la peque Ale  
por su cariño y apoyo*

*A mis suegros Don Salo y Doña Tete  
por darme un buen motivo para vivir*

*A Quique y Mimi  
por su cariño sincero*

*A mis Abuelitos, pero en especial a Don José  
por ser la estrella que nos cuida desde el cielo*

*A toda mi familia  
que siempre ha creído en mí*

*A todas aquellas personas  
que me apoyaron y brindaron su amistad*

*A todas las personas que dudaron de mí,  
porque me enseñaron a alcanzar mis sueños*

*A todos ... **LOS AMO***

# RESUMEN

---

Se calcula que aproximadamente 4 millones de niños en América Latina están desnutridos, en ellos los efectos pueden ser particularmente devastadores, esto podría asociarse a las mayores exigencias nutricionales en las etapas tempranas del desarrollo en donde el crecimiento corporal es acelerado. La desnutrición provoca alteraciones a nivel celular como la formación de micronúcleos e intercambio de cromátidas hermanas, además se le asocia con la presencia de enfermedades infecciosas, debidas a alteraciones en el sistema inmune, posiblemente por una deficiencia en la densidad de células precursoras originadas en médula ósea o a una selección alterada en los órganos de maduración y diferenciación (timo y bazo) y a una menor densidad de células efectoras o bien una mayor cantidad de células represoras en sangre.

La apoptosis es un proceso tan ordenado que frecuentemente es llamada muerte celular programada. La célula recibe una señal que induce la muerte. Uno de los primeros eventos es la translocación de la fosfatidil serina hacia la monocapa externa, éste punto puede considerarse como un fenómeno proapoptótico, sin embargo, se pueden desencadenar procesos para revertir algunas respuestas asociadas con éste, un punto intermedio que marca la irreversibilidad del proceso es la expresión de bcl-2 y la liberación de citocromo c debidos a la desestabilización de la membrana mitocondrial; hacia el final del proceso se lleva a cabo la fragmentación de ADN por cortes intranucleosomales. Dentro de los factores inductores de la apoptosis se encuentran: los glucocorticoides, los virus, los agentes físicos y químicos y la falta de factores tróficos.

Los objetivos del presente trabajo fueron Detectar el efecto de la dexametasona (DEX) y la desnutrición sobre la inducción *in vitro* de apoptosis en células de bazo, timo y sangre de ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia, así como, estudiar algunos aspectos de la apoptosis *in vitro* en los tipos celulares mencionados por medio de citometría de flujo.

Se utilizaron ratas de la cepa Wistar a las que se les indujo la desnutrición por competencia alimenticia. La sangre se extrajo por punción cardiaca y se disectó el bazo y el timo. Se hicieron cultivos primarios de 72h. Transcurrido el tiempo de incubación se determinó la frecuencia de células en apoptosis por medio del marcaje simultáneo de Yoduro de propidio y Anexina-V asociada con FITC, además se determinó la frecuencia apoptótica tardía por medio del ensayo comercial de muerte celular *in situ*. Se utilizó un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, San Jose, CA) equipado con un láser de Argón (488nm), y los datos se adquirieron y analizaron con el software CELL Quest.

El modelo de señales duales mencionado en este trabajo, proporciona una idea clara del efecto que tiene un mitógeno y un inductor de la apoptosis sobre las células más diferenciadas, que al ser estimuladas para proliferar presentaron cambios drásticos en las proporciones de viabilidad.

Dentro del timo y bazo existe un micro ambiente que protege a las células, esto se comprobó al exponerlas a diferentes tratamientos, donde las menos diferenciadas fueron más sensibles a cambios.

Se observó que las células pueden presentar una fase de pre apoptosis, y que la capacidad intrínseca de las células para reparar los daños esta en relación directa a su grado de diferenciación. Al parecer se activa un proceso de reparación del daño, sin embargo, esto no implica que se restablezca la funcionalidad de la célula. La desnutrición provoca alteraciones genéticas en los linfocitos, teniendo como consecuencia un incremento en la frecuencia de muerte celular, esto explicaría la respuesta deficiente del sistema linfoide ante la presencia de enfermedades infecciosas.

Los resultados apoyan la idea de que la desnutrición inducida durante la lactancia tiene un fuerte impacto en el sistema inmune de las ratas, lo que causa cambios dramáticos en la respuesta normal de las células inmunológicas.

# ABREVIATURAS

---

<b>Ac</b>	Anticuerpo	<b>GR</b>	Receptor de granulocitos
<b>AcMo</b>	Anticuerpos monoclonales	<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>IL</b>	Interleucina
<b>Ag</b>	Antígeno	<b>L</b>	Litro
<b>AG</b>	Aparato de Golgi	<b>M</b>	Molar
<b>APC</b>	Células presentadoras de antígenos	<b>MALT</b>	Tejidos linfoides asociados a mucosas
<b>Asp</b>	Ácido aspártico	<b>MCP</b>	Muerte celular programada
<b>BCR</b>	Receptor de células B	<b>MEK</b>	Cinasa estimulada por mitógenos
<b>BN</b>	Bien nutridas	<b>MHC</b>	Complejo mayor de histocompatibilidad
<b>CD</b>	Grupo de diferenciación	<b>PALS</b>	Manguito linfoide periarteriolar
<b>cdk</b>	quinasas dependientes de ciclinas	<b>PBS</b>	Amortiguador de sales de fosfato
<b>Cit. C</b>	Citocromo c	<b>PE</b>	Ficoeritrina
<b>CSF</b>	Estimulador de formación de colonias	<b>PHA</b>	Fitohemaglutinina
<b>CTL</b>	Linfocito C citotóxico	<b>PI</b>	Yoduro de propidio
<b>DCP</b>	Desnutrición calórico proteínica	<b>PS</b>	Fosfatidil serina
<b>DEX</b>	Dexametasona	<b>RER</b>	Retículo endoplásmico rugoso
<b>DN</b>	Desnutridas	<b>SNC</b>	Sistema nervioso central
<b>ELISA</b>	Ensayo inmuno - absorbente de unión enzimática	<b>SSA</b>	Secretaría de salud y asistencia
<b>EPO</b>	Eritropoyetina	<b>TCR</b>	Receptor de células T (TCR)
<b>ERK</b>	Cinasa regulada por señales extracelulares	<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>FAO</b>	Organización de alimentación y agricultura	<b>TNF</b>	Factor de necrosis tumoral
<b>FITC</b>	Isotiocinato de fluoresceína	<b>TUNEL</b>	Marcaje de los extremos por dUTP mediado por la desoxinucleotidil transferasa terminal
<b>g</b>	Gramo	<b>UNICEF</b>	Fondo de las naciones unidas para la infancia
<b>GC</b>	Glucocorticoides		
<b>GM-CSF</b>	Factor estimulador estimulador de la línea granulocito-macrófago		

# TABLA DE CONTENIDO

---

<b>RESUMEN</b> .....	<b>i</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>iii</b>
<b>1. DESNUTRICIÓN: UNA ENFERMEDAD SOCIOECONÓMICA</b> .....	<b>1</b>
1.1. NIVELES DE LA DESNUTRICIÓN .....	4
1.2. MODELOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN PARA EL ESTUDIO DE LA DESNUTRICIÓN .....	6
<b>2. APOPTOSIS: UN PROCESO DE MUERTE NECESARIO PARA LA VIDA</b> .....	<b>8</b>
2.1. DEFINICIÓN .....	8
2.2. MECANISMOS DE LA APOPTÓTICOS .....	9
2.3. INDUCCIÓN DE LA APOPTOSIS.....	11
2.4. AGENTES INDUCTORES DE LA APOPTOSIS .....	13
2.4.1. Glucocorticoides .....	14
2.4.1.1. La influencia de los glucocorticoides sobre la apoptosis y proliferación celular .....	15
2.4.1.2. La dexametasona .....	15
2.5. EQUILIBRIO ENTRE PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS .....	16
2.5.1. Proliferación inducida por fitohemaglutinina .....	17
<b>3. INMUNOLOGÍA</b> .....	<b>19</b>
3.1. SISTEMA LINFOIDE .....	20
3.1.1. Órganos linfoides primarios.....	21
3.1.1.1. Timo .....	21
3.1.2. Órganos linfoides secundarios .....	23
3.1.2.1. Sistema linfático y ganglios linfáticos .....	24
3.1.2.2. Bazo.....	25
3.2. HEMATOPOYESIS.....	26
3.2.1. Factores hematopoyéticos de crecimiento .....	27
3.2.1.1. Regulación de la hematopoyesis .....	27
3.3. MARCADORES DE SUPERFICIE DE LEUCOCITOS.....	28
3.4. CÉLULAS LINFOIDES .....	29
3.4.1. Linfocitos B .....	31
3.4.1.1. Linfocitos T.....	32
3.4.1.2. Células T cooperadoras .....	32
3.4.1.3. Células T supresoras/citotóxicas .....	33
<b>4. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>34</b>
<b>5. HIPÓTESIS:</b> .....	<b>36</b>
<b>6. OBJETIVOS GENERALES</b> .....	<b>37</b>

6.1. OBJETIVOS PARTICULARES .....	37
<b>7. METODOLOGÍA .....</b>	<b>38</b>
7.1. ANIMALES.....	38
7.2. DESNUTRICIÓN EXPERIMENTAL.....	38
7.3. CULTIVO .....	39
7.4. MARCAJE POR ANEXINA -V.....	39
7.5. MARCAJE DE LAS ZONAS DE RUPTURA DE LA CADENA DE ADN (TUNEL).....	41
7.6. MARCAJE DE CÉLULAS CON ANTICUERPOS DE SUPERFICIE .....	42
7.7. CITOMETRÍA DE FLUJO.....	43
7.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	44
7.9. ESQUEMA GENERAL DEL CULTIVO DE CÉLULAS DE BAZO, TIMO Y SANGRE .....	45
<b>8. RESULTADOS .....</b>	<b>46</b>
8.1. PESO DE LAS RATAS.....	46
8.2. PESO DE LOS ÓRGANOS .....	47
8.3. VIABILIDAD EN LAS CÉLULAS DE TIMO, BAZO Y SANGRE, SIN TRATAMIENTO DESPUÉS DE 72H. DE CULTIVO .....	47
8.4. DETERMINACIÓN DE LOS FENOTIPOS CELULARES PRESENTES EN TEJIDOS DE RATA.....	48
8.5. DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS DE TIMO POR MEDIO DE ANEXINA- V /IP .....	50
8.6. DETERMINACIÓN DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR DEX Y/O DESNUTRICIÓN EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES CELULARES EN TIMO, DETERMINADA POR MEDIO DE ANEXINA-V/IP .....	52
8.7. DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS DE TIMO, POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE TUNEL.....	53
8.8. DETERMINACIÓN DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR DEX Y/O DESNUTRICIÓN EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES CELULARES EN TIMO, DETERMINADA POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE TUNEL.....	55
8.9. DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS DE BAZO POR MEDIO DE ANEXINA- V /IP .....	56
8.10. DETERMINACIÓN DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR DEX Y / O DESNUTRICIÓN EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES CELULARES EN BAZO, DETERMINADA POR MEDIO DE ANEXINA-V/IP .....	58
8.11. DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS DE BAZO, POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE TUNEL.....	59
8.12. DETERMINACIÓN DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR DEX Y / O DESNUTRICIÓN EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES CELULARES EN BAZO, DETERMINADA POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE TUNEL.....	61
8.13. DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS DE SANGRE POR MEDIO DE ANEXINA- V /IP .....	62

8.14. DETERMINACIÓN DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR DEX Y/O DESNUTRICIÓN EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES CELULARES EN SANGRE, DETERMINADA POR MEDIO DE ANEXINA-V/IP .....	63
8.15. DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS DE SANGRE, POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE TUNEL.....	64
8.16. DETERMINACIÓN DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR DEX Y / O DESNUTRICIÓN EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES CELULARES EN SANGRE, DETERMINADA POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE TUNEL.....	66
<b>9. DISCUSIÓN .....</b>	<b>67</b>
9.1. DESNUTRICIÓN EXPERIMENTAL.....	68
9.2. APOPTOSIS ESPONTANEA EN LOS DIFERENTES FENOTIPOS CELULARES.....	69
9.3. APOPTOSIS .....	71
9.4. APOPTOSIS INDUCIDA EN LOS DIFERENTES FENOTIPOS CELULARES .....	75
9.5. CONSIDERACIONES FINALES .....	78
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>80</b>
<b>11. ANEXO I.....</b>	<b>90</b>

## DESNUTRICIÓN: UNA ENFERMEDAD SOCIOECONÓMICA

*La desnutrición es la consecuencia de una deficiente ingestión y/o utilización de dietas con bajo contenido de nutrientes principalmente proteínas, que afecta a una elevada proporción de la población infantil a nivel mundial*

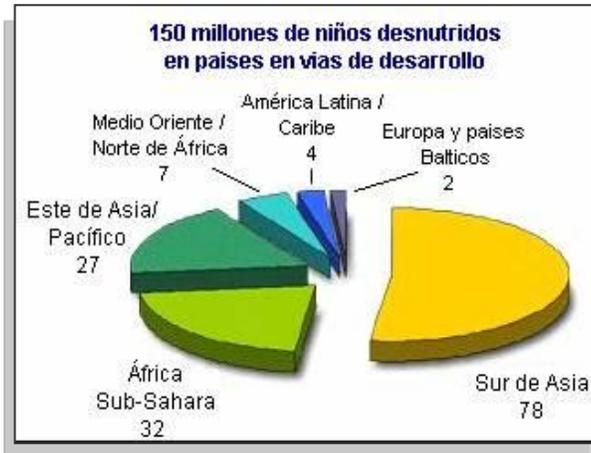
**L**a desnutrición es sin duda un grave problema a escala mundial, la Organización de Alimentación y Agricultura (FAO por sus siglas en inglés) estimó en 1996, que 150 millones de niños en el planeta sufren de algún tipo de desnutrición (Figura 1). Este padecimiento es una de las primeras cinco causas de mortalidad en los países en vías de desarrollo, donde afecta a un quinto de los menores de 5 años. En nuestro país se ha observado que 12% de los niños nacen con bajo peso y un 14% de los niños menores de 5 años presenta desnutrición aguda de tipo moderado a severo, y el 22% desnutrición crónica (FAO, 1996).

---

*A pesar que las estadísticas muestran una disminución en la desnutrición infantil en México, continúa siendo un grave problema de salud pública*

---

Factores como la pobreza, el desempleo y la ignorancia influyen en el aumento pronunciado de este padecimiento (Ortiz, y col., 1999), mismo que es la consecuencia de una deficiente ingestión y/o utilización de dietas con bajo contenido de nutrientes principalmente proteínas. Los niños son más susceptibles a esta enfermedad, en ellos los efectos pueden ser devastadores, debido a su crecimiento corporal acelerado dadas las exigencias nutritivas en esta etapa del desarrollo. Lo



*Figura 1. Distribución mundial de la desnutrición (UNICEF 2001)*

anterior deja al descubierto el verdadero riesgo que sufre nuestro país. Donde, más de la mitad de los niños del medio rural mexicano están desnutridos. Se ha estimado que la desnutrición en comunidades no indígenas oscila entre 35 y 50% de los niños que aún no cumplen 5 años. En las zonas indígenas afecta entre el 70% y 80% de la población infantil, siendo el sur este del país la zona más afectada. Además existen 10 millones de niños menores de cinco años de los

cuales 4 millones se encuentran con algún grado de desnutrición. (INEGI, 2000)

La desnutrición es una amenaza silenciosa. Pero la crisis es real, y su persistencia tiene implicaciones profundas y aterradoras para los niños, sociedad y el futuro de la humanidad. La desnutrición no es, como muchos piensan, un problema infantil que únicamente se resuelve con satisfacer su apetito. Un niño que come bastante para satisfacer su hambre todavía puede estar desnutrido (Mahaffey, 1995).

Tres cuartas partes de la población infantil mueren de causas relacionadas a la desnutrición (WHO y UNICEF, 1995).

El problema de la desnutrición no es sólo una consecuencia de hambre, guerras y otras catástrofes. Tales eventos son responsables de una parte diminuta de la crisis de desnutrición mundial (Figura 2). Las necesidades alimenticias en estas situaciones son esenciales, pero para que estas personas estén protegidas, es necesario tener en cuenta otros aspectos que puedan estar relacionados con la desnutrición con el fin de brindarles mejores condiciones de vida



*Figura 2 Reducir la desnutrición debe ser una prioridad global urgente; la desnutrición es una ofensa al derecho humano de supervivencia. La fotografía muestra un niño desnutrido con su madre en Afganistán.*

(Mahaffey, 1995, Tomkins y Watson, 1989).

El problema de la desnutrición no solo afecta a los países en vías de desarrollo, sino también hay incidencia en algunos países industrializados en donde se combinan las disparidades del ingreso y deficiencias en protección social, y se presentan efectos preocupantes en el bienestar nutritivo infantil (WHO y UNICEF, 1995).

Siempre se ha reconocido el problema de la desnutrición como consecuencia de pobreza. En algunas partes del mundo, principalmente en América Latina y Este Asiático, se ha reducido dramáticamente la desnutrición infantil. Pero de manera global, el número absoluto de niños desnutridos a nivel mundial ha crecido (WHO y UNICEF, 1995).

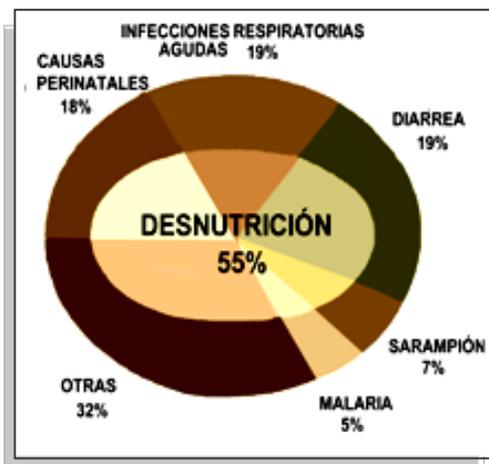
En los niños desnutridos se presenta una alta tasa de mortalidad ocasionada por enfermedades infantiles que no se presenta en condiciones normales.

Algunas investigaciones han propuesto la existencia de un vínculo entre la desnutrición y el desarrollo de condiciones de salud críticas a lo largo de su vida por

ejemplo: enfermedades infecciosas y cardíacas, diabetes e hipertensión, lo que ocasiona que en los países en los que la desnutrición ya es un problema mayor, se genere una nueva causa de preocupación de salud pública (Figura 3) (Tomkins y Watson, 1989).

Los grupos mas vulnerables a sufrir desnutrición son los de los niños de hasta cinco años, mujeres antes y durante el embarazo y mientras están amamantando. La desnutrición infantil afecta aquellos niños, que carecen de dietas adecuadas nutritivamente, y no reciben cuidados adecuados (FAO, 1997).

No existe una causa única que origine la desnutrición. Puede tomar una variedad de formas que a menudo aparecen en combinación e interacción entre si. Por mencionar algunas: la deficiencia en yodo,



*Figura 3. Si un niño presenta desnutrición incluso de segundo grado, el riesgo de mortalidad se incrementa. La OMS estima que la desnutrición esta asociada con más de la mitad de las muertes infantiles que ocurrieron en países en vías de desarrollo en 1995 (OMS, 1995)*

desorden y deficiencia de hierro y vitamina A, por mencionar algunas (WHO y UNICEF, 1995).

La deficiencia de yodo puede dañar capacidad intelectual; la anemia es un factor importante en el embarazo y complicaciones del parto que matan a 585,000 mujeres anualmente. La deficiencia de ácido fólico en mujeres embarazadas puede causar defectos del nacimiento en infantes, como espina bífida. Mientras, la deficiencia de vitamina D puede llevar a la formación pobre de huesos, incluso raquitismo (FAO, 1996).

---

## 1.1. NIVELES DE LA DESNUTRICIÓN

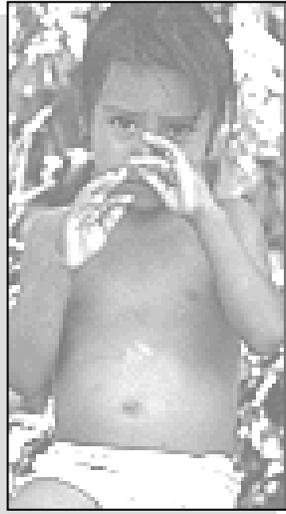


*Figura 4. Niño africano con desnutrición grave tipo marasmo. En México esta forma se observa principalmente en niños de zonas rurales*

En cuanto a clasificaciones de la enfermedad, actualmente se tiende a aceptar términos como "desnutrición", "subnutrición" o "hiponutrición" para referirse al cuadro clínico producido por la disminución crónica del aporte general de nutrientes, así como, las pérdidas excesivas de éstos. En función del tiempo, existe pérdida de la relación de peso contra la edad, reflejándose en un retardo en el crecimiento. En una proporción menor (2%), alcanza cuadros avanzados observándose: pérdida de peso, deterioro muscular, alteraciones de la piel, este cuadro se le denomina desnutrición calórico-proteica.

Sin embargo, en algunos casos de desnutrición severa, es posible distinguir dos cuadros clínicos muy bien definidos si la deficiencia es calórico-proteínica (marasmo) (Figura 4) o si el déficit es sólo proteico (kwashiorkor) (Figura 5) (Howard, y col., 95).

El marasmo es una enfermedad crónica, mientras que el kwashiorkor es relativamente aguda. El niño sometido a una dieta hipocalórica e hipoproteínica llega a una situación de marasmo que, si está libre de infecciones, puede durar meses o años. Sugiriendo, una especie de adaptación por parte del niño. En este cuadro clínico del marasmo se presenta en el primer o segundo año, aunque puede aparecer también en edades más



*Figura 5. La desnutrición tipo kwashiorkor es la forma más común en los niños de zonas urbanas de nuestro país*

avanzadas. Se caracteriza por un gran enflaquecimiento, alcanzando una pérdida corporal al 40 por ciento o más en relación con su edad cronológica. En cambio el niño que estuvo sometido exclusivamente a una dieta hipoproteínica y normocalórica, en menos de veinte días desencadena toda la sintomatología propia del kwashiorkor (Howard, y col., 1995).

En los estados más avanzados, el lactante adquiere cara de viejo, la piel aparece arrugada, de color pálido grisáceo y seca. Además, la piel puede parecer delgada y brillante y hasta con ulceraciones que se infectan y son

difíciles de mejorar. Por lo general, el niño se muestra irritable e intranquilo, o apático y somnoliento, y muestra gran tendencia a succionarse los dedos.

Es habitual el llanto débil y actitud monótona, el pulso cardiaco es muchas veces difícil de apreciar por su escasa tensión y puede hacerse fácilmente irregular. En

el marasmo, las infecciones son muy comunes y contribuyen a agravar la desnutrición, siendo casi siempre la causa de muerte. Por otra parte, el Kwashiorkor es más frecuente en lactantes y preescolares. Se origina principalmente por una dieta deficiente en proteínas (Howard, y col., 1995, WHO y UNICEF, 1995). Además los infantes se muestran indiferentes a los estímulos del mundo externo. Su estado físico es característico: alteraciones del cabello y la resequedad de la piel. En cuanto al sistema circulatorio presentan: hipotensión, disminución de la frecuencia cardiaca y tiempo de circulación prolongado, generalmente existe edema, anemia, y alteraciones digestivas, como diarrea, vómitos e inapetencia. La Secretaría de Salud (SSA) (SSA e INEGI, 1999) ha sugerido que ésta enfermedad se puede prevenir con una buena alimentación, la que debe ser suficiente (cubrir las necesidades nutricionales), equilibrada (aportar proporciones adecuadas de nutrientes), variada (incluir diversos tipos de alimentos) y libre de riesgos ecológicos (desprovista de sustancias que en forma natural o agregada impliquen riesgo para el organismo). Al respecto, se ha recomendado una dieta que incluya los cinco grupos de alimentos: lácteos y sus derivados (que aportan calcio y vitaminas A y D); carnes, legumbres y huevo (que aportan proteínas y algunas vitaminas); harinas y cereales (energía y

algunas vitaminas); frutas y hortalizas (vitaminas y fibra); y, en menor medida, grasas, aceite y azúcar (aportan básicamente energía). Sin embargo, tanto la SSA como de otros organismos que trabajan en la problemática reconocen que todas las recomendaciones quedan supeditadas a las posibilidades económicas de las familias (SSA e INEGI, 1999).

Cada tipo de desnutrición es el resultado de una compleja interacción de factores que involucran elementos como: el cuidado maternal, disponibilidad de agua potable y condiciones de higiene adecuadas y acceso a los servicios de salud básicos, además cada uno origina su propio tipo particular de estrago en el cuerpo humano (FAO, 1997). La desnutrición se ha clasificado en tres grados según Cravioto y Vega-Franco (1995), basándose en diferentes conceptos, entre los que se contemplan principalmente la deficiencia de peso, talla o la relación entre éstas (Figura 6), en relación a lo esperado para la edad cronológica del organismo, de esta manera se tiene:

1. Desnutrición de primer grado (Leve): cuando se presenta un déficit corporal entre el 10% y 24%
2. Desnutrición de segundo grado (Moderada): frecuentemente requiere hospitalización ya que es más marcada que la anterior, comprende un déficit corporal entre el 25% y 39%
3. Desnutrición de tercer grado (Severa): en este caso casi se han agotado las reservas, observándose un déficit corporal mayor al 40% del promedio de su edad en el caso de tipo marasmo; en los niños con desnutrición tipo kwashiorkor, el déficit es menor ya que presentan edema.

## **1.2. MODELOS ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN PARA EL ESTUDIO DE LA DESNUTRICIÓN**

Los modelos animales han sido de gran utilidad en el estudio de los efectos causados por la desnutrición, los más comúnmente usados han sido ratas y ratones. Su aplicación abarca varios campos del conocimiento científico; como el bioquímico (Skulman, y col., 1994), celular (Gómez, y col., 1996), inmunológico (Feledi, y col., 1993), citogenética (Ortiz, y Betancourt, 1990; Ortiz, y col., 1995), conductual y neurológico (Cintra, y col., 1994).



*Figura 6. Diferencias en peso y talla entre ratas bien y desnutridas de 21 días de edad*

La duración del periodo de vida de los animales ha permitido realizar estudios sobre las anomalías que provoca la desnutrición en distintas etapas de la vida, desde la edad embrionaria hasta la vejez. Se ha establecido que la etapa de lactancia, es el período crítico en el crecimiento y desarrollo del organismo, y que las alteraciones producidas por la escasez de nutrimentos son más graves e irreversibles que las observadas en organismos adultos. Como se muestra en la Figura 6 hay diferencias físicas entre una rata bien

nutrida y otra desnutrida de 21 días de edad (Cortés, 1997).

Para inducir experimentalmente desnutrición durante la lactancia en animales de laboratorio, se han utilizado principalmente dos métodos. Uno está basado en la deficiente calidad del alimento ingerido, en el que las crías son alimentadas por una nodriza desnutrida que produce leche con una calidad deficiente, el otro método, consiste en incrementar el número de crías por nodriza, lo que tiene como consecuencia, que haya una baja ingesta de alimento (Ortiz, y col., 1996; Ortiz, y col., 1999).

## APOPTOSIS: UN PROCESO DE MUERTE NECESARIO PARA LA VIDA

*Para que exista vida es necesaria la muerte, esta regla natural es comúnmente ignorada, si la muerte fuese negativa, por procesos de selección ya se habrían extinto aquellos organismos capaces de morir, quedado sólo las especies que fuesen cada vez más longevas.*

Hace varias décadas los patólogos habían descrito diferentes formas de necrosis celular, (James, 1994). A mediados de la década de 1960 se propuso que aparte de la necrosis existía otro tipo de muerte celular. Los hallazgos de las primeras investigaciones (Farbman, 1968; Kerr, y col., 1972; Kerr, y col., 1972) describieron diferencias intracelulares a las que se observaban en la necrosis y sugirieron la existencia de un mecanismo activo predeterminado, denominando a este proceso como necrosis por contracción o encogimiento



**Apoptosis,** derivado del concepto griego: *Απο* (apo), desde, y *Πτωση* (ptosis), caída o prolapso de un órgano o parte de él.

### 2.1. DEFINICIÓN

La palabra apoptosis fue propuesta por Kerr, Willie y Currie en 1972 (por sugerencia del Prof. Cormack J., del Depto. de letras griegas de la Universidad de Aberdeen). (Kerr, y col., 1972), proviene del griego apoptosis, recordando a las hojas que caen en otoño desde los árboles o a los pétalos que caen desde las flores. Al verse involucrada la célula en el proceso se la ha denominado

“suicidio celular”. Los pasos que la célula sigue en el proceso apoptótico son estereotipados y están genéticamente codificados, por lo que también se le conoce como “muerte celular programada”. A pesar de su importancia en la fisiología y fisiopatología, su estudio se retomó a principios de la década de 1980. (Bennett, y col., 1984; Clouston y Kerr, 1985; Collins, y col., 1989; Dubai, y col., 1985; Sandford, y col., 1984; Stacey, y col., 1985; Walter, y col., 1989; Weedon, y col., 1979) En el Cuadro 22 (Anexo I) se enlistan las diferencias principales entre apoptosis y necrosis.

El número necesario de células en diferentes etapas de la vida requiere de un balance entre mitosis, involución, atrofia, destrucción celular (como en el desarrollo embrionario, el modelado tisular, la renovación celular normal) y apoptosis. Por medio de la apoptosis se eliminan células que han sufrido agresiones en su material genético o mutaciones. A diferencia de la necrosis, la apoptosis no genera respuesta inflamatoria, este tipo de eliminación celular no ocasiona respuestas tisulares significativas. Pero la muerte celular por apoptosis no es siempre un proceso normal en el sentido de ser seguro o beneficioso: depende de qué otros eventos o circunstancias puedan coincidir con ella. (Trump y Berezsky, 1995)

Las modificaciones en la respuesta apoptótica pueden desencadenar diversas patologías. La regulación fisiológica de la muerte celular es esencial para la eliminación de linfocitos hiperactivos durante el desarrollo y para la remoción del exceso celular después de completarse una respuesta inmune. En algunas ocasiones estas alteraciones en la regulación de la apoptosis permiten la supervivencia de linfocitos y es la base de la patogenia de enfermedades autoinmunes. (Ekert y Vaux, 1997; Thatte y Dahanukar, 1997). En los Cuadro 23 y 25 se mencionan las etapas que constituyen la apoptosis y se enumeran algunos agentes inductores apoptóticos (Trump y Berezsky, 1992), (Majno y Joris, 1995).

---

## 2.2. MECANISMOS DE LA APOPTÓTICOS

En este fenómeno, las células presentan una serie de cambios funcionales y bioquímicos (Figura 7) (Ellis, y col., 1991; Majno y Joris, 1995):

- Movimiento transmembranal de la fosfatidil serina
- Aumento del ión de calcio libre
- Interacción Bcl-2/BAX
- Deshidratación celular
- Pérdida del potencial de membrana mitocondrial, con la consiguiente liberación del citocromo c
- Aumento en el índice de proteólisis
- Formación de fragmentos intranucleosomales de 50-300kb
- Puentes cruzados entre las proteínas
- Encogimiento celular
- Desarrollo de algo similar a burbujas en su superficie (coizis)
- Conservación de la cromatina degradada en el núcleo
- Generación de pequeños fragmentos apoptóticos envueltos en membrana
- Eliminación de los cuerpos apoptóticos por receptores en las células fagocíticas (macrófagos y células dendríticas) que engloban los fragmentos celulares
- Secreción de citocinas por parte de las células fagocitarias

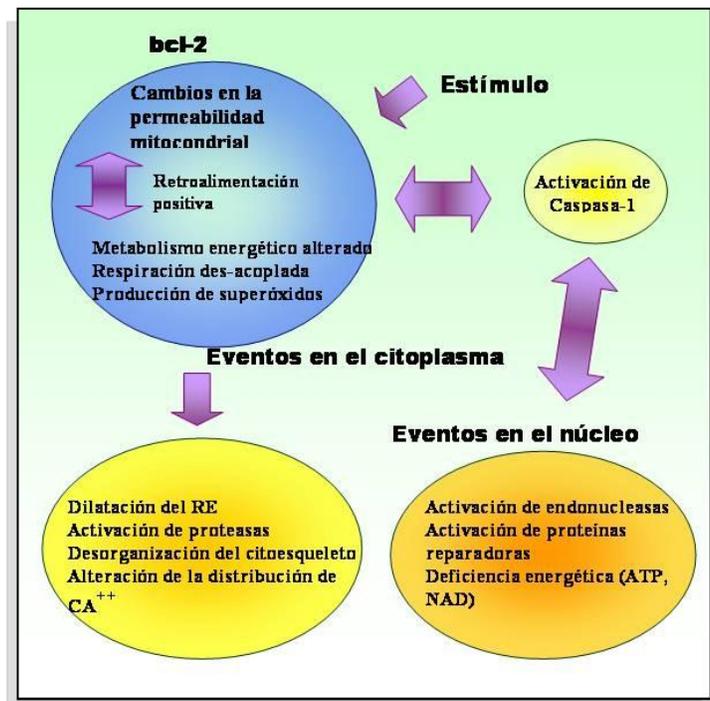


Figura 7. Esquema general de los fenómenos bioquímicos y citológicos que suceden en la apoptosis

Se han propuesto dos razones por las que se considera que las células se comprometen al suicidio: Una relacionada al desarrollo y la otra a la eliminación celular selectiva (Wyllie, 1987).

1. Entre los ejemplos más representativos de la muerte celular programada, que permiten un desarrollo apropiado, están los siguientes:

- La reabsorción de la cola del renacuajo durante la metamorfosis hacia una rana
- La remoción del tejido interdigital, en la formación de los dedos de manos y

pies durante el desarrollo fetal

- El desprendimiento del endometrio a la salida de la menstruación.
- La eliminación de las células excedentes durante la formación de la unión sináptica

2. Entre los eventos que representan una amenaza a la integridad del organismo y que requiere la participación de la apoptosis se mencionan los siguientes:

- Las células infectadas con virus
- Los linfocitos T citotóxicos (CTLs) activados para matar a células infectadas con virus
- La maduración o diferenciación de los linfocitos T en el timo
- Las anomalías en la maquinaria apoptótica pueden estar asociados con enfermedades autoinmunes (lupus eritromatoso y artritis reumatoide)
- Las células que han sufrido daño en su genoma

---

### 2.3. INDUCCIÓN DE LA APOPTOSIS

Entre los factores que obligan a que las células entren en la apoptosis está: La alteración en el equilibrio entre la eliminación de señales positivas y la implementación de las señales negativas (Munck 1971). Las estimulaciones positivas son las señales necesarias para la supervivencia continua (ver Figura 9);

- a. in vitro la adhesión al sustrato o bien, in vivo a la lámina basal
- b. Los factores de crecimiento neuronal
- c. La Interleucina 2 (IL-2), son causas esenciales para la mitosis de linfocitos (Dive, y col., 1992)

En cuanto a los estímulos negativos están (Farber, y col., 1990);

- a. El aumento en el interior celular de los niveles de agentes oxidativos
- b. Daño al ADN por estos oxidantes u otros agentes (radiación ultravioleta, rayos X, drogas quimo terapéuticas)
- c. Moléculas que se unen a receptores en la superficie celular y que promueven la generación específica para la apoptosis

Sobre este particular se ha propuesto (Dive, y col., 1992; Kane, y col., 1993; Lowe, y col., 1993) que;

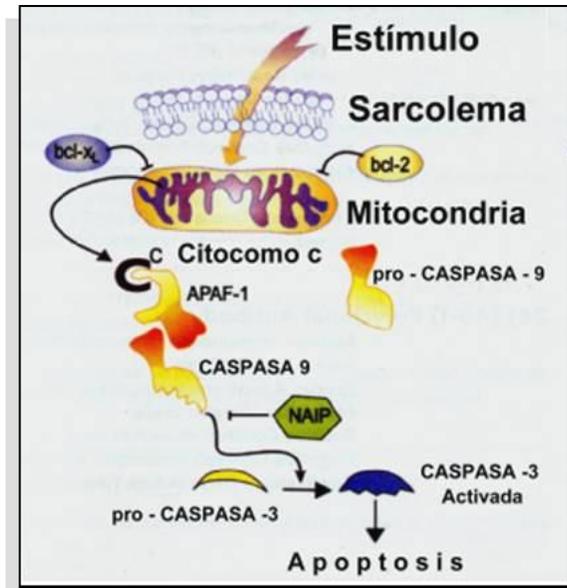


Figura 8. Apoptosis mediado por caspasas

En una célula intacta, las membranas externas de sus mitocondrias expresan la proteína Bcl-2 en su superficie externa, la cual está acoplada a la proteína Apaf-1. Cuando existe daño interno en la mitocondria (V. gr., estrés oxidativo), Bcl-2 se libera de Apaf-1, lo que ocasiona una liberación de citocromo c hacia el citosol. El citocromo c liberado y Apaf-1 se unen a la caspasa 9, éste complejo (citocromo c-Apaf-1-caspasa 9) y ATP (denominado apoptosoma) se agrega

1. Que haya generación intracelular de señales dañinas

En una célula intacta, las membranas externas de sus mitocondrias expresan la proteína Bcl-2 en su superficie externa, la cual está acoplada a la proteína Apaf-1. Cuando existe daño interno en la mitocondria (V. gr., estrés oxidativo), Bcl-2 se libera de Apaf-1, lo que ocasiona una liberación de citocromo c hacia el citosol. El citocromo c liberado y Apaf-1 se unen a la caspasa 9, éste complejo (citocromo c-Apaf-1-caspasa 9) y ATP (denominado apoptosoma) se agrega

junto con otros complejos y desencadena los procesos característicos de la apoptosis (Figura 8) (Hockenbery et, al., 1993).  
Hasta el momento se han caracterizado trece elementos de la familia de las caspasas. En general, se trata de enzimas con actividad proteolítica y reciben su nombre por su capacidad de cortar a las proteínas en residuos de ácido aspártico (Asp). Estas enzimas se sintetizan como precursores y requieren de la eliminación de un péptido bloqueador para intensificar su actividad. No obstante, se ha observado que como zimógenos muestran baja actividad proteolítica. La activación secuencial de una caspasa por otra, crea una reacción en cadena que incrementa la actividad proteolítica y que conduce rápidamente a la digestión de proteínas estructurales en el citoplasma, degradación cromosomal del ADN y la muerte celular (Hockenbery et, al., 1993).

2. Que se de la unión del activador de la muerte a receptores en la superficie celular (TNF, Linfotóxina, y Fas ligando) (ver Figura 8)

En el caso de los linfocitos activados, la apoptosis se puede iniciar por la estimulación de los receptores FAS o TNFR-1 vía la unión de los ligandos (en forma de trímeros), que induce la trimerización de los receptores. Estos receptores en sus tallos citoplásmicos presentan regiones de interacción con otra proteína que reciben el nombre de dominios de la muerte (FADD para FAS y TNFR-1 para TNF), a los cuales se unen proteínas adaptadores, esto ocasiona que se de la interacción con la caspasa-8 (FLICE), que conduce a una cascada de caspasas y al final, una caspasa activa a una ADNasa (CAD) que entre al núcleo y corta el ADN (Janeway y col., 1999).

---

## **2.4. AGENTES INDUCTORES DE LA APOPTOSIS**

Dos ejemplos interesantes de inducción de apoptosis están en el sistema inmunológico. Uno es la muerte prematura de los linfocitos T, que pueden ser capaces de atacar al organismo en que se generaron (Roitt, y col., 1997). Originados en la médula ósea, los linfocitos T maduran en el timo, entran en la sangre y en el sistema linfático y pasan a tener un papel primordial en la defensa contra los microorganismos. Los linfocitos T poseen moléculas proteicas en su superficie - denominadas receptores- que reconocen sustancias extrañas y las combaten. Pero algunos linfocitos contienen receptores que se unen al propio organismo, lo que provocaría una autoagresión si las células fuesen activas. Durante su maduración en el timo, sólo sobreviven linfocitos que se unen a componentes extraños; el resto es eliminado por medio de la apoptosis (Male, y col., 1996).

El otro ejemplo está en la acción de los linfocitos T llamados citotóxicos (Roitt, y col., 1997), que pueden actuar, contra una infección viral. Los virus solo sobreviven si están dentro de una célula, ya que usurpan la maquinaria celular para producir sus propias proteínas y generar nuevos virus que, a su vez, invaden otras células sanas. Sin embargo las células infectadas, exponen en su superficie algunas de las proteínas de los virus que pueden ser reconocidas por los linfocitos T citotóxicos. El linfocito se une a la célula infectada y la bombardea con por lo menos dos tipos de proteínas que, juntas, llevan a la muerte celular, sea por necrosis o apoptosis. Una de esas proteínas es la perforina, que se inserta en la membrana celular y forma poros. El daño de la membrana es suficiente como para producir la necrosis de la célula. Peña

(1998) encontró que la enzima granzima B, se une a la superficie de la célula infectada y penetra al citoplasma, donde desencadena la cascada de las caspasas, probablemente a partir de la activación de la caspasa 10.

Las células citotóxicas son capaces de inducir la apoptosis por medio de la proteína Fas; en su porción externa que puede unirse a la proteína FAS ligando. Cuando un linfocito se une a la célula que se va a destruir, su FAS ligando se une a la parte exterior de la Fas de la célula blanco, lo cual provoca que la parte interna de la Fas active a la caspasa 8, iniciando la cascada de caspasas.

### **2.4.1. Glucocorticoides**

Los glucocorticoides (GC) actúan sobre la inflamación por diversos caminos. Pueden provocar la disminución del número y activación de los eosinófilos, a través de la apoptosis y también reducen algunos factores quimiotácticos, que incluyen las IL-3, IL-5, Factor estimulador de colonias de monocitos y granulocitos (GM-CSF). En los linfocitos T, los GC inhiben la proliferación e induce su apoptosis al alterar el contenido de IL-2. Disminuyen también la cantidad de monocitos (células presentadoras de antígeno), células dendríticas, mastocitos, y otras células inflamatorias, y por lo tanto ocurre una disminución en la producción de citocinas. Estos efectos son producidos por diversos mecanismos, que incluyen la síntesis de proteínas con efecto antiinflamatorio, y la inhibición de la síntesis de numerosos factores proinflamatorios, y de crecimiento (Newton, 2000).

Los GC son hormonas naturales que previenen o suprimen las respuestas inmunes e inflamatorias cuando se administran en dosis farmacológicas. Los glucocorticoides libres cruzan fácilmente las membranas de las células y se unen a receptores citoplasmáticos específicos, induciendo una serie de respuestas que modifican la transcripción y, por tanto, la síntesis de proteínas. Entre las que se han observado la inhibición de la infiltración leucocitaria en el lugar de la inflamación, la interferencia con los mediadores de la inflamación y la supresión de las respuestas inmunológicas. La acción antiinflamatoria de los glucocorticoides involucra proteínas inhibitoras de la fosfolipasa A2, las llamadas lipocortinas, que controlan la biosíntesis de una serie de potentes mediadores de la inflamación (prostaglandinas y los leukotrienos). Se ha determinado que los GC absorbidos por inhalación inhiben la síntesis de la IgE y

aumentan el número de receptores  $\beta$  adrenérgicos en los leucocitos y disminuyen la síntesis del ácido araquidónico. (Iwasaki, y col., 1997; Lépori, 1997)

#### **2.4.1.1. La influencia de los glucocorticoides sobre la apoptosis y proliferación celular**

Los glucocorticoides inducen la apoptosis de eosinófilos y linfocitos T. Este es un proceso activo, en el cual el DNA es fragmentado por endonucleasas, y que requiere síntesis de proteínas para llevarse a cabo (Nieto, y col., 1992). La apoptosis inducida por glucocorticoides puede servir para eliminar timocitos o células T que estén en proceso inadecuado de diferenciación. Paradójicamente también pueden promover la sobre vivencia de los timocitos. Este efecto dual es similar al producido por el receptor de células T, que es esencial para la sobrevivencia de los timocitos, pero puede causar su apoptosis. Si la estimulación se produce en la periferia, el timocito prolifera, se diferencia en célula T efectora y de memoria. Si la estimulación del receptor de células T (TCR) se produce en células T maduras, puede producir apoptosis (muerte celular inducida por activación). Este proceso es inhibido por corticoides, que en este caso aumentan la sobrevivencia de estas células. El TCR y el receptor de granulocitos (GR) inducen apoptosis por vías diferentes. El primero induce FAS ligando, que interactúa con FAS activando la caspasa 8, mientras que el GR activa genes aun no determinados, y lleva a la apoptosis por activación de la caspasa 9. Los corticoides inhiben la apoptosis inducida por TCR por represión de la transcripción del FAS ligando. La activación del TCR inhibe la apoptosis inducida por corticoides, a través de la activación del TCR-CD3, RAS, MEK (cinasa estimulada por mitógenos), y ERK (cinasa regulada por señales extracelulares).

#### **2.4.1.2. La dexametasona**

La dexametasona es un esteroide adrenocortical sintético que es prácticamente insoluble en agua y cuya fórmula empírica es  $C_{22}H_{29}FO_5$ , (Figura 9). Perteneciente a la familia de los  $11\beta$ -adrenocorticosteroides, es producida en forma sintética y actúa de la misma forma que aquellos creados naturalmente por la glándula adrenal. (Merck., 1986). Se ha mencionado que tienen efecto sobre el metabolismo, aumenta el catabolismo de grasas, azúcares y proteínas (Goodman y Gilman, 1996).

Otras funciones en que puede estar implicada la DEX están;

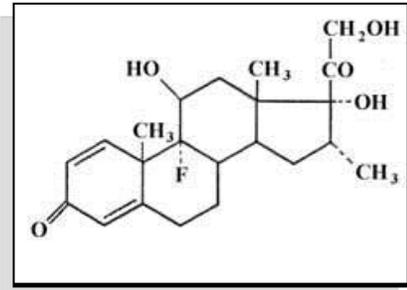


Figura 9 Fórmula estructural de la dexametasona

- Anti-inflamatorio.
- Inmunosupresores.
- Auxiliar en desórdenes del sistema nervioso central (S.N.C.).
- Quimioterapia para el cáncer.
- Shock.
- Reducción del calcio sanguíneo.

Cualquier infección latente puede ser enmascarada por el uso de la dexametasona, grandes dosis de dexametasona disminuyen la formación de anticuerpos y de globulinas del plasma. La acción no está tan marcada en el hombre como en muchos animales experimentales y probablemente contribuya a la depresión del sistema inmunológico (Lépori, 1997).

## 2.5. EQUILIBRIO ENTRE PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS

Dado que la apoptosis actúa como oponente a la mitosis, es muy importante su relación con el ciclo celular; Este proceso consta de cuatro fases: mitosis, fase de



### Teoría de las señales duales

Los estímulos externos activan simultáneamente los mecanismos de proliferación y los de muerte; por lo tanto el éxito de cualquiera de ellos dependerá de cual sea suprimido

(Guo y Hay, 1999)

control celular G1, síntesis de ADN y fase de control G2. La apoptosis puede iniciarse en el tercio final de G1 para impedir que una célula dañada ingrese a la fase de síntesis de manera que las mutaciones no se reproduzcan durante la réplica del ADN y en la fase G2 para impedir que las células que no hayan llegado a la madurez entren en mitosis (Caerr, 1994).

Los efectores que llevan a cabo el ciclo celular son complejos proteicos, formados por subunidades llamadas ciclinas y cinasas dependiente de ciclinas (cdk), sintetizados por genes específicos. La síntesis de estos complejos es constante porque son inestables. De ahí que el nivel de ellos varía de acuerdo al momento evolutivo de la fase a que están asignados. Así en el avance de la fase

G1 a la de síntesis actúa la ciclina D dependiente de cinasas (cdk 2, 4, 6). En la segunda mitad de la fase G1 aumenta la presencia de ciclina E con la cdk 2. En la fase de síntesis actúa la ciclina A con cdk 2 y en la fase G2, la ciclina B con cdk 2. En la fase G1 se han podido determinar dos puntos importantes: G0 (en la mitad de la fase) donde el ciclo puede detenerse, la célula bloquea su crecimiento; pero se mantiene metabólicamente activa y un punto de restricción (en unión de los 2/3 con 1/3 final de esta fase) en que se puede detener el ciclo para corregir defectos celulares (en especial de su ADN), lo que si no se consigue induce el mecanismo de muerte celular. En la fase G2 también existen elementos de detección de inmadurez celular que inducen la apoptosis cuando la célula no está capacitada para entrar en mitosis (Guo y Hay, 1999; Thompson, 1988).

De esta manera, durante el ciclo celular se determina cuándo la célula debe entrar en el proceso de autodestrucción o continuar el ciclo y dividirse. Se ejerce así un balance entre mitosis y apoptosis, regulando la población celular de cada tejido (teoría de las señales duales) (Guo y Hay, 1999).

### **2.5.1. Proliferación inducida por fitohemaglutinina**

La fitohemaglutinina (PHA) se obtiene a partir de diferentes variedades de frijol pertenecientes a la especie *Phaseolus vulgaris*. Es una glicoproteína que presenta una potente actividad mitogénica y también es capaz de aglutinar distintos tipos de células, tales como eritrocitos y leucocitos. (Zenteno, y col., 1994; Tanda, y col., 1999).

La PHA está constituida por una mezcla de 5 isolectinas tetramétricas (L4, L3E, L2E2, LE3 y E4) con propiedades biológicas diferentes, las cuales están formadas por varias combinaciones de 2 subunidades L y E. La isolectina L4 tiene una actividad mitogénica y leucoaglutinante potente, sin embargo, no presenta actividad eritroaglutinante, mientras que la E4 tiene actividad eritroaglutinante muy fuerte pero no muestra actividad leucoaglutinante. Las isolectinas restantes, L3E2 y LE3, presentan actividad leucoaglutinante y eritroaglutinante proporcionales a las cantidades de subunidades E y L. (Hamelryck, y col., 1996; Goncalves y Costa. 1995).

La transformación celular se inicia a menudo por medio de la activación de componentes celulares constitutivos implicados en las vías de señalización celular

que controlan la proliferación y la diferenciación. Estas vías se inician mediante receptores de la superficie celular y muchas de ellas convergen en la cascada de proteína cinasa activadas por mitógenos, las cuales catalizan una secuencia ininterrumpida de reacciones. En esa cascada una proteína cinasa activa a otra que a su vez activa a la proteína S6 ribosómica y a los productos de los oncogenes tempranos, los cuales actúan como factores de transcripción sobre genes más tardíos cuyos productos influyen directamente sobre la división, diferenciación, etc.

Por tanto, el efecto de los mitógenos sobre el comportamiento celular implica cambios en el programa de expresión genética. El ciclo de división celular se compone de una serie de fases que pueden estar reguladas positiva o negativamente por diversos factores. Existen reguladores negativos del ciclo de división celular como son la proteína p53 y la proteína codificada por el gen Rb ambas son fosfoproteínas nucleares y la alteración de los genes que las codifican por mutación o interacción de dichos genes con proteínas oncogénicas derivadas de virus tumorales DNA, pueden conllevar al fenotipo transformado (Tanda, y col., 1999).

## INMUNOLOGÍA

*El sistema inmunitario es una red de componentes celulares y solubles que interaccionan entre sí. Su función es distinguir entidades dentro del cuerpo como «propias» o «extrañas» y eliminar las extrañas. Los microorganismos son las principales entidades extrañas, pero también son importantes las neoplasias, los trasplantes y ciertas sustancias extrañas (p. ej., algunas toxinas). Para desarrollar esta tarea, el sistema inmunitario ha desarrollado dos mecanismos: la inmunidad inespecífica y la inmunidad específica, que están ligadas entre sí e influyen la una en la otra.*

**E**l Sistema inmune consta de una serie de órganos, tejidos y células ampliamente repartidos por todo el cuerpo. Funcionalmente, los órganos se clasifican en primarios y secundarios. Los primeros suministran el microambiente para la maduración de los linfocitos, mientras que los segundos se encargan de capturar el microorganismo o antígeno, suministrando el entorno adecuado para que los linfocitos interactúen con él (Abbas, y col., 1999).

Los distintos órganos linfoides están interconectados por vasos sanguíneos y vasos linfáticos, de modo que se constituye un sistema unitario, entrelazado y bien comunicado. Estos

---

*Los linfocitos constituyen el 25% de los leucocitos sanguíneos, y el 99% de las células linfáticas. Existen unos 10 billones de linfocitos en el cuerpo humano, que equivalen a la masa del cerebro.*

---

vasos transportan células del sistema inmune, de las cuales el tipo central es el linfocito (Abbas, y col., 1999).

Aunque en la respuesta inmune intervienen varios tipos de leucocitos, sólo los linfocitos presentan las siguientes características (Elgert, 1996):

- Especificidad
- Variedad (diversidad)
- Memoria inmunológica
- Reconocimiento de lo propio y lo ajeno

### **3.1. SISTEMA LINFOIDE**

El sistema linfoide está formado por varios tipos de células (Paul, 1999):

- Linfocitos
- Células accesorias, principalmente macrófagos y otras células presentadoras de antígenos (APC)
- Células epiteliales (en algunos casos)

Y funcionalmente está organizado en dos tipos de órganos linfoides:

1. Órganos linfoides primarios o centrales, que
  - a. Proporcionan el entorno para la maduración de linfocitos (linfopoyesis), de modo que los linfocitos adquieren su repertorio de receptores específicos para cada tipo de antígeno;
  - b. Los linfocitos se seleccionan de modo que poseen autotolerancia (evitación de la autoinmunidad).

Los órganos linfoides primarios son:

- a. El timo, donde maduran los linfocitos T
  - b. La médula ósea en el adulto como órgano de maduración de los linfocitos B
  - c. En el feto temprano esta función la toma el hígado, aunque paulatinamente se ve sustituido por la médula
  - d. En las aves, el equivalente funcional de la médula es la Bolsa de Fabricio
2. Órganos linfoides secundarios o periféricos, que
    - a. Proporcionan el entorno para que los linfocitos interactúen entre sí, o

con las APC y otras células accesorias, y para que entren en contacto con el antígeno

- b. Diseminan la respuesta inmune al resto del cuerpo

Los órganos linfoides secundarios son:

- a. Los ganglios linfáticos, que recogen Ag de los tejidos
- b. El bazo, que recoge Ag de la sangre
- c. Tejidos linfoides asociados a mucosas (MALT), que recogen Ag de las mucosas
- d. En la respuesta secundaria, la médula ósea actúa igualmente como órgano secundario.

(Elgert, 1996)

### **3.1.1. Órganos linfoides primarios**

#### **3.1.1.1. Timo**

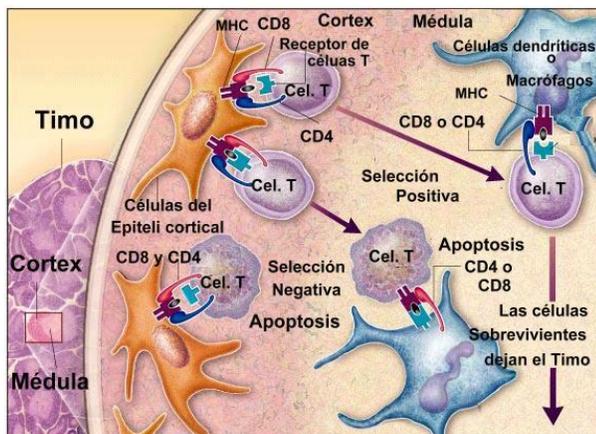
Es un órgano plano y blando situado en la cavidad torácica, por encima del corazón, está formado por dos lóbulos rodeados por cápsula de tejido conjuntivo. A su vez, los lóbulos están divididos en lobulillos separados entre sí por trabéculas de tejido conjuntivo. Cada lobulillo tímico está relleno de células linfoides denominadas timocitos, dispuestas en una corteza de gran densidad celular y una médula (interior) de menor densidad celular. Desde la corteza hasta la médula existe un gradiente de diferenciación, de modo que en la corteza se encuentran los timocitos más inmaduros, mientras que en la médula se localizan los timocitos en fases de mayor especialización. Tanto la corteza como la médula están rellenas de una red de células no linfoides que constituyen el estroma tímico, y que consta de varios tipos celulares (Kuby, 1997):

1. Tres tipos de células epiteliales:
  - a. en la corteza más externa, las células nodriza
  - b. en la corteza, células corticales epiteliales
  - c. en la médula, células medulares epiteliales.
2. Células dendríticas interdigitantes sobre todo en el límite cortico-medular.
3. Macrófagos, con una localización similar a las dendríticas.

Todas estas células no linfoides del estroma expresan en sus superficies moléculas MHC de tipo I y/o II, y participan en la maduración y selección de los timocitos hacia células T maduras.

- En la médula tímica aparecen los denominados corpúsculos de Hassall: acúmulos concéntricos de células epiteliales. Su función es desconocida, pero su número va aumentando con la edad.

(Male, y col., 1996)



*Figura 10. Maduración y diferenciación de Células T*

En la Figura 10, se muestra el proceso de maduración intratímica de los linfocitos (Male, y col., 1996), del que de manera resumida se puede decir:

- Los progenitores linfoides de los linfocitos, procedentes de la médula ósea, entran en el timo y comienzan a dividirse activamente en la corteza; sin embargo, allí mueren por apoptosis más del

95% de las células generadas, que son eliminadas por los macrófagos. Los sobrevivientes van emigrando hasta la médula, donde terminan de madurar, y salen del timo como células T vírgenes maduras (inmunocompetentes), por medio de las vénulas postcapilares del timo.

- Durante este proceso los timocitos han ido interactuando con células estromales provistas de MHC en sus membranas (células nodriza → células corticales epiteliales → células dendríticas), produciéndose dos fases de selección de timocitos:
- Selección positiva: sólo sobreviven aquellos timocitos que hayan generado receptores TCR capaces de reconocer moléculas MHC propias; los demás mueren por apoptosis.

- Selección negativa: se eliminan por muerte celular programada los timocitos que habiendo superado la selección positiva hayan resultado autorreactivos, es decir, que reconozcan moléculas del propio individuo (autoantígenos) presentadas por el MHC propio, o que tengan una afinidad demasiado alta hacia el MHC propio sólo.

De esta forma sólo salen como linfocitos T maduros aquellas célula autotolerantes (no inmunidad a lo propio) y capaces de reconocer antígenos (moléculas extrañas al propio individuo) en el contexto del haplotipo propio del MHC.

El timo de los mamíferos va involucionando con la edad, a partir de la pubertad. En humanos, al nacer, el timo pesa 10-15 g, alcanza su máximo en la adolescencia, época en la que llega a pesar 40-70 g, posteriormente disminuye, de modo que en la vejez sólo pesa 3 g, aunque siempre queda un remanente de zona medular.

Por lo tanto, en la vida adulta, la producción de linfocitos T en el timo decae bastante, aunque siempre existe una actividad residual.

En la fase adulta, cuando el timo ha involucionado, sigue habiendo maduración de linfocitos T en otros lugares, principalmente en el epitelio intestinal, donde se produce linfopoyesis de célula T  $\gamma\delta$  y T  $\alpha\beta$ , que permanecen en el epitelio intestinal o migran a la lámina propia (Elgert, 1996).

### **3.1.2. Órganos linfoides secundarios**

Los linfocitos maduros vírgenes que salen de los órganos linfoides primarios emigran a los órganos y tejidos linfoides periféricos (Abbas, 1999):

1. **Capsulados:** en ellos se produce la secreción de Ac que se distribuirán por la circulación; también se dan respuestas celulares locales.
  - a. ganglios (recogen Ag de la piel y de superficies internas)
  - b. bazo (recoge Ag de la sangre)
2. **Órganos no capsulados asociados a mucosas (MALT):** protegen del Ag que entre directamente a través de mucosas (gastrointestinal, respiratoria, genitourinaria). Su respuesta es la secreción de inmunoglobulina A secretoria (sIgA), que recubrirá la superficie mucosal (epitelial).

3. Acúmulos más o menos difusos (no capsulados): dispersos por casi todo el cuerpo.

### 3.1.2.1. Sistema linfático y ganglios linfáticos

El componente fluido de la sangre (plasma) sale desde los capilares a los tejidos, generando el líquido intersticial. Parte de éste retorna a la sangre a través de las

---

*El corazón no influye sobre la circulación de la linfa: ésta avanza en un solo sentido debido a los movimientos de los músculos del cuerpo y a la disposición unidireccional de las válvulas de los ganglios linfáticos.*

---

membranas capilares, pero el resto, llamado linfa, fluye desde los tejidos conectivos a una red de finos capilares linfáticos abiertos, y de allí va pasando a vasos cada vez mayores (vasos linfáticos). Finalmente, la linfa llega al mayor vaso linfático, denominado conducto torácico, que descarga a circulación sanguínea a nivel de la subclavia izquierda

(cerca del corazón). De este modo se cumple una de las funciones del sistema de vasos linfáticos: capturar fluido procedente de los tejidos y reingresarlo en la sangre, asegurando niveles estables de fluido en el sistema circulatorio (Elgert, 1996).

La otra función (y la que más nos interesa) del sistema linfático es capturar antígenos de los líquidos intersticiales de los tejidos y llevarlos a algunos de los órganos linfoides secundarios, donde quedarán retenidos para su interacción con las células del sistema inmune. El antígeno queda retenido en alguno de los ganglios interpuestos a lo largo del sistema de vasos, pero en el caso de que "pase de largo" entrará en circulación sanguínea y tendrá la oportunidad de ser captado por el bazo

Aparte de estos órganos existen folículos linfoides difusos, que son agregados de células linfoides rodeados de capilares linfáticos que drenan al folículo. Existen miles de tales folículos dispersos por casi todos los órganos y tejidos, siendo especialmente abundantes a lo largo del tracto gastrointestinal, bronquios, tracto respiratorio superior y tracto genital.

Como se ha, mencionado, cuando el Ag p entra desde el líquido intersticial, pasando a los capilares linfáticos, y de ellos a los vasos linfáticos, accede a algún ganglio linfático regional (Janeway, y col., 1999).

### 3.1.2.2. Bazo

Es un órgano linfoide secundario grande (150g en humanos adultos), de forma ovoide, situado en el cuadrante superior izquierdo del abdomen.

Su papel funcional es capturar antígenos transportados por la sangre (p. ej., en las situaciones de infecciones sistémicas). La arteria esplénica se ramifica en numerosas arteriolas, que descargan a los sinusoides esplénicos; de allí arrancan las vénulas, que finalmente se unen en una sola vena esplénica que sale del órgano. Posee una cápsula de tejido conectivo, de la que salen hacia el interior numerosas trabéculas que delimitan compartimentos. En cada compartimento se distinguen dos tipos principales de tejidos: la pulpa blanca y la pulpa roja (Roitt, y col., 1997).

1. La **pulpa blanca** está constituida por tejido linfoide, repartido en un tejido más denso alrededor de las arteriolas, llamado vaina o manguito linfoide periarteriolar (PALS), que constituye la zona T del bazo; por fuera del PALS, una zona más difusa llamada zona marginal, rica en linfocitos B y con macrófagos. Aquí se encuentran folículos linfoides primarios y secundarios, parecidos a los vistos en el ganglio.
2. La **pulpa roja** es una red de sinusoides venosos que contienen macrófagos residentes especializados (macrófagos de los senos esplénicos), que se encargan de destruir eritrocitos y plaquetas viejos (proceso de hematocátesis).

El bazo carece de vasos linfáticos, a este órgano el Ag llega a través de la arteria esplénica, que entra al órgano por el hilio. La arteria se divide en arteriolas, que a su vez conducen a capilares, que se abren y vacían su contenido en la zona marginal de la pulpa blanca.

En ausencia de estímulo, la zona marginal posee folículos linfoides primarios, parecidos a los de los ganglios, ricos en células B vírgenes.

En la zona T del bazo (PALS) las células dendríticas interdigitantes captan y procesan el antígeno, presentándolo en sus MHC de clase II a los TH en reposo, activándolos. A su vez, los TH activados activan a las células B. Las B activadas, junto con algunos linfocitos T migran a la zona marginal, convirtiendo los folículos linfoides primarios en folículos secundarios, con sus centros germinales poblados de centroblastos en multiplicación (Peña, 1998).

El bazo recibe cada día más linfocitos que la suma de todos los de los ganglios linfáticos.

La esplenectomía, sobre todo en la infancia, conlleva un mayor riesgo de bacteriemias, generando susceptibilidad principalmente a influenza (*Haemophilus influenzae*), meningitis (*Neisseria meningitidis*) y neumonía (*Streptococcus pneumoniae*) (Elgert, 1996).

### **3.2. HEMATOPOYESIS**

La hematopoyesis consiste en la formación y desarrollo de células sanguíneas a partir de la célula madre pluripotencial (stem cell) (Kuby, 1997).

- Durante las primeras semanas embrionarias se encuentran células madres en el saco vitelino, las cuales van diferenciándose en células eritroides, provistas de hemoglobina embrionaria.
- Desde el tercer mes hasta el séptimo de embarazo, las células madre migran, primero al hígado fetal, y después al bazo fetal, donde sigue la hematopoyesis.
- Desde el séptimo mes, va disminuyendo la hematopoyesis en el hígado y bazo, hasta que desaparece para la época del nacimiento, y va adquiriendo mayor importancia el papel de la médula ósea.

Todas las células sanguíneas proceden de la célula madre pluripotencial. En la médula ósea sólo hay una de tales células por cada 10,000 totales. Son células capaces de autorregeneración, de modo que durante la vida adulta se mantienen homeostáticamente. En circunstancias de alta demanda de células sanguíneas aumenta la capacidad proliferativa de la célula madre (Male, y col., 1996).

Tanto en el linaje linfoide como en el mieloide, los progenitores quedan "comprometidos" a seguir una determinada ruta de diferenciación; ello se debe a que adquieren la capacidad de responder a determinados factores de crecimiento. En la médula ósea adulta, las células de la línea hematopoyética van madurando y diferenciándose en el interior de un estroma compuesto por células no hematopoyéticas (células grasas, endoteliales, fibroblastos, etc.). La maduración se debe al microambiente suministrado por la matriz celular del estroma junto con factores difusibles o no difusibles. Entre los difusibles se encuentran diversos factores de crecimiento (Paul, 1999).

La membrana de las células diferenciadas tienen la capacidad de deformarse, lo cual les permite pasar a través de la pared sinusoidal, a los senos de la médula ósea, desde donde acceden a la circulación general (Paul, 1999).

### **3.2.1. Factores hematopoyéticos de crecimiento**

Las células hematopoyéticas requieren factores de crecimiento para:

- Supervivencia
- Multiplicación
- Diferenciación
- Maduración

Hay varios tipos de factores (Peña, 1998):

1. Factores estimuladores de formación de colonias (CSF), pertenecientes a la familia de las glicoproteínas ácidas. Ejemplos: multi-CSF (también llamado IL3, es un factor multilíneo); GM-CSF (estimulador de la línea granulocito-macrófago); M-CSF (de la línea que conduce al monocito-macrófago); G-CSF (de la línea que desemboca en los granulocitos).
2. Eritropoyetina (EPO): que se produce en el riñón, y que estimula la línea que, vía progenitor eritroide conduce a los eritrocitos.
3. Otros factores: principalmente las interleucinas IL-4 a IL-9, segregadas por células estromales, macrófagos activados, etc.

#### **3.2.1.1. Regulación de la hematopoyesis**

La hematopoyesis se mantiene durante toda la vida del individuo, de modo que el número de células recién generadas equilibra al de células que se pierden o mueren. El cuerpo humano produce unos 400,000 millones de células de la línea hematopoyética cada día.

Cada tipo celular tiene una vida media más o menos característica:

- Los eritrocitos viven unos 120 días, al cabo de los cuales son fagocitados por los macrófagos del bazo
- Los neutrófilos duran unos pocos días
- Algunos linfocitos T duran más de 30 años

La hematopoyesis está finamente regulada, de modo que cada tipo celular tiene un control diferente. Esta regulación es lo suficientemente flexible para permitir aumentos del 10 o 20 veces ante una infección o una hemorragia (Peña, 1998)

- La regulación de fase estacionaria (en ausencia de infección o de hemorragia) se logra por la producción controlada de citocinas por parte de las células estromales de la médula ósea.
- Ante una infección o hemorragia se produce una hematopoyesis inducible (incrementada), por la acción de citocinas segregadas por macrófagos y linfocitos TH: se incrementa la cantidad de células específicas de la médula ósea, que al madurar tenderán a migrar al foco de infección o lesión.

### 3.3. MARCADORES DE SUPERFICIE DE LEUCOCITOS

Los linfocitos y otros leucocitos, así como sus precursores hematopoyéticos, presentan patrones característicos de moléculas de superficie, que pueden ser aprovechadas como marcadores para distinguir y caracterizar distintas poblaciones celulares (Roitt, 1998).

Esta caracterización se realiza mediante anticuerpos monoclonales. Que reconocen una determinada molécula de membrana leucocitaria; proponiéndose una nomenclatura basada en los llamados grupos de diferenciación (CD). En la práctica, se concede la denominación de "CDx" (siendo "x" un número arábigo determinado)

a cada molécula de superficie caracterizada por ese conjunto de anticuerpos monoclonales (ver Figura 11).

Se pueden considerar varias clases de marcadores (Roitt, y col., 1997):

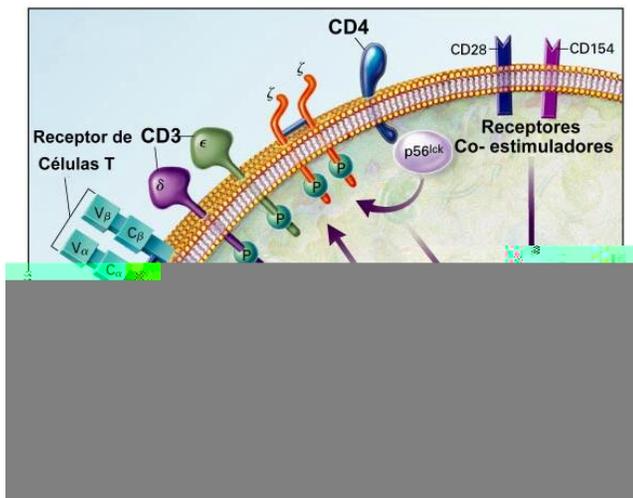


Figura 11. Diferentes marcadores de superficie en la membrana de linfocitos T.

1. De linaje (p. ej., el CD3 sólo existe en el linaje que conduce a los linfocitos T)
2. De maduración (ej.: el CD1 sólo aparece en las fases madurativas de células T en el timo)
3. De activación (p. ej., el CD25)

es el receptor de la citocina IL-2, y sólo se expresa en aquellas células T estimuladas previamente por el antígeno)

A pesar de la gran diversidad de CDs, muchas de ellas presentan homologías mutuas, pudiéndose agrupar en familias e incluso superfamilias que compartan un origen evolutivo común, por medio de los mecanismos de duplicación de algún gen ancestral, con ulterior divergencia de secuencias de cada copia.

Por mencionar algunos ejemplos (Peña, 1998):

1. Superfamilia de las inmunoglobulinas, donde se incluyen CD2, CD3, CD4, CD8
  2. Familia de las integrinas: cada miembro de esta familia consta de dos cadenas,  $\alpha$  y  $\beta$ . Se distinguen distintas subfamilias, dependiendo del tipo de cadena  $\beta$ .
  3. Selectinas (que tienen especificidad de lectinas)
  4. Proteoglucanos (como el CD44), que se unen a componentes de la matriz extracelular
- 

### **3.4. CÉLULAS LIFOIDES**

Los linfocitos T y B son los responsables de la respuesta inmune específica. En humanos (Kuby, 1997):

1. Se producen en los órganos linfoides primarios a razón de 1000 millones al día, y de allí migran a órganos linfoides secundarios y a espacios tisulares.
2. En el adulto existe un billón de linfocitos, equivalentes a un 2% del peso corporal.
3. Suponen del 20 al 40% de los leucocitos totales.

Existen tres poblaciones de linfocitos funcionalmente distintas, caracterizada cada una por un juego de marcadores, pero son difíciles de reconocer morfológicamente entre sí (Kuby, 1997):

1. Células T: se caracterizan por presentar CD3 en su superficie.
2. Células B : presentan CD45
3. Células NK

Los linfocitos T y B vírgenes (no estimulados) son pequeños tienen un tamaño de unos 6  $\mu\text{m}$  de diámetro, con poco citoplasma que forma un estrecho anillo alrededor del núcleo. Poseen cromosomas condensados, con abundante heterocromatina; albergan pocas mitocondrias, y un retículo endoplásmico rugoso (RER) pequeño, y un aún menor complejo de Golgi (AG) (Kuby, 1997).

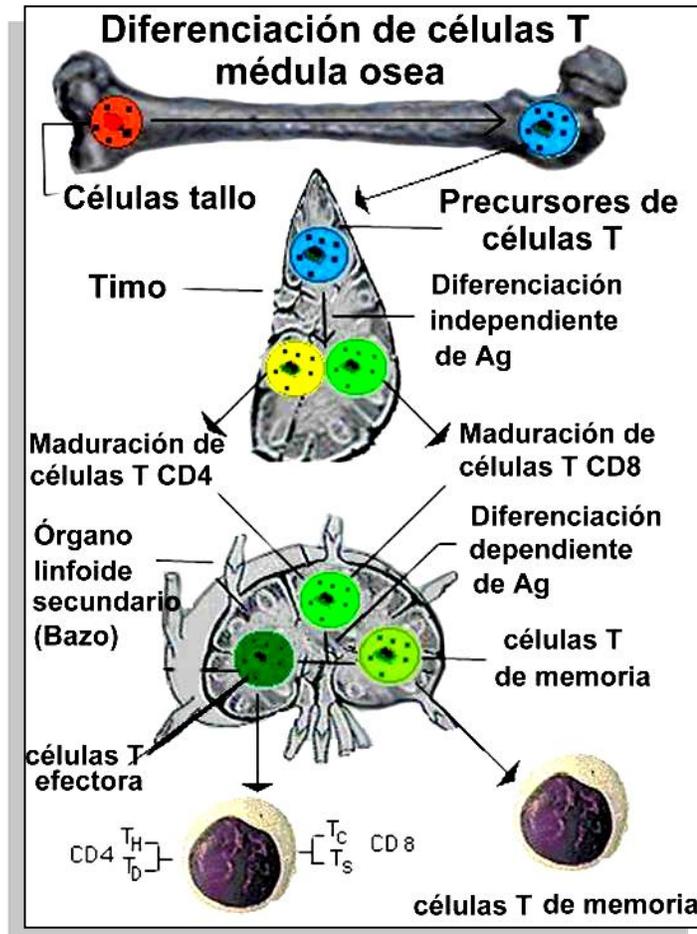


Figura 12. Diferenciación y maduración de las células del sistema inmunológico

aumenta algo la eucromatina, aparece un nucleolo patente y aumenta la proporción del citoplasma, donde se puede observar un AG. bien desarrollado.

Estos linfoblastos proliferan y finalmente se diferencian en dos subpoblaciones (Kuby, 1997) (ver Figura 12):

- **Células efectoras:** tienen vida corta, RER bien desarrollado en capas concéntricas, y vesículas de AG
- **Células de memoria:** que están en  $G_0$ , vida larga (algunas duran toda la vida del individuo).

1. En sí mismos, en ausencia del antígeno (Ag) específico, tienen vida corta (de unos días a unas pocas semanas), y fácilmente sufren muerte celular programada.

2. En cambio, si entran en contacto con el Ag a partir de sus receptores específicos, salen de la fase  $G_0$  y entran en el ciclo celular

( $G_0 \rightarrow G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M$ ).

En la fase  $G_2$  corresponden a linfoblastos: aumentan su tamaño (15  $\mu\text{m}$ ),

### 3.4.1. Linfocitos B

En los mamíferos, los linfocitos B se diferencian en la médula ósea, mientras que en las aves lo hacen en la bursa o bolsa de Fabricio, donde constituyen del 5 al 15% de los linfocitos circulantes. Reconocen al antígeno en forma soluble, por medio de sus inmunoglobulinas de membrana (IgM), que forman parte del complejo receptor de las células B (BCR). En cada linfocito hay unas 150,000 moléculas de IgM, que han sido sintetizadas por él. Todas estas moléculas poseen la misma especificidad antigénica. (ver Figura 13) (Roitt, 1998).

En ausencia de estímulo antigénico, estos linfocitos B maduros vírgenes mueren por apoptosis al cabo de unos pocos días. En cambio, si se une por su BCR al Ag complementario específico (y con la ayuda de señales de macrófagos y células T), se pone en marcha la selección y proliferación clonal, que termina (al cabo de 4-5 días) con la diferenciación de dos sub-poblaciones: una de células plasmáticas secretoras de Ac, y otra de células B de memoria (estimuladas) (Roitt, 1998).

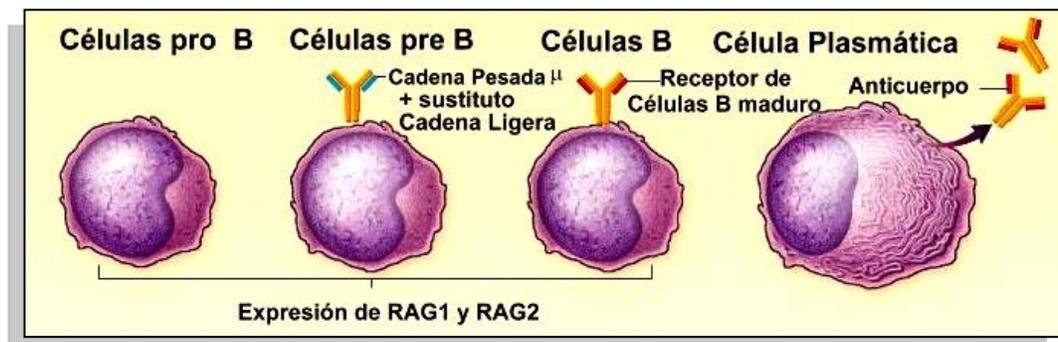


Figura 13. Maduración de células B

Según, Paul (1999), las células plasmáticas poseen las siguientes características:

1. Carecen de Ig de membrana
2. Son mayores y con más proporción de citoplasma que las B de las que proceden
3. Su RER está muy desarrollado. Esto explica la gran cantidad de Ac secretados que producen; esos anticuerpos poseen la misma especificidad antigénica que la de las IgM de la célula B original
4. No circulan por la sangre ni por los vasos linfáticos, sino que se localizan en los órganos linfoides secundarios y los lugares de la respuesta inmunológica
5. Viven unos pocos días; al ser células en fase de diferenciación terminal, carecen de capacidad mitótica, y mueren por apoptosis

En cambio, los linfocitos B de memoria, en cambio, pueden llegar a vivir en reposo por más de 20 o 30 años. Cuando se exponen al Ag específico, dan una respuesta inmunitaria más rápida, más intensa, y con mayor afinidad. Su aspecto es similar al de los linfocitos B vírgenes.

### 3.4.1.1. Linfocitos T

Las células T maduran en el timo, adquieren repertorios funcionales y son capaces de diferenciar lo propio de lo extraño. En este órgano se desarrollan dos procesos de selección (Roitt, y col., 1997):

1. **Positiva** (a los clones que reconocen el Ag/complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) se les permite proliferar, madurar y migrar a la periferia)
2. **Negativa** (se eliminan los clones que reaccionan a lo propio como si fuera extraño) (ver Figura 13). No se conocen por completo los mecanismos celulares y moleculares exactos de esta selección

Durante el desarrollo fetal, la célula T primordial (células tallo o stem cell), que deriva de la médula ósea, se traslada al timo, donde madura y adquiere la capacidad de distinguir lo propio. Tiene lugar el proceso de la selección tímica y los linfocitos maduros dejan el timo; se les encuentra en la sangre periférica y en los tejidos linfoides. Todas las células T maduras expresan CD4 o CD8 de una forma mutuamente exclusiva.

### 3.4.1.2. Células T cooperadoras

A las células T que expresan el CD4 se les denomina generalmente linfocitos T cooperadoras (TH) (Elgert, 1996).

Estas células pueden subdividirse en dos categorías principales, dependiendo de su función, respuesta a diferentes citocinas y capacidad para secretar citocinas. La opinión actual es que las células  $T_H$  comienzan como células precursoras que sintetizan IL-2. Ante una estimulación inicial, estas células evolucionan a células  $T_{HO}$ , que pueden secretar varias citocinas, como IFN- $\gamma$ , IL-2, IL-4, IL-5 y IL-10. Dependiendo de la citocina disponible, las células  $T_{HO}$  pueden evolucionar a células  $T_{H1}$  o  $T_{H2}$ ; el IFN- $\gamma$  y la IL-2 favorecen el desarrollo a  $T_{H1}$  y la IL-4 y la IL-10 favorecen el desarrollo a  $T_{H2}$ . Las  $T_{H1}$  y las  $T_{H2}$  difieren en el perfil de citocinas que

secretan: las células  $T_{H1}$  secretan  $IFN-\gamma$ , mientras que las células  $T_{H2}$  secretan IL-4, aunque ambas secretan otras citocinas (p. ej., IL-3, GM-CSF,  $TNF-\alpha$ ). En general las  $T_{H1}$  favorecen la inmunidad celular, mientras que las  $T_{H2}$  favorecen la inmunidad humoral (Elgert, 1996).

La distinción de las respuestas  $T_{H1}$  y  $T_{H2}$  ha cambiado la idea acerca de la relación del sistema inmunitario con la enfermedad. La respuesta inmunitaria debe ser no sólo fuerte, sino también adecuada para la infección o la enfermedad. Quizá el mejor ejemplo de esta estrategia es la lepra, en la cual ahora se cree que la respuesta  $T_{H1}$  da lugar a la lepra tuberculoide, mientras que la respuesta  $T_{H2}$  origina la lepra lepromatosa. Además, una respuesta  $T_{H1}$  puede agravar las enfermedades autoinmunitarias, mientras que una respuesta  $T_{H2}$  favorece la secreción de IgE y el desarrollo de atopia (Janeway, y col., 1999).

### **3.4.1.3. Células T supresoras/citotóxicas**

Las células T que expresan CD8 están peor caracterizadas que los subgrupos  $T_H$ , aunque parece que pueden dividirse en dos tipos dependiendo de las citocinas que secretan, siendo la segregación idéntica a la de los subgrupos CD4. Se ha sugerido que a los tipos de linfocitos se les llame tipos 1 y 2 ( $T_1$ ,  $T_2$ ) en lugar de  $T_{H1}$  y  $T_{H2}$ , porque puede hacerse la misma subdivisión en las células CD8 (Roitt, y col., 1997).

Las células T citotóxicas (TC o CTL, del inglés cytotoxic T lymphocytes) se refieren a aquellos linfocitos restringidos por el MHC y específicos frente al Ag. Las células CD4 y CD8 pueden actuar como CTL dependiendo de si reconocen a MHC de las clases I o II, respectivamente. También se diferencian varios tipos de células citotóxicas o agresoras; algunas de ellas expresan marcadores CD8 o CD4 (Peña, 1998).

## JUSTIFICACIÓN

*Las consecuencias que tiene la desnutrición no se solucionan sólo con satisfacer las necesidades alimenticias de los organismos que la padecen, por lo que conocer las anomalías a nivel inmunológico, es una, necesidad prioritaria para su efectivo tratamiento.*

La desnutrición es un grave problema de salud pública a escala mundial; sobre todo en los países cuya economía está menos desarrollada y presentan los más altos índices de pobreza, desempleo e ignorancia. Estos factores son los responsables de que desdichadamente se incremente cada vez más los porcentajes de ésta enfermedad. Los niños son quienes predominantemente manifiestan este padecimiento; en ellos los efectos pueden ser particularmente devastadores, esto podría asociarse a las mayores exigencias nutricionales en las etapas tempranas del desarrollo debido a que el crecimiento corporal es acelerado.

En estudios anteriores se ha visto que la DCP produce diversos efectos sobre los órganos linfáticos, alargamiento del ciclo celular y alargamiento de la fase S (Gómez, y col 1996), incremento en el intercambio de cromátidas hermanas, y aberraciones cromosómicas (Ortiz, y col. 1995; Ortiz, y col. 1997)

En la condición *in vitro* la fitohemaglutinina activa la proliferación celular de manera similar a lo que se observa *in vivo* en bazo, sangre y timo al ser expuestas a un antígeno. En algunas circunstancias las células estimuladas pueden encaminarse a la apoptosis.

La exposición a la dexametasona semeja la selección clonal, llevando a las células a un proceso de apoptosis

Dado que el proceso apoptótico está constituido por un conjunto de fenómenos simultáneos como la translocación de fosfatidil serina, desestabilización de la membrana mitocondrial, alteración del metabolismo energético y respiratorio, liberación de citocromo c, fragmentación del ADN, entre otras. El análisis por medio de la citometría de flujo hace posible medir la translocación de fosfatidil serina, así como, la fragmentación del ADN, lo que permitiría una comprensión de la relación temporal y espacial que hay entre los parámetros a analizar.

## **HIPÓTESIS:**

**E**n nuestro país la desnutrición representa un grave problema de salud pública. Los niños son quienes presentan mayor susceptibilidad a padecer este síndrome, dado a las exigencias nutricionales para su crecimiento óptimo.

La inducción de la desnutrición en modelos animales es una herramienta útil que permite simular algunos de los efectos observados en niños.

La deficiencia en nutrientes - proteínas y calorías - induce daño a diferentes niveles celulares, esto puede relacionarse con una susceptibilidad a presentar enfermedades infecciosas

Por lo anterior, se puede suponer que la desnutrición calórico proteínica puede inducir cambios en la maduración y en la selección de los linfocitos T y B en bazo, así como de linfocitos T en timo y sangre; lo que significaría diferencias en la frecuencia apoptótica entre células de organismos bien nutridos y desnutridos

## OBJETIVOS GENERALES

1. *Determinar el efecto de la dexametasona y la desnutrición sobre la apoptosis inducida in vitro.*
2. *Estudiar algunos aspectos de la apoptosis in vitro en cultivo de células de bazo, timo y sangre de ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia, usando citometría de flujo.*
3. *Determinar el efecto de la fitohemaglutinina in vitro en células de bazo, timo y sangre de ratas desnutridas.*

### 6.1. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la viabilidad de los distintos tejidos linfoides de rata expuestos a dexametasona y/o fitohemaglutinina en condiciones de cultivo mediante la incorporación de yoduro de propidio o exclusión de azul tripano.
- Establecer los requerimientos mínimos para la proliferación de cultivos celulares de timo, bazo y sangre de ratas.
- Establecer las condiciones de exposición a la dexametasona mediante una curva de dosis - respuesta y concentración - tiempo que permita un óptimo crecimiento de los tipos celulares y a su vez induzca la apoptosis.
- Determinar el nivel de apoptosis *in vitro* inducido por la exposición a la dexametasona en los tres tipos celulares, mediante el análisis por citometría flujo usando la formación de fragmentos nucleosomales y movimiento transmembranal de fosfatidil serina
- Evaluar el efecto de la fitohemaglutinina sobre la inducción *in vitro* de la apoptosis por la dexametasona en cultivos celulares de timo, bazo y sangre periférica de ratas bien nutridas y desnutridas.

## METODOLOGÍA

### 7.1. ANIMALES



*Figura 14. Ratas de la cepa Wistar de 21 días de edad, Criadas en el bioterio de la UAM-I*

Se emplearon ratas de la cepa Wistar (Figura 14) producidas en el Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa. Los animales se mantuvieron en ciclos de oscuridad (12/12 horas de luz / oscuridad), a una temperatura de 22 a 25 ° C y humedad relativa de 45 %. Para generar las condiciones se utilizaron madres de segundo parto, criadas con alimento balanceado para roedores (PMI 5001) y agua filtrada *ad libitum*, se mantuvieron en cajas de acrílico (Ortiz, y col., 1996), la disponibilidad de las ratas dependió de la capacidad de producción del bioterio. Los procedimientos experimentales y trato que recibieron los animales se desarrollaron de acuerdo a las guías aprobadas

institucionalmente (Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa); mismas que coinciden con los propuestos por el Instituto de Salud de los EE UU. AA.

### 7.2. DESNUTRICIÓN EXPERIMENTAL

La desnutrición se indujo por el método de competencia de alimento durante la lactancia propuesto por Ortiz y colaboradores (1999). Brevemente las ratas, al día siguiente de su nacimiento, se distribuyeron en dos grupos: grupo experimental DN

(Desnutridas) en el que se colocaron 15 crías con una nodriza bien nutrida, y grupo testigo BN (Bien Nutridas) (ver Figura 15) donde se colocaron siete crías por nodriza con siete crías. Se formó una camada de cada tipo en cada ocasión. Las crías se pesaron cada 2 o 3 días, desde el día uno hasta el día 21 (destete).

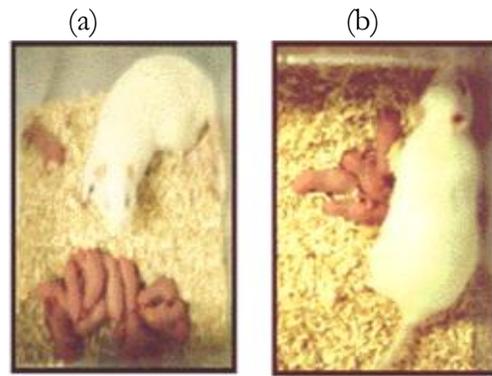


Figura 15. (a) ratas desnutridas  
(b) ratas bien nutridas

### 7.3. CULTIVO

Después de los 21 días de crecimiento, las ratas se anestesiaron con vapores de éter etílico, se les extrajo la sangre por punción cardíaca y posteriormente, el animal se sacrificó por dislocación cervical.

En condiciones de esterilidad se disectaron el bazo y el timo, que se colocaron en un tubo de polietileno de 5 mL con 1.5 mL de medio de cultivo McCoy 5a previamente incubado 15 min. a 37° C.

Los órganos se pesaron y tamizaron a través de una malla de nylon con diámetro de poro de 85µm, luego se resuspendieron en 1mL de medio ISCOVE. El conteo celular se determinó en una cámara de Neubauer tiñendo las células con colorante de Wright. Las células se cultivaron a una densidad de  $0.5 \times 10^6$  células en 1 mL de medio ISCOVE conteniendo 0.3 mL de fitohemaglutinina (PHA) (1mg / mL) (Sigma), los cultivos se incubaron a 37° C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5 % (Ortiz, y col., 1995).

### 7.4. MARCAJE POR ANEXINA -V

Uno de los cambios más relevantes de las células en apoptosis es la translocación de fosfatidil serina (PS) de la cara citosólica hacia la monocapa exterior; lo cual es

posible detectar usando Anexina-V, esta proteína marcada fluorescente con isotiocinato de fluoresceína (FITC) puede unirse PS señalizando su ubicación (Trump y Berezsky, 1992; 1995).

El marcaje combinando de Anexina-V-FITC con yoduro de propidio (IP), permite hacer un marcaje diferencial entre las células vivas que fueron negativas para ambas tinciones. Las células que sólo fueron positivas para Anexina-FITC, se consideraron en apoptosis temprana. Las células que fueron positivas para el marcaje con IP y Anexina-V FITC fueron consideradas como en apoptosis tardía.

El ensayo de marcaje con Anexina V se realizó según la técnica propuesta por el fabricante; Boehringer Mannheim GmbH Biochemica, Alemania.

1. A partir del cultivo celular se obtuvieron  $1 \times 10^6$  células, las cuales se lavaron con PBS + ABS, y centrifugaron a  $200 \times g$  por 5 minutos.
2. El paquete celular se resuspendió en  $100 \mu\text{L}$  de solución de marcaje  $20 \mu\text{L}$  del agente de marcaje Anexina-V en  $1000 \mu\text{L}$  de amortiguador Hepes ( $10 \text{mM}$  Hepes/NaOH, pH 7.4) y  $20 \mu\text{L}$  de la solución de trabajo de IP ( $50 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) y se incubó durante 10 ó 15 minutos.
3. Se adicionaron  $400 \mu\text{L}$  de amortiguador Hepes ( $10 \text{mM}$  Hepes/NaOH, pH 7.4)
4. La marca fluorescente que las células incorporaron se analizó en un citómetro de flujo usando una longitud de excitación de 488 nm y dos filtros para detectar la emisión, uno de 515 nm para la fluorescencia de la FITC y otro mayor de 560nm para la fluorescencia del Yoduro de Propidio (IP).

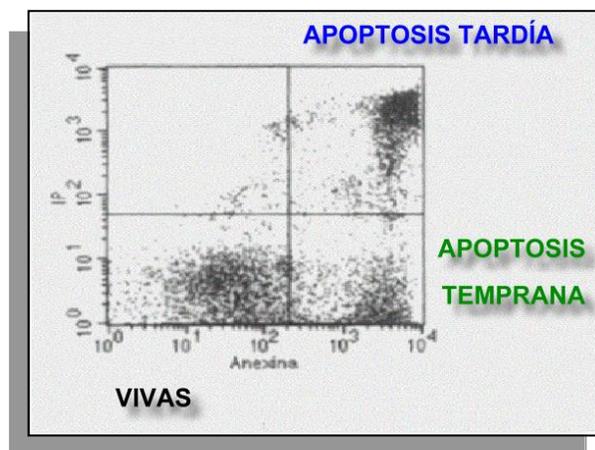


Figura 16. Discriminación de células según su marcaje con Anexina-V

Los datos se adquirieron y analizaron utilizando gráficas de punto (ver Figura 16), marcando cuatro cuadrantes. En la región inferior izquierda se determinó el

control negativo y comprendió a células que no tuvieron ningún tipo de marcaje (vivas). La región inferior derecha incluyó a las células que fueron marcadas con Anexina - V (apoptosis temprana) y la superior derecha correspondió a las células que presentaron tanto el marcaje con PI, así como, el de Anexina - V (apoptosis tardía). Para el análisis de los resultados se consideraron las dos regiones de apoptosis como una sola.

## **7.5. MARCAJE DE LAS ZONAS DE RUPTURA DE LA CADENA DE ADN (TUNEL).**

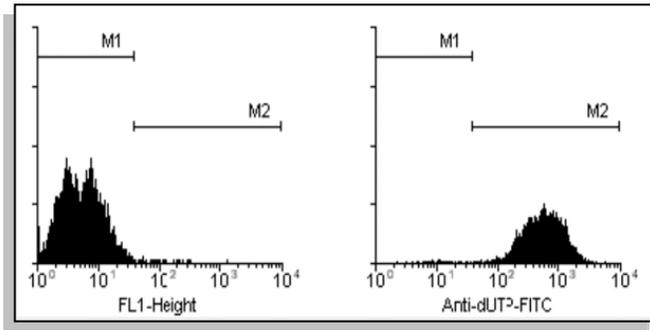
Un de los cambios celulares característicos en la apoptosis es la fragmentación del ADN por la activación de endonucleasas dependientes de  $Ca^{++}/Mg^{++}$ ; estas enzimas provocan cortes en la cadena de ADN en los espacios nucleosomales. El método de TUNEL, es llamado así, porque la enzima deoxinucleotidil transferasa Terminal (TdT), agrega nucleótidos biotinilados (dUTP), en estos puntos de ruptura (Trump y Berezsky, 1992).

Cuando los nucleótidos biotinilados han sido incorporados se pueden detectar por estreptavidina conjugada con un fluorocromo y un anticuerpo anti-dUTP o un anticuerpo de anti-digoxigenina marcada con un fluorocromo.

Entonces, se usó el ensayo de TUNEL descrito por Gold y col., (1993), utilizando un ensayo comercial siguiendo las condiciones sugeridas por fabricante para realizar el análisis de muerte celular in situ, (Boehringer Mannheim GmbH Biochemica, Alemania).

1. Las células se lavaron dos veces en PBS/ABS al 1% a 4° C a 300xg por 10 min
2. Se ajustó el volumen para tener  $1 \times 10^6$  en 2.5mL de PBS/ABS 1%
3. Se tomó 1mL de la suspensión celular y se transfirió a un tubo que se colocó en hielo y se fijaron las células en 200 $\mu$ L de paraformaldehído al 4% en PBS (pH 7.4) por 30 minutos en agitación lenta
4. Se trasvasó la solución a un tubo estéril y se centrifugó a 300xg por 7 minutos
5. Se retiró el sobrenadante y se lavó con PBS (200 $\mu$ L) 10min a 300xg
6. El paquete celular se resuspendió en solución de permeabilización (Triton X-100 al 0.1% y citrato de sodio al 0.1% de (Sigma Chem.)) sobre hielo y se dejó por 2 min, pasado este tiempo se agregaron lentamente 2mL de PBS
7. Las células se lavaron dos veces con PBS e incubaron 60 minutos a 37° C

- con 50µL de la reacción de TUNEL que contenía TdT dUTP- fluorescente
8. Después las células se lavaron y el marcador se incorporó al ADN en los sitios dañados para visualizarlos por citometría de flujo.
  9. Se realizó el análisis de citometría de flujo usando una longitud de onda de excitación longitud 488 nm y un filtro para detectar la emisión de FITC de 515 nm.



*Figura 17. Discriminación de células apoptóticas según la incorporación de dUTP*

Los datos se adquirieron y analizaron en histogramas (ver Figura 17), marcando una primera zona cercana al origen delimitada por el control negativo, en donde las células que no incorporaron dUTP son células vivas, la segunda zona incluye las células muertas por apoptosis que si incorporaron dUTP.

## 7.6. MARCAJE DE CÉLULAS CON ANTICUERPOS DE SUPERFICIE

El marcaje con anticuerpos de superficie fue un paso indispensable para determinar las subpoblaciones de linfocitos que fueron más susceptibles a morir por apoptosis inducida por desnutrición o dexametasona. El anticuerpo utilizado reconoció estructuras glicosídicas localizadas en la membrana para cada tipo celular. De ésta forma el anticuerpo anti-CD4 se sabe que reconoce linfocitos colaboradores, el anticuerpo anti-CD8 a los linfocitos citotóxicos, el anti-CD45 reconoció linfocitos B y el anti-CD3 linfocitos T. En las células que fueron marcadas con los anticuerpos de superficie se determinó la apoptosis por la metodología mencionada (Anexina - V y/o TUNEL).

1. Las células se colectaron centrifugando a 200xg por 5 minutos.
2. Se lavaron con PBS + ABS al 1% centrifugando a 200x g por 5 minutos.
3. Del interior del paquete celular se tomaron 106 células, las cuales se lavaron con PBS + ABS al 1%, centrifugaron a 200xg por 5 minutos.
4. Para determinar las subpoblaciones de linfocitos, se adicionaron 20µL de una solución con anticuerpos contra proteínas de superficie asociados con

fluorocromos (PharMingen Dickinson Co.), como se indica en el Cuadro 1 donde se muestran los anticuerpos usados para tipificar las células, y se incubaron por 20 min. en oscuridad a temperatura ambiente

5. Las células se lavaron con PBS + ABS al 1% y se centrifugaron a 200x g por 5 minutos.
6. El citómetro de flujo se calibró usando un control negativo (células sin marcaje)

<i>Cuadro 1. Marcaje con anticuerpos de superficie</i>				
	<b>Órgano</b>			
	<b>Anti-CD4 (Cy-Chrome)</b>	<b>Anti-CD8 (PE)</b>	<b>Anti-CD45 (Cy-Chrome)</b>	<b>Anti-CD3 (PE)</b>
<b>Timo</b>	+	+	-	-
<b>Bazo</b>	-	-	+	+
<b>Sangre</b>	+	+	-	-

*PE = Ficoeritrina*

## 7.7. CITOMETRÍA DE FLUJO



*Figura 18 Citómetro de flujo FACScan Becton Dickinson, mmunocytometry Systems, San Jose, CA*

Las mediciones se realizaron en un citómetro de flujo FACScan (Figura 18) equipado con un láser de Argón (488nm). El equipo se ajustó utilizando microesferas (CaliBrite beads) y el software Facscomp. Las células fueron adquiridas y analizadas usando el programa computacional CELL Quest (BDIS), por cada tratamiento se adquirieron 10,000 células.

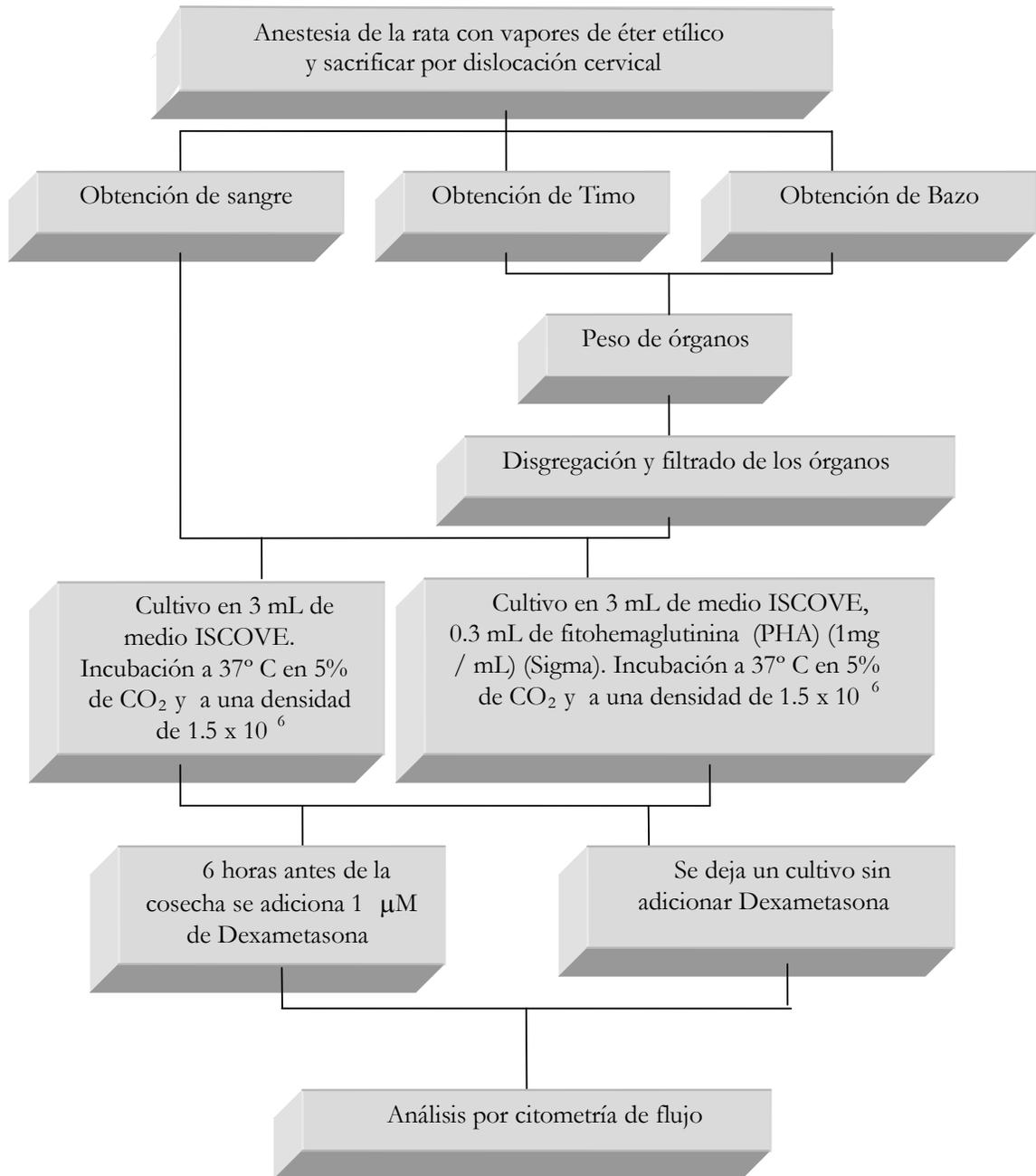
## 7.8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

En todos los casos se obtuvo el promedio  $\pm$  desviación estándar de células vivas y muertas en los cuadrantes que se establecieron usando controles negativos (sin tratamiento).

Los valores promedio de peso corporal y de timo y bazo en ambos grupos de animales, se compararon por la prueba de U de Mann - Whitney. El análisis estadístico se realizó por medio del análisis de Kruskal-Wallis con un  $\alpha= 0.05$ , Tomando como referencia los cultivos de rata BN, sin tratamiento con el fin de comparar el efecto de la desnutrición y la inducción de apoptosis por DEX sobre timo, bazo y sangre, así como, de cada subpoblación.

De igual manera, se usó esta última prueba para, determinar el efecto de la PHA y la DEX entre los grupos testigo y experimental.

## 7.9. ESQUEMA GENERAL DEL CULTIVO DE CÉLULAS DE BAZO, TIMO Y SANGRE



## RESULTADOS

Cuadro 2 Peso corporal de las ratas bien nutridas (BN) y desnutridas por competencia alimenticia (DN) a los 21 de nacidas.

	BN (g)	DN (g)	Déficit (%)*
	62.6	34.6	35.9
	62.0	30.0	44.4
	60.0	30.0	44.4
	50.7	29.6	45.1
	50.8	27.4	49.2
	55.6	26.6	50.7
	53.2	26.2	51.4
	60.7	25.1	53.6
	53.3	23.0	57.4
	44.8	23.0	57.4
	60.4	22.9	57.7
	41.4	21.7	59.8
	46.0	21.5	60.1
<b>n</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	
<b>promedio</b>	<b>54.0</b>	<b>26.3</b>	<b>51.3</b>
<b>D. E.</b>	<b>7.0</b>	<b>4.0</b>	<b>7.3</b>

\*100-((peso rata DN\*100)/promedio del peso de las ratas BN)

### 8.1. PESO DE LAS RATAS

Se estudiaron 13 ratas bien nutridas (BN) y 13 desnutridas (DN), de 21 días de edad. En el Cuadro 2 se muestran los pesos individuales y promedios de las ratas analizadas en este trabajo, donde se observa que el peso promedio del grupo testigo fue de  $54.0 \pm 7.02\text{g}$ , por otra parte el grupo experimental fue de  $26.3 \pm 4.0\text{g}$ , comprobándose por una prueba de U de Mann - Whitney que son diferentes estadísticamente ( $p < 0.05$ ). Igualmente se observa el déficit de peso en las ratas DN, que en promedio fue  $51.3\% \pm 7.3$  variando en un intervalo de  $35.9\text{g}$  a  $60.1\text{g}$ , por lo que se puede considerar como ratas con desnutrición grave.

## 8.2. PESO DE LOS ÓRGANOS

Cuadro 3. Peso promedio de timo y bazo de ratas BN y DN de 21 días de edad y porcentaje que representan los órganos del peso corporal total.

	bazo		Timo	
	BN	DN	BN	DN
<b>promedio de peso (mg)</b>	272	87	188	55
<b>D. E.</b>	33.5	35.2	79.9	15.3
<b>Déficit (%)</b>		68.0		70.8
<b>N</b>	8	9	11	11

Se pesaron 8 bazos de ratas BN y 9 de ratas DN, igualmente se pesaron 11 timos de ratas BN y DN de 21 días de nacidas. En el Cuadro 3 se muestra que el peso promedio de bazo del grupo testigo fue de  $272 \pm 33.5\text{mg}$ , comparándolo con el del grupo experimental que fue de  $87 \pm 35.2\text{mg}$ . En cuanto al

peso de los timos de ratas BN en promedio pesan  $188 \pm 79.9\text{mg}$ , y los de ratas DN  $55 \pm 15.3\text{mg}$ . La diferencia fue estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ).

## 8.3. VIABILIDAD EN LAS CÉLULAS DE TIMO, BAZO Y SANGRE, SIN TRATAMIENTO DESPUÉS DE 72H. DE CULTIVO

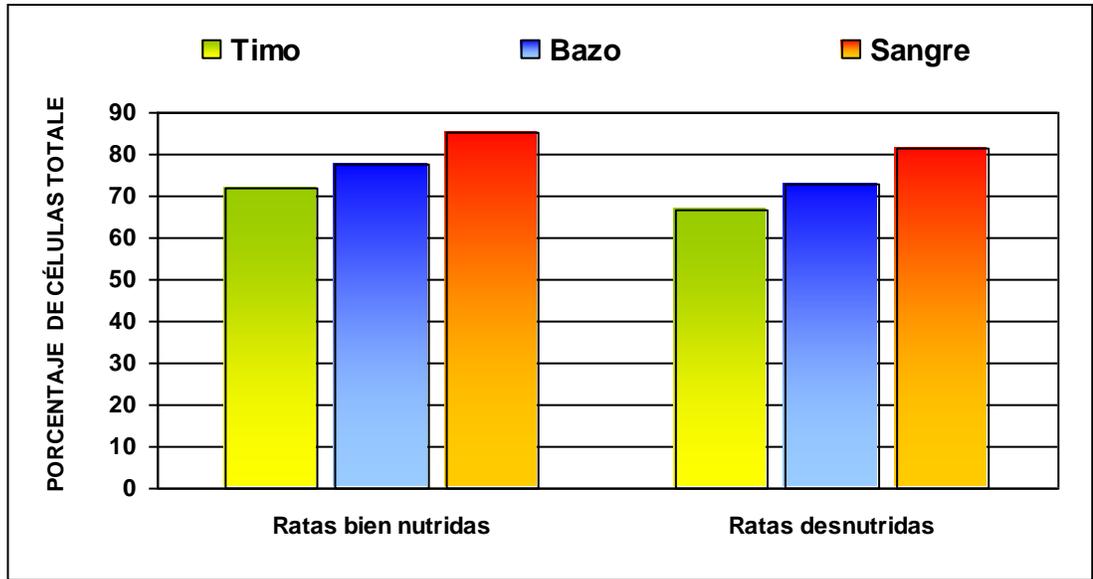
En el Cuadro 4, se muestra la viabilidad promedio, tanto en ratas BN, como en DN, analizada por la incorporación de IP. Como se puede observar en la Gráfica 1 la viabilidad en las células de rata BN fue ligeramente mayor. En este análisis se usaron 8 bazos de ratas BN, 9 de ratas DN, 11 timos de ratas BN y 11 de ratas DN, de igual manera se usaron 11 ratas BN y 11 ratas DN para la determinación en sangre. Cuando se compararon estadísticamente no hubo diferencias significativas

Cuadro 4. Viabilidad promedio de células de timo, bazo y sangre de ratas de 21 días de edad.

	BN	DN
<b>Timo</b>	$71.9 \pm 1.19$ (n = 11)	$66.8 \pm 1.87$ (n = 11)
<b>Bazo</b>	$77.5 \pm 4.12$ (n = 8)	$72.9 \pm 1.20$ (n = 9)
<b>Sangre</b>	$85.2 \pm 10.14$ (n = 11)	$81.2 \pm 10.45$ (n = 11)

entre ambos grupos, ni entre órganos. Por lo que podemos suponer que bajo las condiciones de cultivo propuestas la desnutrición no

afecta la viabilidad de las células de timo, bazo y sangre.

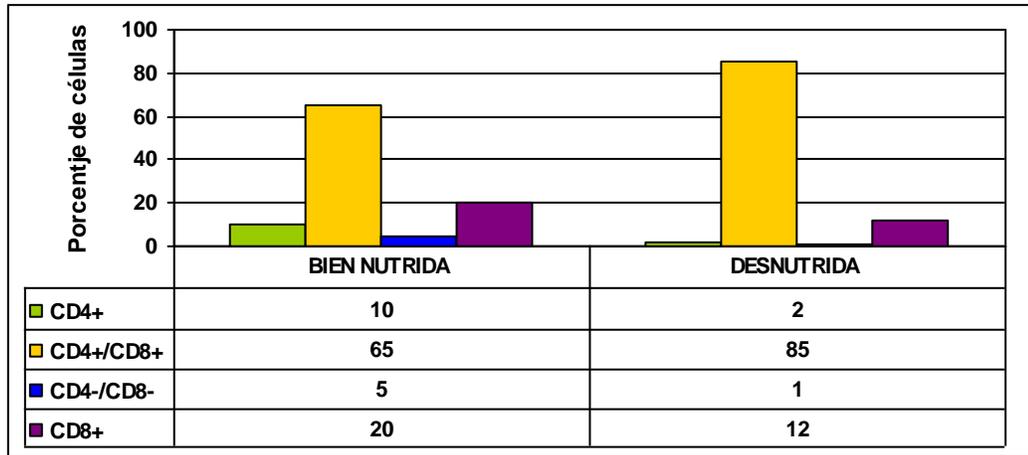


Gráfica 1. Comparación entre los porcentajes de células vivas de timo, bazo y sangre de ratas bien nutridas y desnutridas después de 72h.de cultivo

#### 8.4. DETERMINACIÓN DE LOS FENOTIPOS CELULARES PRESENTES EN TEJIDOS DE RATA

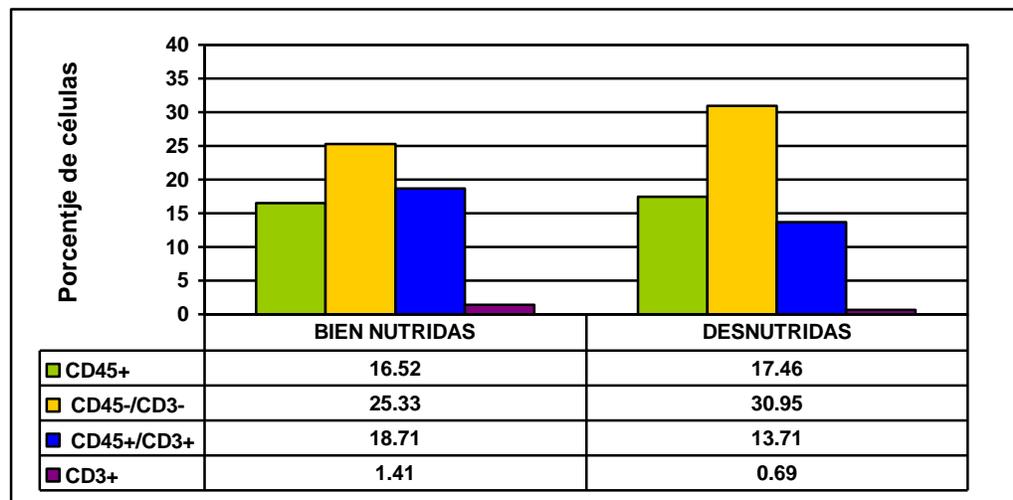
Se determinó el porcentaje de las subpoblaciones celulares presentes en timo (4 ratas BN y 5 DN), bazo (3 ratas BN y 3 DN) y sangre (3 ratas BN y 3 DN), en tejidos no expuestos a ningún tratamiento.

Se determinó que la sub-población predominante en el timo en ambos grupos de ratas, es la de células CD4+/CD8+ (65%), siendo en el grupo DN (85%), por otro lado la subpoblación con menor presencia fue la de células CD4-/CD8-. Las células más diferenciadas (sólo CD4+ y sólo CD8+) se presentaron en proporción intermedia. Sin embargo, en el grupo DN, comparado con los valores observados en organismos BN, mostraron proporciones similares entre los fenotipos CD4-/CD8- y CD4+ (Gráfica 2).



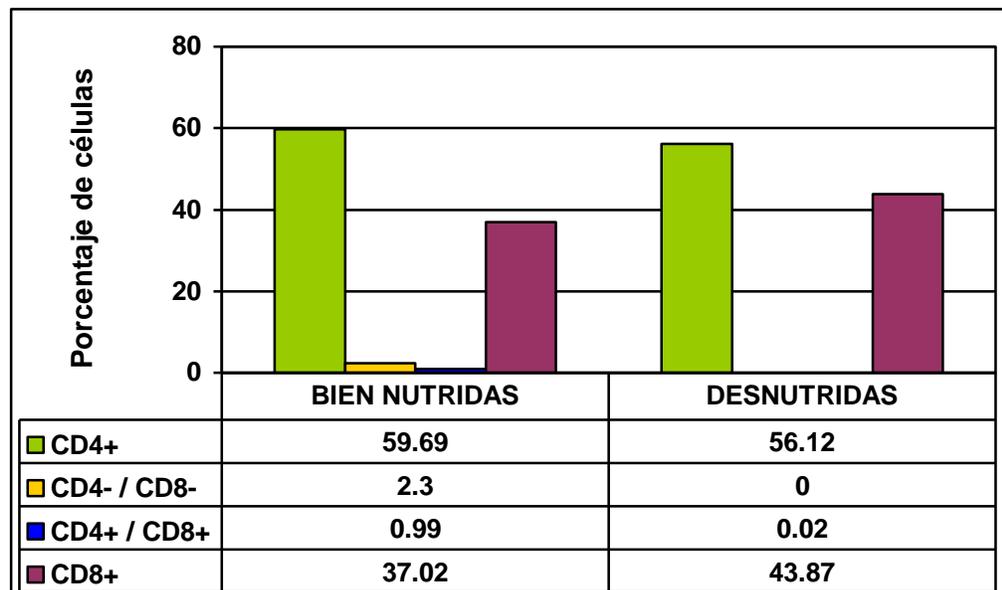
Gráfica 2. Diferentes fenotipos presentes en células de timo después de 72h. de cultivo.

En la Gráfica 3, se muestran los resultados de las células de bazo que fueron marcadas por los anticuerpos anti CD3 (Linfocitos T) y CD45 (marcador genérico de leucocitos, preferentemente de linfocitos B). Como se puede observar hay una mayor proporción de células del estroma en las células de bazo de rata desnutrida, así como, una alta proporción de linfocitos B. Por el contrario, existe una mayor frecuencia de linfocitos T en células de bazo de rata bien nutrida.



Gráfica 3. Diferentes fenotipos presentes en células de bazo después de 72hr. de cultivo.

En la Gráfica 4, se muestran los resultados de los promedios de las subpoblaciones celulares en sangre. Para determinarlas se utilizaron los marcadores CD4+ y CD8+. En este caso los grupos de dobles positivas y dobles negativas fueron los más bajos, presentando la mayor proporción las células CD4+ y CD8+ respectivamente,



Gráfica 4. Diferentes fenotipos presentes en células de sangre después de 72 h. de cultivo.

Como se puede observar en los resultados anteriores (Gráficas 2 a 4), las células en cultivo de timo, bazo y sangre de ambos grupos de ratas estudiados, presentan porcentajes similares de los diferentes tipos celulares en los tres órganos analizados bajo las condiciones de cultivo utilizadas.

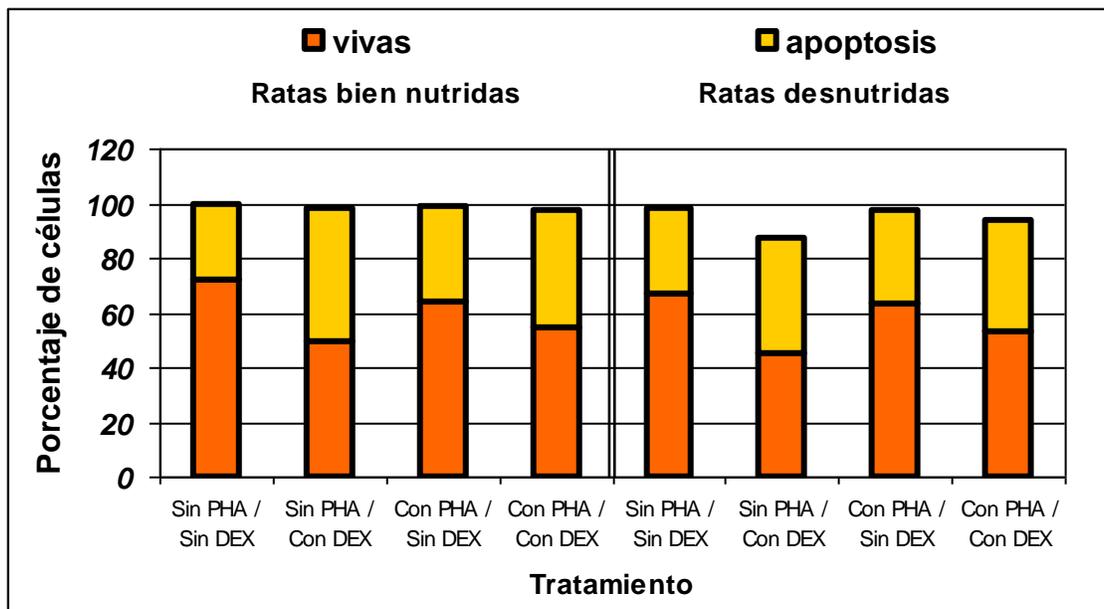
## 8.5. DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS DE TIMO POR MEDIO DE ANEXINA- V /IP

Como se ha descrito en la metodología, la Anexina ha sido usada como de apoptosis. Por medio de esta técnica fue posible determinar los porcentajes promedio de células vivas y en apoptosis (Gráfica 5). En cuanto a células de timo en cultivo, de 3 ratas BN y 2 DN, como se observa que en el Cuadro 5, se muestran los promedios y las desviaciones estándar obtenidos en ambos grupos de ratas.

Se observa que en el grupo BN las células sin tratamiento, presentan menor frecuencia de células en apoptosis, en comparación con las células tratadas con

DEX. Se determinó por medio del análisis de Kruskal-Wallis, que existía diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), después del tratamiento con PHA o DEX.

En los dos grupos de ratas se observa de forma clara lo que se representa en la Gráfica 5, en donde los cultivos sin tratamiento, presentaron en promedio una mayor viabilidad, sin embargo es similar al que se trato con PHA; por otra parte, excepto los cultivos tratados con DEX, los porcentajes de muerte por apoptosis son mayores a los de necrosis aunque, los porcentajes de la última, son mayores en comparación a los del grupo BN. Se determinó por el análisis de Kruskal-Wallis, que existía diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), entre los cultivos del grupo DN.



Gráfica 5. Frecuencia de células de timo vivas o en apoptosis después de 72h. de cultivo, ante diferentes tratamientos, analizadas por medio del marcaje de fosfatidil serina con Anexina - V.

Para comprobar si la desnutrición influía sobre la muerte por apoptosis se realizó otro análisis de Kruskal-Wallis, comparando los valores de los cultivos BN contra los DN, observándose una diferencia significativa entre ambos grupos ( $p < 0.05$ ).

Cuadro 5. Efecto de la PHA y DEX sobre células de timo de ratas bien nutridas (BN) y desnutridas (DN).

	RATAS BIEN NUTRIDAS				RATAS DESNUTRIDAS			
	-P/-D	-P/+D	+P/-D	+P/+D	-P/-D	-P/+D	+P/-D	+P/+D
<b>vivas</b>	71.9	40.7	64.7	55.9	66.7	39.33	56.44	50.4
	±1.16	±1.06	±1.77	±1.15	±1.87	±0.57	±1.73	±1.76
<b>apoptosis</b>	28.1	59.4	35.27	44.12	31.2	42.1	34.19	40.48
	±1.16	±1.06	±1.77	±1.15	±2.38	±0.05	±0.57	±0.6

PHA= P DEX= D. n= 3 Ratas bien nutridas y n= 2 ratas desnutridas

### 8.6. DETERMINACIÓN DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR DEX Y/O DESNUTRICIÓN EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES CELULARES EN TIMO, DETERMINADA POR MEDIO DE ANEXINA-V/IP

Para identificar cual fue la sub-población que presenta mayor susceptibilidad a sufrir muerte por apoptosis en ambos grupos, se consideró como 100% aquellas células que presentaban únicamente marcaje por Anexina - V. Estos datos se consideraron preliminares, ya que se realizó hasta el momento de la escritura del presente trabajo, un solo cultivo de timo de rata BN y DN marcado con anticuerpos de superficie y por lo tanto no se realizó una prueba estadística para determinar las diferencias entre ellos. En el Cuadro 6 se muestran los datos del grupo BN, a excepción de los cultivos tratados con PHA, en los demás tratamientos las células dobles positivas presentaron una frecuencia de células en apoptosis de casi el 90%, bajo este mismo tratamiento, las células CD8+ fueron las que más mortalidad presentaron. En el Cuadro 7, se muestran las frecuencias de células en apoptosis obtenidas a partir de timo de rata desnutrida, en donde se observa que todas las células CD4+ / CD8+ presentan la mayor mortalidad (en promedio superior al 90%).

Cuadro 6. Porcentajes de apoptosis en células de timo de ratas bien nutridas muertas por apoptosis

	% DE CÉLULAS EN APOPTOSIS			
	CD4+	CD4+/CD8+	CD4-/CD8-	CD8+
<b>S/DEX S/PHA</b>	1.00	93.9	0.1	5.1
<b>C/DEX S/PHA</b>	0.8	95.4	0.1	3.8
<b>S/DEX C/PHA</b>	0.01	0.6	1.0	98.4
<b>C/DEX C/PHA</b>	1.20	89.9	0.2	8.8

Cuadro 7. Porcentajes de apoptosis en células de timo de ratas desnutridas muertas por apoptosis

	% DE CÉLULAS EN APOPTOSIS			
	CD4+	CD4+/CD8+	CD4-/CD8-	CD8+
<b>S/DEX S/PHA</b>	1.07	94.6	0.04	4.3
<b>C/DEX S/PHA</b>	1.9	94.2	0.03	4.0
<b>S/DEX C/PHA</b>	1.7	91.8	0.06	6.5
<b>C/DEX C/PHA</b>	1.05	93.2	0.01	5.8

## 8.7. DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS DE TIMO, POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE TUNEL

Se determinaron los porcentajes promedio de células vivas y en apoptosis después de la aplicación de los diferentes tratamientos utilizados en células de timo en cultivo, de 7 ratas BN (excepto el grupo +/- en que se usaron 6 ratas BN); y 4 DN (excepto el grupo -/-, en que se usaron 5 ratas DN). Los porcentajes obtenidos se representan en la Gráfica 6.

En el Cuadro 8, se muestran los promedios y las desviaciones estándar en ambos grupos de animales. En el grupo BN, se observando que las células sin tratamiento presentan la frecuencia de células en apoptosis más baja.

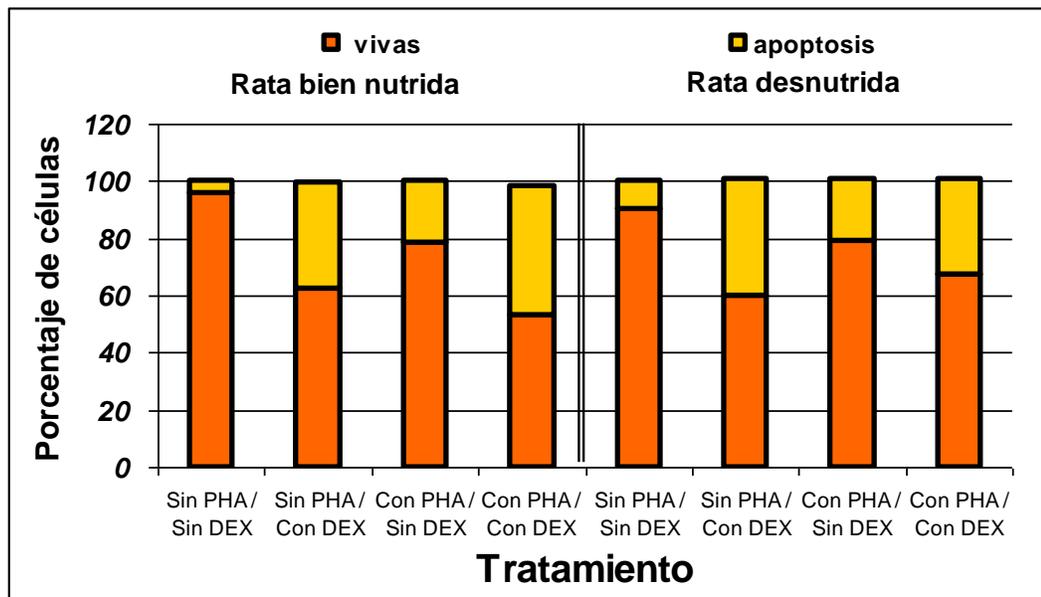
En contraste, en las células que fueron tratadas con DEX, presentaron la mayor frecuencia de apoptosis. Las células estimuladas con PHA presentaron un promedio de células vivas de  $78.6 \pm 1.1$ , siendo mayor en comparación al observado en los

cultivos tratados con DEX. Se observó también que los cultivos tratados con PHA/DEX presentaron un promedio intermedio al de los cultivos tratados sólo con PHA o sólo con DEX. Se determinó, que existía diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), después del tratamiento con PHA o DEX.

También en el Cuadro 8, se presentan los porcentajes promedio obtenidos a partir del grupo DN, en donde se determinó que los cultivos sin tratamiento, presentaron en promedio una mayor frecuencia de células vivas.

Se comprobó, que existía diferencia significativa ( $p < 0.05$ ), entre los cultivos del grupo DN.

Para comprobar si la desnutrición influía sobre la muerte por apoptosis se compararon los valores de los cultivos BN contra los DN, observándose una diferencia significativa entre ambos grupos ( $p < 0.05$ ).



Gráfica 6. Frecuencia de células de timo vivas o en apoptosis después de 72h. de cultivo, ante diferentes tratamientos analizadas por medio de la incorporación de dUTP.

Cuadro 8. Efecto de la PHA y DEX sobre células de timo de ratas bien nutridas (BN) y desnutridas (DN)

	RATAS BIEN NUTRIDAS				RATAS DESNUTRIDAS			
	-P/-D	-P/+D	-P/-D	-P/+D	-P/-D	-P/+D	-P/-D	-P/+D
<b>vivas</b>	95.6 ±0.77	62.5 ±1	78.6 ±1.07	53.3 ±1.76	90.2 ±5.94	59.9 ±1.23	79.2 ±4.66	67.6 ±2.96
<b>apoptosis</b>	4.3 ±0.40	37.1 ±0.59	21.4 ±1.07	45.3 ±3.03	10.2 ±6.10	40.9 ±2.58	21.8 ±5.18	33.4 ±1.7

PHA = P DEX = D. n = 7 Ratas bien nutridas (excepto +P / +D n = 6) n = 6 ratas desnutridas (excepto -P / -D n=5)

### 8.8. DETERMINACIÓN DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR DEX Y/O DESNUTRICIÓN EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES CELULARES EN TIMO, DETERMINADA POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE TUNEL

Se determinaron las subpoblaciones celulares más susceptibles a apoptosis inducida por DEX y/o desnutrición, las cuales se identificaron por la incorporación de dinucleótidos con marca fluorescente. Se tomó como 100% las células que presentaban únicamente marcaje por dinucleótidos, de los que se determinó el porcentaje promedio para cada uno de los tratamientos, éste procedimiento se realizó en ambos grupos.

En el Cuadro 9, se muestran los datos de 5 ratas BN, la sub-población más sensible en todos los tratamientos fue la de las células CD4+/CD8+, y las menos sensibles en general fueron las CD4-/CD8-. En el Cuadro 10, se muestran los promedios de 4 ratas desnutridas, observándose nuevamente que las células CD4+/CD8+, son la sub-población que mueren en su mayoría.

Cuadro 9. Porcentaje promedio de células en apoptosis de timo de ratas bien nutridas

	% DE CÉLULAS EN APOPTOSIS			
	CD4+	CD4+/CD8+	CD4-/CD8-	CD8+
<b>S/DEX S/PHA</b>	1.6 ± 0.51	83.6 ± 1.91	0.3 ± 0.04	13.5 ± 1.09
<b>C/DEX S/PHA</b>	0.9 ± 0.09	86.3 ± 1.86	0.4 ± 0.04	7.05 ± 2.82
<b>S/DEX C/PHA</b>	5.1 ± 0.19	78.8 ± 0.93	1.3 ± 0.26	13.8 ± 0.84
<b>C/DEX C/PHA</b>	0.9 ± 0.11	86.5 ± 1.91	0.1 ± 0.008	12.2 ± 1.49

Cuadro 10. Porcentaje promedio de células en apoptosis de timo de ratas desnutridas

	% DE CÉLULAS EN APOPTOSIS			
	CD4+	CD4+/CD8+	CD4-/CD8-	CD8+
<b>S/DEX S/PHA</b>	2.1 ± 0.03	84.8 ± 1.18	1.5 ± 0.16	11.3 ± 2.11
<b>C/DEX S/PHA</b>	1.5 ± 0.23	81.6 ± 0.79	0.1 ± 0.03	16.8 ± 0.64
<b>S/DEX C/PHA</b>	0.3 ± 0.03	80.2 ± 1.45	0.2 ± 0.08	19.2 ± 1.39
<b>C/DEX C/PHA</b>	1.7 ± 0.36	81.7 ± 1.39	0.7 ± 0.08	15.9 ± 1.13

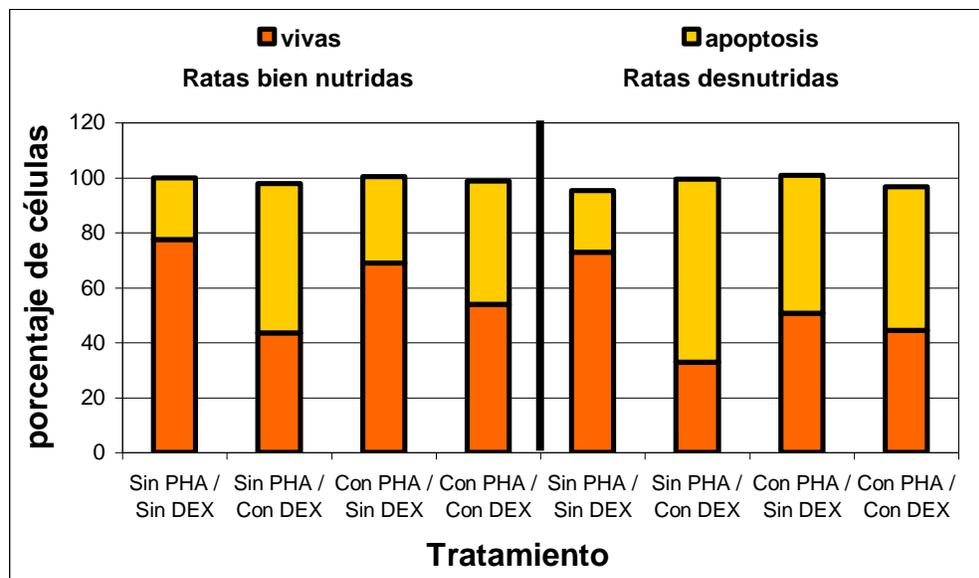
### 8.9. DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS DE BAZO POR MEDIO DE ANEXINA- V /IP

Por medio del análisis de la incorporación de fofatidil serina, se determinaron los porcentajes promedio de células vivas, en apoptosis y necrosis, tras la aplicación de los diferentes tratamientos utilizados en células de bazo en cultivo, de 2 ratas BN y 2 DN (Gráfica 7). En el Cuadro 11, se muestran los promedios obtenidos del grupo BN, donde se observa un comportamiento similar al de timo.

Las células sin tratamiento son las que presentaron mayor viabilidad, las tratadas con DEX presentaron la menor viabilidad, se determinó que existían diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Al comparar los porcentajes promedio obtenidos a partir del grupo DN con el grupo de ratas BN, se observó una mayor frecuencia de células vivas, esta frecuencia disminuye en más del 50% en los cultivo tratados con DEX. Se determinó que existía diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

Con el fin de determinar si la desnutrición influía en la muerte y tipo de esta, se compararon los grupos BN vs. DN, observándose una diferencia significativa entre ambos grupos ( $p < 0.05$ ).



Gráfica 7. Frecuencia de células de bazo vivas o en apoptosis después de 72h. de cultivo, ante diferentes tratamientos, analizadas por medio del marcaje de fosfatidil serina con Anexina - V.

Cuadro 11. Efecto de la PHA y DEX sobre células de bazo de rata bien nutrida (BN) y desnutrida (DN).

	RATAS BIEN NUTRIDAS				RATAS DESNUTRIDAS			
	-P/-D	-P/+D	-P/-D	-P/+D	-P/-D	-P/+D	-P/-D	-P/+D
vivas	77.5 ±2	43.4 ±0.7	68.8 ±0.8	53.8 ±7.6	72.9 ±1.2	32.9 ±1.7	50.6 ±0.6	44.3 ±0.6
apoptosis	22.3 ±1.4	54.5 ±5.2	31.5 ±1.5	45.0 ±6.0	27.0 ±1.4	66.6 ±1.0	50.1 ±4.9	52.2 ±3.2

PHA= P DEX= D. n= 2 Ratas bien nutridas y n= 2 ratas desnutridas

## 8.10. DETERMINACIÓN DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR DEX Y / O DESNUTRICIÓN EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES CELULARES EN BAZO, DETERMINADA POR MEDIO DE ANEXINA-V/IP

La susceptibilidad de las distintas subpoblaciones celulares a dirigirse hacia la muerte celular programada, que fue inducida por DEX y/o desnutrición, se determinó tomando como 100% las células que presentaban únicamente marcaje por Anexina – V, de aquí se determinó el porcentaje promedio de cada una de ellas, este procedimiento se realizó en ambos grupos (2 ratas BN y 2 DN). Como se mencionó previamente los marcadores anti CD3 y anti CD45, permitieron discriminar entre células T, leucocitos (preferentemente linfocitos B) y células del estroma, las proporciones de las células dobles negativas no fueron consideradas para el análisis de los datos. En el Cuadro 12, se observa que los leucocitos preferentemente linfocitos B (CD45+) obtenidos de bazo del grupo BN son más susceptibles a morir por apoptosis, sobre todo en los cultivos tratados con DEX y PHA simultáneamente. En el Cuadro 13, se muestran los porcentajes promedios y las desviaciones estándar obtenidas en el grupo DN, donde se puede observar la misma tendencia que en el grupo BN.

Cuadro 12. Porcentaje promedio de células en apoptosis de bazo de rata bien nutridas

	% DE CÉLULAS EN APOPTOSIS			
	CD45+	CD3+/CD45+	CD3-/CD45-	CD3+
<b>S/DEX S/PHA</b>	79.8 ± 9.1	0.7 ± 0.7	19.4 ± 8.3	0.06 ± 0.08
<b>C/DEX S/PHA</b>	85.1 ± 3.1	0.8 ± 0.8	14.1 ± 2.3	0.00 ± 0.00
<b>S/DEX C/PHA</b>	93.2 ± 1.0	1.7 ± 0.8	5.3 ± 0.1	0.03 ± 0.04
<b>C/DEX C/PHA</b>	96.0 ± 0.1	1.2 ± 1.1	2.83 ± 0.3	0.04 ± 0.06

Cuadro 13. Porcentaje promedio de células en apoptosis de bazo de rata desnutridas

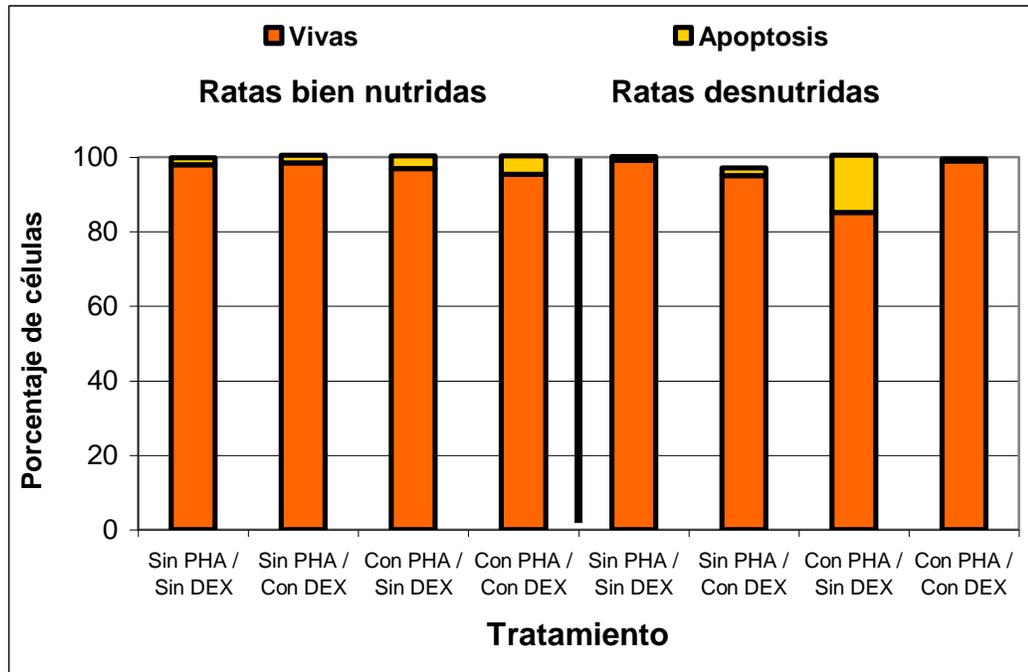
	% DE CÉLULAS EN APOPTOSIS			
	CD45+	CD3+/CD45+	CD3-/CD45-	CD3+
S/DEX S/PHA	80.6 ± 4.6	0.7 ± 0.4	18.7 ± 4.2	0.06 ± 0.06
C/DEX S/PHA	80.9 ± 5.2	0.86 ± 1.0	18.3 ± 6.2	0.02 ± 0.02
S/DEX C/PHA	96.4 ± 1.9	1.1 ± 1.0	2.5 ± 1.0	0.00 ± 1.3
C/DEX C/PHA	94.2 ± 2.4	1.6 ± 1.1	4.2 ± 0.0	0.01 ± 0.01

### 8.11. DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS DE BAZO, POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE TUNEL

Los porcentajes promedio de células vivas y en apoptosis se determinaron después de la aplicación de los diferentes tratamientos utilizados en células de bazo en cultivo, de 4 ratas BN (excepto el grupo +/+ en que se usaron 3 ratas BN); y 4 DN (excepto el grupo +/+, en que se usaron 3 ratas DN) (Gráfica 8). En el Cuadro 14, se muestran los promedios sobre la viabilidad obtenidos en ambos grupos. En los cultivos celulares de bazo de ratas BN, se observó que la viabilidad en promedio fue mayor al 90%, los cultivos tratados con DEX, presentaron una mayor inducción de apoptosis. Se determinó que no existían diferencias significativas ( $p > 0.05$ ), en la variabilidad dentro de los grupos y entre ellos.

En el Cuadro 14, se presentan los porcentajes promedio obtenidos a partir del grupo BN y DN, en donde se observaron valores similares al grupo anterior. Se determinó que no existía diferencia significativa ( $p > 0.05$ ), entre los cultivos del grupo DN.

Para comprobar si la desnutrición influía sobre la muerte por apoptosis se compararon los valores de los cultivos BN contra los DN, observándose una diferencia significativa entre ambos grupos ( $p < 0.05$ ).



Gráfica 8. Efecto de los diferentes tratamientos en células de bazo de ratas BN y DN, los resultados mostrados son los promedios de los porcentajes de las células en cada uno de los tratamientos determinados por la técnica de TUNEL

Cuadro 14. Efecto de la PHA y DEX sobre células de Bazo de rata bien nutrida (BN) y desnutrida (DN)

	RATAS BIEN NUTRIDAS				RATAS DESNUTRIDAS			
	-P/-D	-P/+D	-P/-D	-P/+D	-P/-D	-P/+D	-P/-D	-P/+D
Vivas	98.0 ± 1.3	98.4 ± 1.2	97.0 ± 2.5	95.4 ± 1.5	99.1 ± 0.5	95.1 ± 4.0	85.1 ± 2.2	98.9 ± 1.5
apoptosis	1.9 ± 1.2	2.1 ± 1.2	3.5 ± 2.0	5.0 ± 1.4	1.1 ± 0.6	2.0 ± 1.3	15.3 ± 2.0	0.6 ± 0.3

PHA = P DEX = D. n = 4 Ratas bien nutridas (excepto +P / +D n = 3) n = 4 ratas desnutridas (excepto +P / +D n = 3)

## 8.12. DETERMINACIÓN DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR DEX Y / O DESNUTRICIÓN EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES CELULARES EN BAZO, DETERMINADA POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE TUNEL

La susceptibilidad a presentar apoptosis inducida por medio de la DEX y/o desnutrición, se determinó en las distintas subpoblaciones de linfocitos, para ello se tomó como el 100% las células que presentaban únicamente marcaje de dUTP, determinándose el porcentaje promedio de cada una de ellas, éste procedimiento se realizó en ambos grupos (3 ratas BN y 3DN); en el Cuadro 15, como se puede observar las células B (CD45+) son más susceptibles a morir por apoptosis, se observó que en los cultivos celulares testigo tuvieron la tasa más alta.

En el Cuadro 16 se muestran los porcentajes promedios del grupo DN, se observa que las células B son más sensibles a presentar apoptosis, siendo los cultivos testigos los que tienen la mortalidad más alta.

Cuadro 15. Porcentaje promedio de células en apoptosis de bazo de rata bien nutridas

	% DE CÉLULAS EN APOPTOSIS			
	CD45+	CD3+/CD45+	CD3-/CD45-	CD3+
S/DEX S/PHA	11.8 ±0.59	86.2 ±0.46	2.4 ±0.18	0.2 ±0.19
C/DEX S/PHA	31.7 ±0.53	60.5 ±0.19	6.1 ±0.45	1.5 ±0.12
S/DEX C/PHA	25.8 ±0.25	64.5 ±0.82	11.0 ±0.36	1.2 ±0.19
C/DEX C/PHA	22.4 ±0.93	70.7 ±0.73	6.8 ±0.21	0.4 ± 0.22

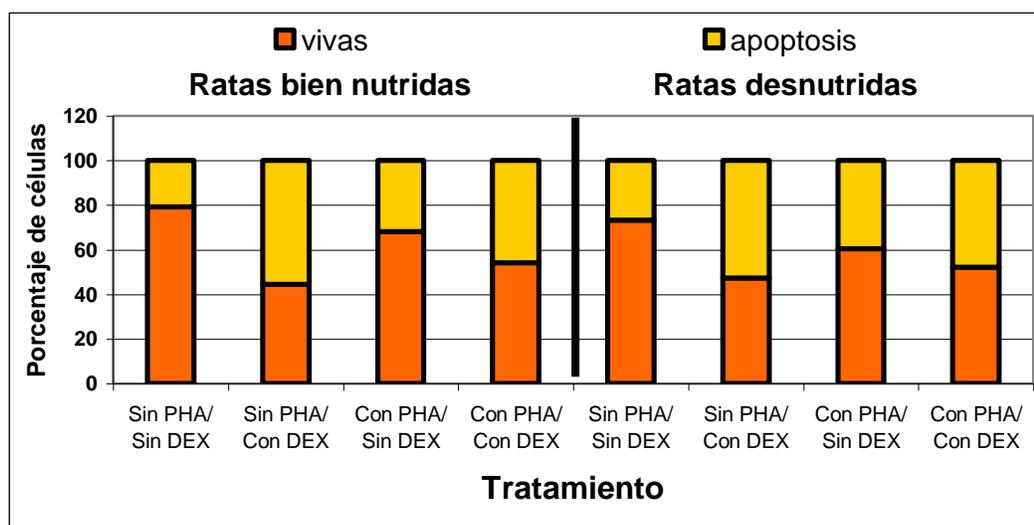
Cuadro 16. Porcentaje promedio de células en apoptosis de bazo de rata desnutridas

	% DE CÉLULAS EN APOPTOSIS			
	CD45+	CD3+/CD45+	CD3-/CD45-	CD3+
S/DEX S/PHA	9.6 ±0.37	86.0 ±0.35	2.9 ±0.61	1.6 ±0.13
C/DEX S/PHA	28.0 ±2.42	63.2 ±2.51	6.9 ±0.59	2.0 ±0.57
S/DEX C/PHA	25.0 ±1.78	63.7 ±2.30	9.5 ±2.48	1.8 ±0.84
C/DEX C/PHA	17.4 ±1.53	75.4 ±2.26	6.0 ±1.46	1.2 ±0.49

### 8.13. DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS DE SANGRE POR MEDIO DE ANEXINA- V /IP

Los porcentajes promedio de células vivas y en apoptosis se determinaron después de la aplicación de los diferentes tratamientos utilizados en células de sangre en cultivo, de 5 ratas BN y 5 DN. En el Cuadro 17, se muestran los porcentajes promedios y desviaciones estándar obtenidas del grupo BN, observándose que las células sin tratamiento, presentan la menor frecuencia de células en apoptosis, al igual que en los órganos anteriores los cultivos tratados con DEX, presentaron un mayor incremento de apoptosis en relación con lo observado en bazo y timo. Se determinó que existían diferencias significativas ( $p < 0.05$ ).

Como se puede observar en los datos de las ratas con desnutrición, los cultivos sin tratamiento presentaron la menor frecuencia de apoptosis; contrariamente a lo observado en los cultivos tratados con DEX en donde se observó la mayor frecuencia de apoptosis. Se determinó por un análisis de Kruskal-Wallis, que existía diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre los cultivos del grupo DN.



Gráfica 9. Frecuencia de células de sangre vivas o en apoptosis después de 72h de cultivo, ante diferentes tratamientos, analizadas por medio del marcaje de fosfatidil serina con Anexina - V.

Cuadro 17. Efecto de la PHA y DEX sobre células de Sangre de rata bien nutrida (BN) y desnutrida (DN).

	RATAS BIEN NUTRIDAS				RATAS DESNUTRIDAS			
	-P/-D	- P/ +D	+P/ -D	+P/ +D	-P/ -D	- P/ +D	+P/ -D	+P/ +D
vivas	79.2 ± 2.9	44.6 ± 5.4	68.1 ± 6.7	54.1 ± 2.0	73.2 ± 2.0	47.4 ± 2.3	60.3 ± 2.6	52.1 ± 2.2
apoptosis	20.8 ± 2.9	55.4 ± 5.4	32.0 ± 6.7	45.9 ± 2.0	26.8 ± 2.0	52.6 ± 2.3	39.7 ± 2.6	47.9 ± 2.2

PHA = P DEX = D. n = 5 Ratas bien nutridas y n = 5 ratas desnutridas

#### 8.14. DETERMINACIÓN DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR DEX Y/O DESNUTRICIÓN EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES CELULARES EN SANGRE, DETERMINADA POR MEDIO DE ANEXINA-V/IP

Se determinó la susceptibilidad de las distintas subpoblaciones celulares a morir por apoptosis, inducida por DEX y/o desnutrición, se tomó como el 100% las células que presentaban únicamente marcaje por Anexina - V, de aquí se calculó el porcentaje promedio de cada tratamiento, éste procedimiento se realizó en ambos grupos (4 ratas BN y 4DN). Como se puede observar la sub-población CD4+, es más susceptible a morir por apoptosis, además las células doble negativas también presentan el segundo promedio más alto en todos los tratamientos (Cuadro 18).

De manera similar a los resultados anteriores, en el Cuadro 19 se presentan los porcentajes promedios del grupo DN, presentando la mayor mortalidad en las células CD4+, así también, en promedio la sub-población CD4-/C84- tiene la segunda mortalidad más alta.

Cuadro 18. Porcentaje promedio de células en apoptosis de sangre de rata BN

	% DE CÉLULAS EN APOPTOSIS			
	CD4+	CD4+/CD8+	CD4-/CD8-	CD8+
S/DEX S/PHA	59.7 ±0.82	2.4 ±0.15	36.9 ±0.92	1.0 ±0.03
C/DEX S/PHA	60.3 ±2.53	2.6 ±0.31	35.7 ±2.72	1.4 ±0.30
S/DEX C/PHA	56.4 ±0.65	2.0 ±0.25	40.6 ±0.88	1.0 ±0.03
C/DEX C/PHA	48.3 ±0.44	1.0 ±0.05	50.4 ±0.51	0.3 ±0.08

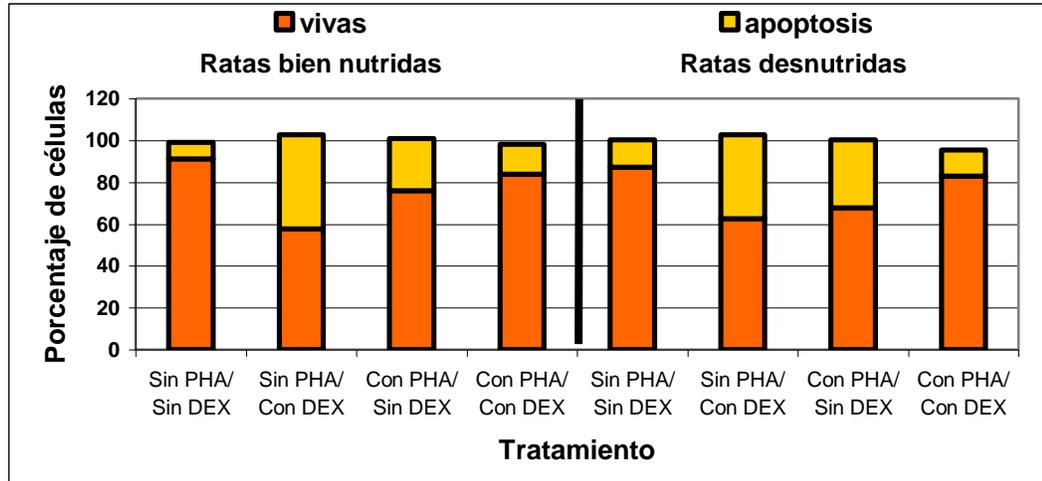
Cuadro 19. Porcentaje promedio de células en apoptosis de sangre de rata DN				
	% DE CÉLULAS EN APOPTOSIS			
	CD4+	CD4+/CD8+	CD4-/CD8-	CD8+
S/DEX S/PHA	68.0 ±1.65	1.5 ±0.27	30.6 ±1.42	0.1 ±0.09
C/DEX S/PHA	79.3 ±0.51	1.7 ±0.40	18.2 ±0.31	0.7 ±0.14
S/DEX C/PHA	55.0 ±1.02	1.00 ±0.02	43.9 ±1.04	0.04 ±0.01
C/DEX C/PHA	55.7 ±0.66	0.05 ±0.03	44.4 ±0.42	0.02 ±0.02

### 8.15. DETERMINACIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS DE SANGRE, POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE TUNEL

Se definieron los porcentajes promedio de células vivas y en apoptosis después de la aplicación de los diferentes tratamientos utilizados en células de sangre en cultivo (Gráfica 10), de 3 ratas BN (excepto el grupo +/+ en que se usaron 2 ratas BN); y 3 DN (excepto el grupo +/+, en que se usaron 2 ratas DN). En el Cuadro 20, se presentan los promedios y desviaciones estándar, como se puede observar la frecuencia de células vivas fueron más altas en los cultivos sin tratamiento y en los que se trataron tanto con PHA como con DEX, los cultivos tratados con DEX, fueron los que menor viabilidad presentaron.

Se determinó que existía diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), después del tratamiento con PHA o DEX, lo que al parecer provoca un efecto sobre la viabilidad de las células.

En el Cuadro 20, se presentan los porcentajes promedio obtenidos a partir del grupo DN, los cultivos sin tratar son similares a los que se trataron con PHA y DEX simultáneamente, así también los cultivos en los que se trataron con PHA y DEX separadamente presentan una viabilidad similar. Se determinó que existían diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ).



Gráfica 10. . Efecto de los diferentes tratamientos en células de sangreo de ratas BN y DN, los resultados mostrados son los promedios de los porcentajes de las células en cada uno de los tratamientos determinados por la técnica de TUNEL

Para comprobar si la desnutrición influía sobre la muerte por apoptosis se comparando los valores del los cultivos BN contra los DN, observándose una diferencia significativa entre ambos grupos ( $p < 0.05$ ).

Cuadro 20. Efecto de la PHA y DEX sobre células de Sangre de rata bien nutrida (BN) y desnutrida (DN)

	RATAS BIEN NUTRIDAS				RATAS DESNUTRIDAS			
	-P / -D	- P / +D	+P / -D	+P / +D	-P / -D	- P / +D	+P / -D	+P / +D
<b>vivas</b>	91.1 ±5.14	57.9 ±6.55	75.9 ±2.86	83.8 ±2.34	87.1 ±0.01	62.6 ±2.59	67.9 ±1.57	82.9 ±1.36
<b>apoptosis</b>	8.0 ±3.85	44.8 ±5.50	25.1 ±3.77	14.3 ±5.87	13.2 ±0.20	40.0 ±2.67	32.3 ±3.26	12.4 ±4.47

PHA= P DEX= D. n= 3 Ratas bien nutridas (excepto +P / +D n=2) y n= 3 ratas desnutridas (excepto +P / +D n=2)

## 8.16. DETERMINACIÓN DE LA APOPTOSIS INDUCIDA POR DEX Y / O DESNUTRICIÓN EN LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES CELULARES EN SANGRE, DETERMINADA POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE TUNEL

Las subpoblaciones celulares más susceptibles a la apoptosis inducida por DEX y/o desnutrición, fue determinada por la incorporación de dinucleótidos con marca fluorescente. Se tomó como 100% las células muertas por apoptosis, de ellos se determinó el porcentaje promedio para cada uno de los tratamientos, en ambos grupos.

En el Cuadro 21 se muestran los promedios y desviaciones estándar de 3 ratas BN, la sub-población más sensible en todos los tratamientos fue la de las células CD4+/CD8+, y la menos sensibles en general fueron las CD4-/ CD8-.

En el Cuadro 22 se muestran los promedios y desviaciones estándar de 3 ratas desnutridas, observándose nuevamente que las células CD4+/CD8+, son la sub-población que mueren más, independientemente del tratamiento.

Cuadro 21. Porcentaje promedio de células en apoptosis de sangre de ratas BN

	% DE CÉLULAS EN APOPTOSIS			
	CD4+	CD4+/CD8+	CD4-/CD8-	CD8+
S/DEX S/PHA	1.86 ±0.11	92.9 ±0.52	0.52 ±0.01	4.7 ±0.43
C/DEX S/PHA	0.11 ±0.01	96.3 ±0.92	0.41 ±0.06	3.2 ±0.92
S/DEX C/PHA	0.03 ±0.06	89.3 ±1.07	0.003 ±0.01	10.7 ±1.01
C/DEX C/PHA	0.06 ±0.01	89.6 ±0.42	0.03 ±0.05	10.4 ±0.45

Cuadro 22. Porcentaje promedio de células en apoptosis de sangre de ratas DN

	% DE CÉLULAS EN APOPTOSIS			
	CD4+	CD4+/CD8+	CD4-/CD8-	CD8+
S/DEX S/PHA	2.74 ±0.10	94.28 ±0.31	0.46 ± 0.17	2.52 ±0.33
C/DEX S/PHA	1.36 ±0.14	95.04 ±0.82	0.03 ±0.03	3.39 ±0.59
S/DEX C/PHA	2.54 ±0.13	92.80 ±0.76	0.02 ±0.02	4.63 ±0.81
C/DEX C/PHA	1.73 ±0.18	84.24 ±0.49	1.63 ±0.10	12.40 ±0.63

## DISCUSIÓN

La desnutrición es considerada como una enfermedad socioeconómica que afecta a gran parte de la población mundial, siendo los niños menores de cinco años más susceptibles a padecer este problema; en nuestro país las comunidades rurales y suburbanas presentan los índices más altos de esta enfermedad.

Los niños con desnutrición presentan frecuentemente, enfermedades infecciosas debidas a alteraciones en el sistema inmunológico, el cual es sumamente sensible a diversos factores estresantes incluyendo la desnutrición. Bar-Dayán (1996) comparó el tamaño del timo en ratones jóvenes y viejos, y demostró que después de la involución del timo hay cambio en la proliferación y apoptosis, especialmente en la corteza, y estos cambios podrían relacionarse con la reducción de la frecuencia celular. Domínguez y Méndez (2001) reportaron que ratas sometidas a inmovilizaciones presentaban disminución en el tamaño de los órganos linfoides.

Por lo tanto, el interés del presente estudio se fundó en aportar conocimientos para comprender las alteraciones que en el ámbito celular origina la desnutrición.

En un estudio publicado en 1996, Ortiz y colaboradores validaron que el método de inducción de desnutrición por competencia de alimento durante la lactancia es eficiente y origina deficiencia en peso y talla corporal. Más tarde el mismo grupo en 2001, mostró que la desnutrición disminuye proporcionalmente el peso de los órganos, particularmente el timo. Se ha observado que esta disminución en peso y talla corporal y orgánica en niños desnutridos origina alteraciones a nivel citogenético, por ejemplo formación de micronúcleos e intercambio de cromátidas hermanas (Ortiz y col., 1997; Ortiz y col., 1995).

Las células de organismos desnutridos en cultivo presentan diferencias significativas comparadas con las células procedentes de organismos bien nutridos por ejemplo una respuesta más rápida de sus linfocitos a los mitógenos (Ortiz, y col., 1995) aunque la proporción de células que responden es menor y la duración del ciclo celular es mayor.

Lo anterior hace pensar que las células de niños desnutridos responden más rápido, posiblemente a que han sido previamente activadas por haber estado expuestas a agentes patógenos, además, la mayor duración del ciclo celular podría reflejar el tiempo que tarda la célula en reparar el daño en el material genético. Todo esto se podría relacionar con la incapacidad de responder ante agresiones patógenas.

Los animales de experimentación son una gran herramienta particularmente en estudios de desnutrición, ya que al mantenerlos en condiciones controladas se eliminan variables, como, las infecciones a las que están sometidos los niños en condiciones normales, dando una representación más cercana a los efectos que causa la desnutrición por si misma.

## **9.1. DESNUTRICIÓN EXPERIMENTAL**

En el presente estudio, un primer paso fue inducir la desnutrición por el método de competencia alimenticia validado por Ortiz y colaboradores (1996).

Como se puede observar en el Cuadro 1, la desnutrición inducida experimentalmente por el citado método, originó un déficit de peso y talla corporal en promedio de 51.3% y con relación al timo y bazo fue de 70.8% y 68.0% respectivamente.

Sin embargo, al comparar los porcentajes que representan cada órgano con respecto al corporal, (datos no mostrados) se observó que mantienen la misma proporción, lo que sugiere una posible adaptación por parte de los organismos desnutridos. Además, es posible suponer que la alteración en la capacidad de la respuesta inmunológica no se establece con relación al peso de los órganos, respecto al número de células que lo conforman, sino en la capacidad de éstas a responder a agentes externos. Sobre todo, esta capacidad radicará en los procesos de selección celular en los órganos linfáticos.

## 9.2. APOPTOSIS ESPONTANEA EN LOS DIFERENTES FENOTIPOS CELULARES

En el presente estudio se compararon las proporciones de las diversas subpoblaciones del timo, bazo y sangre, después de cultivarlas por 72 h sin ningún tratamiento. En el Cuadro 3, se observa que no existe diferencia significativa en la viabilidad en cultivo de las células de los órganos estudiados, entre los grupos de ratas bien nutridas o desnutridas. Lo anterior sugiere que al menos bajo las condiciones de cultivo propuestas en este estudio, la desnutrición no afecta la viabilidad de las células de timo, bazo y sangre.

El timo es una glándula esencial en la diferenciación y maduración de precursores de células T, en donde se lleva a cabo la selección, por procesos apoptóticos, por lo tanto, se presenta una heterogeneidad en los niveles de diferenciación (Gao, y col., 1996). Se puede considerar una célula madura desde el momento en que abandona la médula ósea, y a medida que se especializa en el timo, se considera más diferenciada, de esta forma las células dobles negativas (CD4-/CD8-) son la subpoblación menos diferenciada, las dobles positivas (CD4+/CD8+) son intermedias y las células sólo CD8+ o sólo CD4+ son las más diferenciadas.

Bar-Dayan (1996) fundamentó que la transición de las células dobles negativas a dobles positivas es muy rápida, manteniéndose en esta fase por periodos relativamente largos y la diferenciación final a células sólo CD4 sólo CD8 se lleva a cabo en periodos cortos. Por lo tanto se esperaba que entre el 90% y 95% de los linfocitos fuesen dobles positivas, y la menor proporción de solo CD4 y CD8 se debe a que las células dobles positivas mueren durante el proceso de selección en estos órganos.

Por lo anterior, en el timo es importante determinar las proporciones celulares en cada nivel de diferenciación, para ello, se utilizaron marcadores de superficie anti-CD4 y anti CD8 conjugados con fluorocromos y se determinaron estas proporciones por citometría de flujo. En ambos grupos de ratas el fenotipo mayoritario fue el de las células CD4+/CD8+, siendo mayor esta proporción en el grupo de ratas desnutridas, esto podría relacionarse con una alteración en la diferenciación terminal.

Por otro lado, las proporciones de células con fenotipo sólo CD4+ o CD8+ fueron mayores en los cultivos de células de timo de ratas bien nutridas. Esto podría

asociarse a que, como se ha mencionado, las células de organismos desnutridos presentan daño en su material genético, y al estar en cultivo aisladas del microambiente protector que tienen *in vivo* se incrementa la muerte celular.

Con base en lo anterior puede proponerse que las enfermedades infecciosas que presentan los niños desnutridos pueden deberse a que las células inmunológicas de estos organismos no tengan la capacidad de reparar efectivamente el daño. Estos datos coinciden con los reportados por Provinciali, y colaboradores (1998), en donde se menciona que la deficiencia de factores tróficos (factores de diferenciación, estimulación, interleucinas, etc) podría inducir la muerte celular programada, lo que explicaría la menor proporción de células CD4+ y CD8+ en el timo de ratas con desnutrición.

Un segundo paso en la diferenciación se lleva a cabo en el bazo, una vez concluido el proceso de selección independiente de antígeno en el timo, las células diferenciadas se dirigen a este órgano, en donde se lleva a cabo una última diferenciación dependiente de Ag sobre células T y B totalmente especializadas.

Para detectar los tipos celulares se realizó un ensayo en el que se utilizaron marcadores anti-CD3 que reconoce células T, y anti-CD45 que es un marcador genérico de leucocitos. De esta manera las células que resultan ser positivas al marcaje con anti-CD3 (CD3+ o CD3+/CD45+) son linfocitos T, y las que son sólo positivas a CD45 son leucocitos en general preferentemente B. Las dobles negativas son células del estroma que no pertenecen a ningún linaje linfopoyético y que podrían resultar del método de obtención, ya que al filtrar el órgano completo permite que estén presentes en el cultivo este tipo de células.

En el bazo se lleva a cabo la diferenciación principalmente de linfocitos B, los resultados concuerdan con lo esperado en donde los linfocitos T, tendrían la menor proporción. Se destaca que en el grupo de ratas con desnutrición, la proporción de células T es de 0.69%, lo que parece reflejar que existe una deficiencia de células T diferenciadas que salen del timo, esto ratificaría los resultados obtenidos de los cultivos de timo.

Las proporciones de los diferentes fenotipos de células T en sangre, se determinaron mediante el uso de marcadores anti-CD4 y anti-CD8, se presentó una mayor proporción de células diferenciadas en ambos grupos de ratas. Sin embargo, en el grupo de ratas DN se presentó una mayor proporción de células CD8+.

Una posible explicación a estos resultados sería que la vida media de las células CD4+ y CD8+ de rata DN fuese mayor que las células del grupo BN. Esto supondría una adaptación por parte de los organismos desnutridos con el fin de responder a las infecciones. Sin embargo, esta mayor longevidad de las células linfoides podría ocasionar una menor capacidad para responder ante infecciones; además, la mayor proporción de linfocitos supresores en organismos desnutridos limitaría la respuesta que se pudiera montar ante enfermedades infecciosas.

### 9.3. APOPTOSIS

La apoptosis es un fenómeno genéticamente controlado y dependiente de energía, cuyos procesos secuenciales se llevan a cabo en periodos breves de tiempo, particularmente en cultivo. Por lo que el uso de la citometría de flujo se convirtió en una poderosa herramienta para su detección.

Para identificar las células en etapa temprana de apoptosis, se utilizó la técnica de Anexina - V, que se basa en una doble tinción. La Anexina - V pertenece a una familia de proteínas que se unen a la PS (Andree y col. 1990), y que al tener asociado un fluorocromo marcó aquellas células en las que se ha dado la translocación de PS de la monocapa interna de la membrana al exterior de la misma, este cambio se realiza por medio de una flipasa dependiente de ATP.

La segunda tinción se realizó usando yoduro de propidio, que es una molécula que se intercala en el ADN, (Stuart, y col., 1998). Esta técnica se ha recomendado para estudios de viabilidad en los que existe un gran número de muestra, ya que la metodología y adquisición de resultados es rápida, eliminando el daño que sufren las células por el tiempo de manipulación y otras variables que se desprenden del proceso (temperatura, pH, quelación, etc) (Kravtsov, y col., 1999).

Para el estudio de la apoptosis en fase tardía se utilizó la técnica de muerte celular *in situ* (TUNEL). En las células que sufren apoptosis, se forman fragmentos intranucleosomales debido al corte de las cadenas de ADN resultado de la actividad de endonucleasas, gracias a la actividad de la enzima desoxinucleotidil transferasa terminal, se pueden añadir en el extremo 3'OH dinucleótidos marcados con FITC. El uso simultáneo de ambas metodologías se ha recomendado para el análisis de la apoptosis en estudios *in vivo* e *in vitro* (Sgonc y Gruber, 1998)

Se ha comprobado que la dexametasona (DEX) es un potente inductor apoptótico, sobre todo en células del timo, Vacchio y colaboradores reportaron en 1997, que los GC (como la dexametasona) son inductores naturales de apoptosis, importantes en la selección de los timocitos, sobre todo en la transición de células dobles negativas a dobles positivas, e igualmente primordiales en el mantenimiento de la fase estacionaria de las células dobles positivas.

Por esta razón, en el presente estudio se decidió utilizar la dexametasona con el fin de comparar la apoptosis inducida por desnutrición, y determinar si se lleva a cabo una acumulación de señales inductoras de apoptosis. Se ha reportado que las funciones pro o anti-apoptóticas de los glucocorticoides dependen del contexto celular, y de una estrecha relación inversa con el TCR. Probablemente el balance entre las señales del TCR y de los GC desempeñen un papel homeostático en el desarrollo de las células T. (Jamieson y Yamamoto, 2000)

Previo al análisis apoptótico se realizó una curva dosis - respuesta, (datos no mostrados) para determinar la concentración de DEX que se usó y el tiempo de exposición, para esto se utilizaron distintas concentraciones (0, 0.5 1.0, 2.0 y 3.0  $\mu\text{M}$ ) a tres diferentes tiempos (0, 3 y 6 horas antes de la cosecha). La viabilidad se determinó por microscopía de contraste de fase (por la exclusión de azul tripano) y dos técnicas de citometría de flujo (incorporación de Bromo desoxiuridina y el análisis de IP).

Con base en los resultados obtenidos, se determinó usar 1  $\mu\text{M}$  de DEX 6 horas antes de la cosecha. Los datos obtenidos en los cultivos sin tratamiento se usaron como control negativo y se compararon con los obtenidos en los cultivos expuestos a PHA, DEX y ambas. En el presente estudio fue de particular interés comparar las proporciones de células en apoptosis inducida por la desnutrición con el efecto de la dexametasona.

Las células de timo presentaron la mayor frecuencia de apoptosis temprana, esta frecuencia fue mayor en las ratas con desnutrición, el segundo órgano con mayor inducción de apoptosis fue el bazo y las células de sangre fue el tipo con menor frecuencia. La respuesta observada en las células de bazo y sangre puede deberse a que presentan una mayor proporción de células diferenciadas, lo que las puede hacerlas menos sensibles al daño ocasionado por la dexametasona. Sin embargo, cuando se analizaron las frecuencias de células en apoptosis en etapas tardías, se

observó una disminución en las frecuencias de apoptosis y por lo tanto un incremento en las frecuencias de células vivas. Esto parece indicar que con las condiciones de cultivo utilizadas en este trabajo, las células fueron capaces de revertir el daño producido por la desnutrición, y el de la dexametasona. Lo que concuerda con los resultados obtenidos en estudios previos (Ayala, y col 1996; Dhabhar, y col., 1999; Perderson, y col., 1994).

Las células de timo, bazo y sangre en cultivo, presentaron apoptosis de manera espontánea, esto ya se ha reportado en estudios anteriores (Ortiz, y col., 2001; Dolzhanskiy y Basch, 1995; Emlen, y col., 1994).

El tratamiento con 1  $\mu$ M de DEX durante 6h, incrementó casi al doble la frecuencia de apoptosis en los tres tipos celulares estudiados. Sin embargo, no existió diferencia en el promedio de esta frecuencia entre las células de las ratas desnutridas con relación a las observadas en los testigos. Esto concuerda con los resultados *in vivo* reportados por Ortiz y colaboradores en 2001. Esto sugiere que a pesar de que la dexametasona es un potente inductor apoptótico, no existe una acumulación de su efecto en la muerte celular.

Aunque, la inducción de la apoptosis sea por diferentes medios, posiblemente los mecanismos citoplásmicos que activa la dexametasona, sean los mismos en los que está involucrada la inducción por desnutrición. Adams y Kaelin en 1998, establecieron que la apoptosis es un proceso con una secuencia característica, que requiere un control estricto, basado en proteínas multifactoriales, por ejemplo, p53 y RB, las que funcionarían como puntos críticos para permitir el paso a la siguiente etapa, por lo que es necesario una regulación multifactorial para desencadenar todo el proceso.

Al determinarse la apoptosis tardía se observó que hay una disminución considerable en la frecuencia de células en apoptosis, lo que estaría indicando que las células fueron capaces de revertir el daño al menos bajo las condiciones de cultivo usadas en este trabajo.

Kent y colaboradores (1997) estudiaron células T humanas, y observaron que las interleucinas 2, 4 y 7 disminuyen la apoptosis inducida por radiación. También propusieron que las células T dentro del organismo tienen un periodo de vida de semanas e incluso meses, *in vitro* mueren rápidamente debido a que podrían carecer

de los mecanismos de defensa que se presentan *in vivo*. Por lo que la respuesta de las células T en cultivos estimuladas con mitógeno será diferente a la observada *in vivo*.

La PHA es un mitógeno que induce la transcripción y traducción de IL-2 y de su receptor, por lo que al usarla como mitógeno en los cultivos celulares de timo bazo y sangre, se esperaba observar una menor frecuencia de muerte celular. Es necesario señalar que las células en cultivo primario al ser estimuladas por un mitógeno proliferan, pero no se convierten en inmortales. Gou y Hay (1999) propusieron que cuando una célula recibe un estímulo de proliferación, se activan simultáneamente los procesos de división y muerte celular. De esta forma, las células en cultivo que se encuentran en G0, al ser expuestas al mitógeno activan el ciclo celular y la apoptosis, y dependerá de su capacidad intrínseca para reparar los posibles daños que presente e inhibir el proceso de muerte celular.

Por lo tanto al tratar los cultivos celulares de timo, bazo y sangre con PHA, se esperaba que hubiera diferencias entre la frecuencia de apoptosis con relación a las células sin tratamiento. Las proporciones de células vivas, en apoptosis y necrosis de células de timo, bazo y sangre fueron similares en ambos grupos de animales, pero menor a los valores observados en los cultivos sin tratamiento.

Esto sugiere que en condiciones de cultivo las células del grupo DN tienen la misma capacidad de reparación del daño sobre el ADN, o bien la misma capacidad de respuesta que las células del grupo BN. Este efecto podría deberse a que las células menos diferenciadas tendieron a entrar a apoptosis, ya que al ser activado el proceso de proliferación, su menor grado de diferenciación indujo la apoptosis.

En las determinaciones realizadas mediante la técnica de TUNEL, se observó que en los cultivos de células timo, bazo y sangre del grupo BN se observó una baja frecuencia de apoptosis, que fue similar en las células de ratas DN, con excepción de la sangre en donde la viabilidad fue menor al 90%. Como se había mencionado antes, es posible que estas células tengan un periodo de vida mayor en comparación a las de rata BN, sin embargo, ésta diferencia puede hacer que al activarlas se desencadene el proceso de apoptosis disminuyendo la viabilidad promedio, lo que justificaría la baja respuesta ante agresiones patógenas *in vivo*.

Cuando los cultivos celulares de timo, bazo y sangre se expusieron simultáneamente a PHA y DEX, el promedio de viabilidad en ambos grupos fue cercano al cincuenta por ciento, lo que apoyaría la idea del modelo de señales duales. Mediante el análisis

de apoptosis tardía, se observó que las células de timo fueron más sensibles a la acción de los dos compuestos usados, sin embargo, las células de ratas DN tuvieron mayor viabilidad que las de ratas BN. Lo que sugiere que las últimas fueron capaces de revertir la inducción de apoptosis por la desnutrición, así como, por la PHA y DEX.

Es posible que exista una adaptación de las células de las ratas desnutridas, para reparar eficazmente los daños, al menos en las condiciones de cultivo propuestas en este trabajo, y que las alteraciones que se observan *in vivo* puedan deberse sobre todo al microambiente, o bien podría ser un efecto de menor proliferación *in vitro*. Esta mayor proporción de células viables también se apreció en las células de bazo de rata DN, aunque ambos grupos presentaron una viabilidad en promedio mayor al 98%. Es necesario recordar que las células estudiadas en este órgano son linfocitos T y B, células maduras funcionalmente.

Sin embargo, en sangre también se estudiaron células maduras, pero puede tratarse de células con mayor grado de senescencia, lo que las hizo más sensibles al efecto de los compuestos usados.

#### **9.4. APOPTOSIS INDUCIDA EN LOS DIFERENTES FENOTIPOS CELULARES**

La adición exógena de GC ejerce efectos significativos en la mortalidad de timocitos. Se ha reportado que los linfocitos dobles positivos son más sensibles a la muerte por apoptosis inducida por GC, mientras que los más diferenciados CD4+ o CD8+ no lo son (Takamura y col 1990; Tohji, y col., 1991). Al analizar los resultados obtenidos de los diversos fenotipos presentes en timo de ratas BN, se observó que las células dobles negativas, presentaron la menor frecuencia apoptótica, debido probablemente a que fue la subpoblación con menor densidad celular después de 72h de cultivo.

Se observó que la mortalidad de las células en cultivo tratadas con DEX fue 1.6 veces mayor, con PHA y DEX 2.7 y sólo con PHA 14.4, como se observó, los tratamientos en los que se usó PHA indujo mayor mortalidad. Posiblemente al activarse la proliferación de estas células, se echen a andar también los procesos de muerte celular programada, sería razonable pensar que el microambiente que

proporciona el timo, provea de protección a aquellas células con fenotipo inmaduro, lo que no ocurre in vitro, en donde los cambios no pueden ser modulados, haciendo más susceptibles a estas células.

También existieron diferencias entre las células dobles positivas, que fueron las que mayor densidad celular tuvieron, contrariamente a lo observado en las dobles negativas, se destacó que las tratadas con PHA, tuvieron el menor promedio de muerte celular programada, viéndose incrementado el fenotipo de CD8+. Como se mencionó previamente, en este caso, estos son datos preliminares, resultados de una sola prueba, por lo que esta diferencia pudo deberse sobre todo a errores metodológicos, más que a la respuesta propia de las células.

Al comparar el promedio de apoptosis en las células CD4+ y CD8+, tratadas con DEX, se aprecia una mayor muerte celular con respecto al testigo de 76% y casi el 50% respectivamente, lo que sugeriría que las más diferenciadas son menos susceptibles a la inducción de apoptosis por dexametasona.

En el caso de las células tratadas conjuntamente con DEX y PHA presentaron el mayor promedio de muerte celular programada, pero en proporción fue menor a los otros fenotipos. En general estos resultados parciales sugieren que, la PHA induce un incremento en la muerte celular, aunque menor al producido por DEX, las células con mayor grado de diferenciación fueron más resistentes al efecto de ambos compuestos.

Se observó que las células dobles positivas de timo de ratas desnutridas tuvieron un mayor promedio de apoptosis basal en comparación con el grupo BN. Dentro de los diferentes fenotipos encontrados en células de timo de rata desnutrida, como se esperaba, se observó que las dobles positivas fueron también las más susceptibles a todos los tratamientos; los cultivos tratados con PHA disminuyeron la mortalidad, posiblemente a que estas células fueron menos susceptibles a la activación por este mitógeno contrariamente a lo observado en las células CD4+ y CD8+ que son las que proliferan pero también desencadenan su metabolismo apoptótico.

Cuando se analizó la apoptosis en etapas tardías se observó que incrementaron los promedios de células dobles negativas. Posiblemente una vez iniciado el proceso de muerte celular, este tipo de células no fueron capaces de reparar los daños, en el caso de las células dobles positivas disminuyó el promedio, continuando con esta idea, se observó que los promedios de muerte celular en los fenotipos CD4+ y

CD8+ se incrementaron; posiblemente entre más diferenciadas sean las células menor sea la capacidad de revertir los daños.

Como se mencionó, en bazo sólo se consideraron las células positivas a los anticuerpos anti CD3 y anti CD45 para determinar las proporciones de linfocitos T y B respectivamente. Previamente en el estudio de viabilidad en los cultivos celulares de bazo se observó que el fenotipo predominante fue el de células dobles positivas y dobles negativas. Al determinar la susceptibilidad de las células a morir por apoptosis determinada por Anexina - V, se aprecia que las células más sensibles a morir por apoptosis en cultivo fue la de linfocitos B, que en promedio fue de 79%, cuando fueron tratadas con DEX la viabilidad descendió 15% aproximadamente, en este tratamiento, no se apreció mortalidad en los linfocitos T.

En los cultivos tratados con PHA (sola o con DEX), se observó un incremento de aproximadamente 14% en la mortalidad en las células B, posiblemente porque la PHA es un mitógeno específico de células T. También es posible que los linfocitos B al carecer del microambiente sean más susceptibles a presentar apoptosis temprana in vitro.

Cuando se determinó la apoptosis tardía se observó un incremento en la viabilidad de las células B; cuando fueron tratadas con DEX, estas presentaron el mayor porcentaje de mortalidad. Estos resultados parecen indicar que las células B, son más sensibles a presentar apoptosis temprana, pero su capacidad de reparar daños parece ser mayor a la de linfocitos T, ya que en éstos se incrementó la apoptosis en su fase tardía, lo que apoyaría la idea que los linfocitos T sean mucho más sensibles a la carencia del microambiente.

Cuando se determinó la apoptosis temprana en los diferentes fenotipos de células de sangre, se observó que la subpoblación más susceptible en el grupo BN fue la CD4+, seguida de las dobles negativas, dobles positivas y CD8+ respectivamente, este mismo fenómeno se presentó en el grupo DN, esto podría deberse a que es la subpoblación mayoritaria.

El tratamiento con DEX, ocasionó un incremento en la mortalidad de células CD4+ de ambos grupos de ratas. Sin embargo, las más sensibles fueron las células CD8+ que fue casi el total (100%) en el grupo BN y de cinco veces mayor en el grupo DN. Algo notable fue la disminución de muerte celular en las células doble negativas del grupo DN, ya que en tимо se había observado que estas células fueron

las más sensibles al tratamiento con DEX, posiblemente estas células en circulación no estén expuestas a niveles críticos de GC y tengan una menor cantidad de receptores.

En el tratamiento con PHA, en ambos grupos de organismos se observó una disminución en la muerte en las células más diferenciadas. Las doble negativas de los dos grupos fueron las más sensibles, como se mencionó previamente, el menor grado de diferenciación puede hacer que al activarse estas células no tengan la capacidad de reparar daños producidos durante el proceso de división y se active la muerte celular programada.

Cuando las células fueron tratadas simultáneamente con PHA y DEX, las dobles negativas fueron nuevamente las más sensibles, disminuyendo incluso la mortalidad en los demás fenotipos de ambos grupos, esto posiblemente a su grado de diferenciación.

Por la técnica de incorporación de dUTP, se observó que las células CD4+ tuvieron la capacidad de revertir los daños, ya que presentaron un incremento en la viabilidad en los cultivos testigo, además se observó un decremento en la mortalidad en los demás tratamientos en comparación a los testigos; en esta misma determinación, se presentó un cambio radical ya que las células dobles positivas que en la primera determinación presentaron ser aparentemente más resistentes, por la técnica de TUNEL se observó que el proceso de apoptosis no pudo ser revertido, siendo más grave el daño en las células del grupo DN.

Al ser tratadas con DEX, las células doble positivas fueron las más sensibles, disminuyendo la mortalidad en todos los fenotipos. Las células CD8+ de ambos grupos fueron las más sensibles durante el tratamiento con PHA y paralelamente con DEX, al ser una población mayoritaria y ser susceptibles al efecto del mitógeno, activó su proceso de división y muerte, lo que originó un incremento en la mortalidad, esto apoyaría el modelo de las señales duales.

## **9.5. CONSIDERACIONES FINALES**

Como se pudo apreciar, hubo una diferencia en las frecuencias de muerte celular, al determinarse por dos métodos diferentes (Anexina - V y TUNEL). En estudios previos como el de Fadeel y colaboradores (1999), se señala que la translocación de la PS, puede considerarse como un marcador pre-apoptótico, e inclusive que no

todos los tipos celulares son susceptibles a ser estudiados por esta técnica. Por ello, el análisis simultáneo de los fragmentos intranucleosomales que se forman en la fase tardía de la apoptosis, proporciona una idea del desarrollo que tiene el proceso.

El microambiente que provee el timo y bazo, protege a las células que en él se encuentran, haciendo que las menos diferenciadas sean más sensibles a cambios, como lo fue la transición de *in vivo* a *in vitro*.

El modelo de señales duales mencionado en este trabajo, proporciona una idea clara del efecto simultáneo que tuvieron la PHA y DEX sobre las células más diferenciadas, que al ser estimuladas para proliferar presentaron cambios drásticos en las proporciones de viabilidad.

El análisis de la apoptosis en fase tardía mostró una disminución considerable en comparación a lo observado en el análisis con Anexina – V, lo que sugiere que las células en condiciones de cultivo son capaces de revertir el daño producido por la desnutrición, esto quizá puede explicar la mayor duración del ciclo celular que presentan las células de organismos desnutridos (Gómez, y col., 1996), ya que al tener más daños la célula tarda más en reparar los daños.

No obstante, la reparación de los daños no implica que se restablezca la funcionalidad de la célula, al comparar estos resultados con los estudios de aberraciones cromosómicas, se observa que las células pueden incluso proliferar.

Es necesario destacar que el sistema inmunológico está compartimentalizado y que la respuesta a estresantes como puede ser la desnutrición, afecta de manera distinta a cada uno de los compartimientos. Sería razonable esperar que el análisis comparativo de estos efectos en los diferentes órganos-tejidos podría aportar una imagen más detallada de todo el complejo y podría contribuir a la comprensión del efecto causado por la desnutrición. Con este objetivo en mente se llevó a cabo el análisis simultáneo de la respuesta de los principales órganos linfáticos. Además, en este estudio se analizó también la sangre, de importancia en el transporte de las células diferenciadas.

Los resultados confirman que la desnutrición tiene un fuerte impacto en el sistema inmune de ratas sometidas a desnutrición durante la lactancia, lo que causa cambios dramáticos en la respuesta normal de las células inmunológicas. Notablemente, hay efectos marcados en la concentración de los diferentes subtipos celulares. Estas alteraciones fueron observadas en todos los tipos celulares estudiados

## **CONCLUSIONES**

### **TIMO**

- La frecuencia de muerte celular espontánea es similar en las células de ratas bien nutridas y desnutridas.
- La dexametasona induce apoptosis de manera similar a la desnutrición.
- La inducción de apoptosis por desnutrición y dexametasona no es acumulativa.
- La desnutrición y la dexametasona inducen la entrada de las células a una fase proapoptótica, aunque no culminan con la muerte. Al parecer las células son capaces de revertir el proceso de muerte celular.
- En el timo de las ratas con desnutrición el porcentaje de células doble positivas es mayor

### **BAZO**

- Hay una mayor proporción de células proapoptóticas en ambos grupos de ratas con relación a las observadas en el timo.
- La frecuencia de muerte celular basal es similar en ambos grupos de ratas
- La población predominante es la de linfocitos T en las ratas bien nutridas y la de linfocitos B en las ratas desnutridas. Se observa una alta susceptibilidad a presentar apoptosis en las células B, sin embargo, parece que el mecanismo de reparación de éstas células es más eficiente comparado con el de las células T.

## SANGRE

- La frecuencia espontánea de muerte celular tanto en las ratas bien nutridas como en las desnutridas es menor a la observada en los órganos anteriores.
- La sub-población mayor es la representada por las células CD4+, en las cuales la frecuencia preapoptótica aparentemente es debida a su alta proporción, no obstante, las células CD8+ que también están en alta proporción son menos susceptibles a entrar a ésta fase.
- Las células CD8+ de las ratas desnutridas son más sensibles a la inducción de apoptosis al ser estimuladas con PHA y ser tratadas con dexametasona.

## 11. BIBLIOGRAFÍA:

Abbas, A. K., Lichtman, A. H. y Pober, J. S. (1999). Inmunología celular y molecular 3a ed. Ed. Interamericana-McGraw Hill. España

Bennett, R. E., Harrison, M. W., Bishop, C.J., Searle, J. y Kerr, J. F. (1984). The role of apoptosis in atrophy of the small gut mucosa produced by repeated administration of cytosine arabinoside. *J Pathol.* **142**: 259-263.

Betancourt, M., Ortiz, R. y González, C. (1992). Proliferation index in bone marrow cells from severely malnourished rats during lactation. *Mutat. Res.* **283**: 173-177.

Caerr, F. R. (1994). Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer.* **73**: 2013-2026.

Christopher, J., Murray - Alan, L. y Lopez, D.. eds. (1996). The global burden of disease. World Health Organization, Harvard school of public health, and The world bank, Geneva, p. 311.

Cintra, L., Galván, A., Díaz-Cintra, S. y Escobar, C. (1994). Protein malnutrition on suprachiasmatic nucleus cells in rats of three ages. *Bol. Est. Med. Biol. Mex.* **42**: 11-19.

Clouston, W. M. y Kerr, J. F. (1985). Apoptosis, lymphocytotoxicity and the containment of viral infections. *Med Hypotheses* **18**: 399-404.

- Collins, R., Verschuer, L. A., Harmon, B. V., Prentice, R. L., Pope, J. H. y Kerr, J. F. (1989). Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. *Br J Hematol* **71**: 343-350.
- Cortés, E., (1997) Detección de daño en el ADN por medio de electroforesis unicelular en células de ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia. UAM - Iztapalapa. Tesis de Maestría en Biología Experimental.
- Cravioto, J. y Vega-Franco, L (1995). Historical highlights of mexican contributions to human nutrition. *Arch. Med. Res.* **26** (Suppl.): 133 - 137.
- Dive, C., Gregory, C. D., Phipps, D. J., Evans, D. L., Milner, A. E. y Wyllie, A. H. (1992). Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *Biochim. Biophys. Acta* **1133**: 275-285.
- Duval, E., Wyllie, A. H. y Morris, R. G. (1985). Macrophage recognition of cells undergoing programmed cell death (apoptosis). *Immunol* **56**: 351-358.
- Ekert, P. G. y Vaux, D. L (1997). Apoptosis and the immune system. *Br Med Bull* **53**: 591-603.
- Elgert, K. D. (1996). Immunology. Understanding the immune system. Wiley-Lyss, Nueva Cork.
- Ellis, H. M. y Horvitz, H. R. (1986). Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. *Cell*. **44**: 817-829.
- Ellis, R. E., Yuan, J., y Horvitz, H. R (1991). Mechanisms and functions of cell death. *Annu. Rev. Cell Biol.* **7**: 663-698.
- Engvall, E. y P. Perlmann (1972). Enzyme-linked immunoabsorbent assay; ELISA. *J. Immunol.* **109**: 129-135.
- Farber, J. L., Kyle, M. E. y Coleman., J. B. (1990). Mechanisms of cell injury by activated oxygen species. *Lab. Invest.* **62**: 670-679.
- Farbman A. I. (1968). Electron microscope study of palate fusion in mouse embryos. *Devl Biol* **18**: 93-97.
- Feledi, C., Goldman, A., Hebe, L, Massouh, E. y Roux, M. E. (1993). B and T cells in the intestinal mucosa of malnourished rats after the oral administration of cholera toxin. *Com. Biol.* **11**: 275 - 282.

Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), (1996) The Sixth World Food Survey (FAO, Rome). p. v-vi.

Gold, R., Schmied, M., Rothe, G., Zischler, H., Breitschopf, H., Wekerle, y H., Lassmann, H. (1993). Detection of DNA fragmentation in apoptosis: aplicación of in situ nick translation to cellculture systems and tissue section. *J Histochem. Cytochem.* **41**: 1023-1030.

Gómez, J. L., Campos, C., Rangel, P., Ortiz, R. (1996). Cell cycle phase duration in bone marrow cells from malnourished rats during suckling. *Mutation Res.*, **352**: 57-60

Goncalves, R. B. y Costa, C. P. (1995). Isolation of de lectin and L4 isolectin from *Phaseolus vulgaris* by affinity chromatography on insoluble ovomucoid. *Braz J Med Biol Res.* **28**: 191-4.

Goodman L. y Gilman A. (1996). Las bases farmacológicas de la terapéutica. Editorial médica Panamericana. Buenos Aires: Argentina; p. 1497-1513.

Guide to cell proliferation and apoptosis methods (1997). Boehringer Mannheim, Mannheim.

Guo, M. y Hay, B. (1999). Cell proliferation and apoptosis. *Curr. Op. Cell Biol.* **11**: 745-752

Hamelryck, T. W, Dao, T. M, Poortmans, F., Chispeels, M. J, Wyns, L, y Loris R. (1996). The crystallographic structure of phytohemagglutinin-L. *J Biol Chem* **271**: 20479-20485.

Hockenbery, D. M., Oltvai, Z. N., Yin, X. M., Milliman, C. L. y Korsmeyer, S. J. (1993). Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell* **75**: 241-251.

Hoornaert, S., Hanon J., Lyaku J., y Pastoret P. P. (1997). The Use of Annexin for Concomitant Detection of Apoptosis and Cellular Phenotype. *Biochemica* **3**: 19-20.

Howard, H., Sudha, K., y Troyen, B. (1995). The role of nutrition in mitigating environmental insults: policy and ethical issues. *Environ Health Perspect.* **103**: 186-198.

INEGI (2000).XII Censo de Población y Vivienda

Iwasaki, Y., Aoki, Y., Katahira, M., Oiso, Y., y Saito, H. (1997). Non-genomic mechanisms of glucocorticoid inhibition of adrenocorticotropin secretion: possible involvement of GTP-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* **235**:295-299

- James, T. N. (1994). Normal and abnormal consequences of apoptosis in the human heart. *Circulation* **90**: 556-573.
- Jamieson, C. y Yamamoto, K. (1997). Crosstalk pathway for inhibition of glucocorticoid-induced apoptosis by T cell receptor signaling *Proc. Natl. Acad. Sci.* **13**: 7319-7324
- Janeway, C. A., Travers, P. Y Walport, M. (1999). Immunobiology; the immune system in health and disease. Garland publishing. New York. U.S.A. 163-193
- Kane, D. J., Safafian, T. A., Anton, R., Hahn, H., Gralla, E. B., Valentine, J. S., Ord, T. y Bredesen, D. E. (1993). Bcl-2 inhibition of neural death: decreased generation of reactive oxygen species. *Science* **262**: 1274-1277.
- Kerr, J. R. F. (1965). A histochemical study of hipertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J Path Bact.* **90**: 419-425.
- Kerr, J. R. F., Wyllie, A. H. y Currie, A. R. (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* **26**: 239-257.
- Kuby, J (1997). Immunology 3ª ed. Nueva York: Ed. Freeman & Co.
- Lechler. (1998) Weight-reducing effects of plasma protein encoded by the obese gene. *Nature* **394**: 897-901.
- Lépori, L. (1997). Vademecum. Editorial RL S.A. Santiago: Chile.
- López, D. G. N. E. (2001) Envejecimiento en cultivo primario de fibroblastos de pulmón de ratón y presencia de la Bcl-2 como posible molécula protectora de daño en el ADN. UAM-Iztapalapa. Tesis de Maestría en Biología Experimental.
- Lowe, S. W., Schmitt, E. M., Smith, S. W., Osborne, B. A. y Jacks, T. (1993). p53 is required for radiation-Induced apoptosis in mouse thymocytes. *Nature* **362**: 847-849.
- Mahaffey, K. R, (1995) Nutrition and lead: strategies for public health. *Environ Health Perspect* **103**: 193 - 209.
- Majno, G. y Joris, I. (1995). Apoptosis, oncosis, and necrosis: An overview of cell death. *Am. J. Pathol.* **146**: 3-15.
- Male, D., Cooke, A., Owen, M., Trowsdale, J. y Champion, B. (1996). Advanced immunology 3ª ed. Mosby. Londres.

- Merck. (1986) El manual de Merck diagnóstico y terapéutica. Editorial Interamericana, S.A. México; México; p. 827-828, 1144-1145
- Miyazaki, T., Hirokami, Y., Matsushashi, N., Takatsuka y H., Natio, M. (1999). Increased susceptibility of thymocytes to apoptosis in mice lacking AIM, anovel murine macrophage-derived soluble factor belonging to the scavenger receptor cysteine-rich domain superfamily. *J. Exp. Med.* **189**: 413 - 422.
- Munck, A. (1971) Glucocorticoid inhibition of glucose uptake by peripheral tissues: Old and new evidence, molecular mechanisms, and physiological significance. *Persp. Biol. Med.* **14**: 265 - 289.
- Negoescu, A., Lorimie,r P., Labat-Moleur, F., Azoti, L., Robert, C., Guillermet, C., Brambilla, C. y Brambilla, E.(1997). TUNEL: Improvement and evaluation of the method for in situ apoptotic cell identification. *Biochemica* **2**: 12-17.
- Newton, R. (2000). Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important?. *Thorax.* **55**: 603-613
- Nieto, M. A., González, A., Gambon, F., Díaz -Espada, F. y López-Rivas, A. (1992). Apoptosis in human thymocytes after treatment with glucocorticoids. *Clin Exp Immuno.* **88**: 341-344.
- Ortiz, R., y Betancourt, M. (1990). Length of cell cycle in vitro and sister-chromatid exchange frequency in bone marrow cells from severely malnourished rats. *Mutat. Res.* **232**: 71-75.
- Ortiz, R., Cortés, E., González. C., Pérez L. y Betancourt M. (1995). Micronucleus frequency in spleen Iymphocytes from severely malnourished rats during lactation. *Environ. Mol. Mutagen.* **26**: 55-59.
- Ortiz, R., Cortés, E., González. C., Pérez L. y Betancourt M. (1996). Assessment of an experimental method to induce malnutrition by food competition during lactation. *Med. Sci. Res.* **24**: 843 - 846.
- Ortiz, R., Cortés, L., González, C., López, L., Pérez, P., Cortés, E., Betancourt, M., (1997). Analysis of mitomycin C- induced micronuclei in linphocytes from malnourished infected chlidren. *Environ. Mol. Mutagen.* **.30**: 363-370

- Ortiz, R., Cortés, E., Pérez, L., González, C., Rodríguez, E., y Betancourt, M. (1999). Desnutrición experimental por competencia de alimento durante la lactancia y su efecto sobre la fórmula leucocitaria en sangre periférica. *Anim. Exp.* **3**: 33 - 39.
- Ortiz, R., Cortés, L., González, H., Gómez, J. L., González, C., Cortés, E. (2001). Flow cytometric análisis of spontaneous and dexamethasone-induced apoptosis in thymocytes from severely malnourished rats. *British Journal of Nutrition.* **86**: 1-5.
- Paul, W. E. (editor) (1999). *Fundamental immunology* 4ª ed.: Lippincott y Raven Publishers. USA.
- Peña Martínez, J.(coordinador) (1998): *Inmunología* 2ª ed. Ed Pirámide. España
- Petit, P. X., Lecoecur, H., Zorn, E., Dauguet, C., Mignotte, B. y Gougeon M. L. (1995). Alterations in mitochondrial structure and function are early events of dexamethasone-induced thymocyte apoptosis. *J Cell Biol.* **130**: 157-167.
- Roitt, I. (1998). *Inmunología. Fundamentos* 9ª ed.: Editorial Médica Panamericana. Argentina.
- Roitt, I., Brostoff, J. y Male, D. K. (1997). *Inmunología* 4ª ed. Harcourt Brace. España.
- Sandford, N. L., Searle, J. W., Kerr, J. F. (1984). Successive waves of apoptosis in the rat prostate after repeated withdrawal of testosterone stimulation. *Pathology* **16**: 406-410.
- Skulman, S., Wiren, M., Gartick, P. J., McNurtac, MA. y Larsson, J. (1994). Protein synthesis in regenerating rat liver during malnutrition. *J. HepatoI.* **21**: 174-181.
- SSA e INEGI (1999). *Encuesta Nacional de Nutrición 1999. Estado nutricional de niños y mujeres en México.*
- Stacey, N. H., Bishop, C. J., Halliday, J. W., Halliday, W. J., Cooksley, W. G., Powell, L. W. y Kerr J. F. (1985) Apoptosis as the mode of cell death in antibody-dependent lymphocytotoxicity. *J Cell Sci.* **74**: 169-179.
- Tanda, N., Mori, S., Nose, M., Satio, T., Song, S. T., Sato, A. y Teshima, T. (1999). Expression of Phaseolus vulgaris leukoagglutinin-binding oligosaccharides in oral squamous cell carcinoma: possible association with the metastatic potential. *Pathol Int.* **46**: 639-45.

- Telford, W. G., King, L. E. y Fraker, P. J. (1991). Evaluation of glucocorticoid-induced DNA fragmentation in mouse thymocytes by flow cytometry. *Cell Prolif.* **24**: 447-459.
- Thatte, U. y Dahanukar, S. (1997). Apoptosis. clinical relevance and pharmacological manipulation. *Drugs.* **54**: 511-532.
- Thompson, E. B. (1988) Special topic apoptosis. *Ann. Rev. Physiol.* **60**: 525-553.
- Tomkins, A. y Watson F. (1989). Malnutrition and infection: A Review (United Nations Administrative Committee on Coordination/Subcommittee on Nutrition, WHO, Ginebra, pp. 5-6.
- Trump, B.F. y I.K. Berezsky. (1992). The role of cytosolic Ca<sup>++</sup> in cell injury, necrosis and apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **4**: 227-232.
- Trump, B.F. y I.K. Berezsky. (1995). Calcium-mediated cell injury and cell death. *FASEB J.* **9**: 219-228.
- Walker, N. I., Bennett, R. E. y Kerr J. F. (1989). Cell death by apoptosis during involution of the lactating breast in mice and rats. *Am J Anat.* **185**: 19-32.
- Weedon, D., Searle J. y Kerr J. F. (1979). Apoptosis. Its nature and implications for dermatopathology. *Am J Dermatopathol.* **1**: 133-144.
- World Health Organization (WHO) and the United Nations Children's Fund (UNICEF), (1995) Global Prevalence of Vitamin A Deficiency, Micronutrient Deficiency Information System Working Paper No. 2 (WHO, Ginebra, p. 5.
- World Health Organization (WHO), (1997). The World Health Report. Conquering Suffering, Enriching Humanity (WHO, Ginebra, p. 51.
- Wyllie, A. H. (1987) Apoptosis: Cell death in tissue regulation. *J. Pathol.* **153**: 313-316.
- Zenteno, E., Ortega, M., Qin, Z., Montrevil, J. y Debray H.(1994). Fast purification of Phaseolus vulgaris isolectins. *Prep Biochem.* **24**:175-83.
- Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L. y Fridman, J. M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature.* **372**: 425-432.

Zhang, F., Basinski, M. B., Beals, J. M., Briggs, S. L., Churgay, L. M., Clawson, D. K., DiMarchi, R. D., Furman, T. C., Hale, J. E., Hsiung, H. M., Schoner, B. E., Smith, D. P., Zhang, X. Y., Wery, J. P. y Schevitz, R. W. (1997). Crystal structure of the obese protein leptin - E100. *Nature* **387**:790-810.

Zhou, J., N.R., Ewald., Morrison, N.E., Basker, H.J. (1998). Evaluation of GM1 ganglioside-mediated apoptosis in feline thymocytes. *Vet. Immunopathol.* **66**: 25-42.

# ANEXO I

**Cuadro 22. Características que permiten distinguir entre apoptosis y necrosis**

CARACTERÍSTICA	APOPTOSIS	NECROSIS
Estimulo	Fisiológico / Patológico	Patológico
Frecuencia	Una sola células	Grupo de células
Adhesión entre células y a la membrana basal	Perdida (Tempranamente)	Perdida (Tardía)
Dilatación citoplásmica	Etapas tardías	Etapas muy tempranas
Daño a organelos	Tardío	Temprano
Liberación de enzimas lisosomales	Ausente	Presente
Núcleo	Contracción de la envoltura y rompimiento (cariorexesis)	Desaparición nuclear (cariolisis)
Cromatina nuclear	Compactación en masas uniformemente densas	Agrupamiento no muy bien definido
Rompimiento en el ADN	Internucleosomal	Aleatorio
Desenlace	Formación de cuerpos apoptótico	Hinchamiento y desintegración
Fagocitosis por otras células	Presente	Ausente
Inflamación	Presente	Ausente
Formación de cicatrices	Ausente	Presente

**Cuadro 23. Etapas de la muerte celular programada y sus características**

<b>Etapa D1(Reversible)</b>	<b>Etapa F (Irreversible)</b>	<b>Etapa D2 (Irreversible)</b>
Reprogramación genética Cambios en el perfil proteico Incremento de proteínas de estrés Disminución de poliaminas Cambios en la cromatina Incremento del $Ca^{2+}$	Activación de endonucleasas Fragmentación del ADN genómico	Cambios morfológicos Puentes cruzados en la transglutaminasa Formación de cuerpos apoptoticos Fagocitosis de apoptoticos

**Cuadro 24. Señales inductoras de apoptosis**

QUIMICOS	AGRESIONES FÍSICAS	VIRUS	CÉLULAS	CITOCINESIS	RETIRO DE LOS FACTORES TROFICOS	OTROS
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agentes quimioterapéuticos</li> <li>• Glucocorticoides</li> <li>• Radicales libres</li> <li>• Glutamato</li> <li>• Calcio</li> <li>• Peróxido de hidrógeno</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Neutrones</li> <li>• Rayos- X</li> <li>• Rayosβ</li> <li>• Rayos γ</li> <li>• Radiación UV</li> <li>• Estrés térmico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HIV-1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células T citotóxicas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TNF-α y β</li> <li>• TGF-β</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Glucosa</li> <li>• Factores de crecimiento</li> <li>• Interleucinas 2, 3, 10, 13</li> <li>• Factor estimulador de colonias de macrófagos</li> <li>• Factor estimulador de Granulocitos</li> <li>• Factor estimulador de fibroblastos</li> <li>• Hormonas (Estrógeno, Andrógeno, Progesterona, ACTH)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• p53</li> <li>• c-myc</li> <li>• Ced-2,3,4</li> <li>• Fas/Apo-1</li> </ul>

