

# Universidad Autónoma Metropolitana



**Casa abierta al tiempo**

Posgrado en Biología Experimental

**"Estudio de la muerte celular por apoptosis en células de timo de ratas desnutridas".**

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestra en Biología Experimental presenta

Biól. Patricia Uribe León

Comité tutorial:

Directora: Dra. Leonor Rodríguez Cruz

Asesores: Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz

Dr. José Luis Gómez Olivares

Fecha: 11 de Septiembre de 2015

**“El Programa de Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del CONACYT, registro 001481, en el Nivel Consolidado, y cuenta con apoyo del mismo Consejo, clave DAFCYT-2003IMPTNNN0020”**

**Este trabajo fue realizado gracias al apoyo con número de registro 262611 de la beca otorgada por CONACYT**

## **Miembros del jurado**

Presidente: Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz

---

Secretario: Dr. David Cruz Robles

---

Vocal: Dra. Norma Edith López Díaz-Guerrero

---

Vocal Dr. José Luis Gómez Olivares

---



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00154

Matricula: 2123801081

ESTUDIO DE LA MUERTE CELULAR  
POR APOPTOSIS EN CELULAS DE  
TIMO DE RATAS DESNUTRIDAS

En México, D.F., se presentaron a las 12:00 horas del día 11 del mes de septiembre del año 2015 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. ALDA ROCIO ORTIZ MUÑIZ  
DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES  
DRA. NORMA EDITH LOPEZ DIAZ GUERRERO  
DR. DAVID CRUZ ROBLES

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

DE: PATRICIA URIBE LEON



PATRICIA URIBE LEON  
ALUMNA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

*A probar*

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

REVISÓ

LIC. JULIO CESAR DE LARA ISASSI  
DIRECTOR DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. EDITH PONCE ALQUICIRA

PRESIDENTA

DRA. ALDA ROCIO ORTIZ MUÑIZ

VOCAL

DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

VOCAL

DRA. NORMA EDITH LOPEZ DIAZ GUERRERO

SECRETARIO

DR. DAVID CRUZ ROBLES

## **Comité tutorial**

### **Dra. Leonor Rodríguez Cruz**

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento Ciencias de la Salud

leor@xanum.uam.mx

### **Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz**

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento Ciencias de la Salud

arom@xanum.uam.mx

### **Dr. José Luis Gómez Olivares**

Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

División de Ciencias Biológicas y de la Salud

Departamento Ciencias de la Salud

gool@xanum.uam.mx

## **Dedicatorias**

A mis padres Celia e Ignacio por hacerme la mujer que soy hoy, por su invaluable apoyo y amor, los amo mucho.

A mi hermana Berenice por todo su apoyo y comprensión. Tu ayuda resulta inconmensurable. Te amo mucho hermana.

A mi novio Isaac por todo lo que siempre hace, por siempre estar ahí y no dejarme caer nunca. Te amo mucho.

A mis amigas Yury y Elizabeth por todos los consejos, por todas las risas y por todo su apoyo, las quiero mucho amigas.

A mis otras queridas amigas Araceli, Nancy y Gaby por estar siempre ahí, siempre apoyando y nunca dejarme caer. Muchas gracias amigas, las quiero mucho.

A todos y cada uno de mis profesores del posgrado, muchas gracias por compartir sus conocimientos conmigo.

A mis asesores la Dra Leonor, la Dra Rocío, el Dr José Luis, muchísimas gracias por todo su apoyo, comprensión y sus conocimientos, me han hecho crecer mucho más como persona y como estudiante.

A todos los integrantes del laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo de la UAM-I, gracias por todo.

A las ratas que se utilizaron y me dieron su vida para la culminación de este proyecto.

## Resumen

La desnutrición se define como la asimilación deficiente de alimentos, por el organismo, que conduce a un estado patológico con manifestaciones clínicas y gravedad variables. Es una de las causas comunes de inmunodeficiencia, a nivel mundial, y de susceptibilidad a infecciones en humanos. Una de las clasificaciones de desnutrición mide la diferencia entre peso y talla esperados para diferentes edades y grupos étnicos.

Dentro de las afectaciones más graves de la desnutrición, con respecto a la inmunidad, se presenta el daño al timo, que es altamente sensible a la condición nutricional, debido a los cambios del micro ambiente de éste.

Para estudiar estas afectaciones se han utilizado diferentes tipos de modelos, como el de la rata, que permiten fijar una variable nutricional y determinar las variaciones que ocurren dentro del micro ambiente del timo. Se ha observado que la desnutrición afecta negativamente la cantidad de linfocitos T en ratas desnutridas, y que la apoptosis espontánea aumenta y afecta a las subpoblaciones CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>.

En este trabajo se observó el incremento de apoptosis en ratas desnutridas comparadas con ratas bien nutridas de la misma edad. Se utilizaron ratas Wistar de 21 días de edad, las cuales se dividieron en 2 grupos. Al primer grupo se le indujo desnutrición por competencia de alimento durante la lactancia y al segundo se le alimentó adecuadamente.; Se realizó la medición de apoptosis y necrosis, con Anexina-V y Yoduro de Propidio respectivamente; también se midió la presencia de las moléculas Bcl-2, Citocromo-C y Bax en timocitos de ambos grupos por citometría de flujo.

Los resultados mostraron que la desnutrición afecta negativamente al timo, al presentarse un mayor porcentaje de apoptosis temprana (donde comienza con la condensación de la cromatina y el inicio de la formación de los cuerpos apoptóticos) y tardía (donde se presentan las fracturas en el citoplasma celular) en las células CD4<sup>+</sup>+Anexina de ratas desnutridas. Mientras que se presentó un

decremento de Bcl 2 en las células  $CD4^+Bcl-2$ ,  $CD8^+Bcl-2$  y  $CD4^+/CD8^+Bcl-2$  de las ratas desnutridas en comparación con las bien nutridas; el porcentaje de Cit-C en células  $CD4^+Cit-C$ ,  $CD8^+Cit$  y  $CD4^+/CD8^+Cit-C$ , en cambio, se incrementó en comparación con las bien nutridas. Se presentó una tendencia similar en los porcentajes de Bax, en  $CD4^+Bax$ ,  $CD8^+Bax$  y  $CD4^+/CD8^+Bax$  en las células de las ratas desnutridas al compararlas con las células de las ratas bien nutridas. Estos resultados indican que la desnutrición afecta negativamente a los timocitos de las ratas desnutridas, al aumentar la apoptosis en ellas cuando son comparadas con las ratas bien nutridas.



## Abstract

Malnutrition can be defined as poor assimilation of nutrients by the body, which leads to a pathological condition with variable clinical manifestations and severity. It is one of the most common causes of immunodeficiency worldwide and susceptibility to infections in humans. One classification of malnutrition measures the difference between expected weight and size for different ages and ethnicity.

To demonstrate these effects have been used different types of models, such as the rat, which allows setting a nutritional variable and determine the variations that occur within the thymic microenvironment. Previous work has shown that malnutrition adversely affects the amount of T in undernourished rats lymphocytes, has also been shown in undernourished rats treated with dexamethasone, the spontaneous apoptosis is enhanced and the subpopulations CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> and CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> where the most affected. It has also been shown that malnutrition affects thymic development and instead favors the appearance of early and late apoptosis in undernourished rats, showing a greater amount of caspase 8 and 9 in the CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> and CD8<sup>+</sup> subpopulations.

In this paper the relationship between increased apoptosis in rats malnourished and well-nourished rats, Wistar 21 days of age, when measuring apoptosis and necrosis, with Annexin-V and propidium iodide was determined respectively, and comparing the presence of Bcl-2, Bax and Cytochrome-C molecules; Total thymocytes in rats of both groups, by flow cytometry.

The results showed that malnutrition adversely affects the thymus, to present a higher percentage of early and late apoptosis in CD4<sup>+</sup> Annexin in cells of undernourished rats. While measurements of Bcl-2 and Bax and Cytochrome-C molecules similar results were presented CD4<sup>+</sup>+Bcl-2, CD8<sup>+</sup>+Bcl-2 y CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>+Bcl-2 of undernourished rats a decrease was present in this molecule compared to well nourished; the percentage of cells CD4<sup>+</sup>+Cit-C, CD8<sup>+</sup>+Cit y CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>+Cit-C, however is increased compared to the well nourished; A similar trend was presented in the percentages of Bax, CD4<sup>+</sup>+Bax, CD8<sup>+</sup>+Bax y CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>+Bax where an increase was also present in the percentage of undernourished cells

when compared with well-nourished cells. These results indicate that malnutrition adversely affects thymocytes of rats undernourished, to increase the rate of apoptosis in them when compared with well-nourished rats.

## Abreviaturas

**Apaf 1:** Factor activador de proteasas apoptóticas 1

**ATP:** Adenosin Trifosfato

**Bad:** Proteína proapoptótica tipo BH-3

**Bak:** Proteína proapoptótica de tipo multidominio

**Bax:** Proteína proapoptótica de tipo multidominio, que se encuentra en el exterior de algunos organelos.

**Bcl XI:** Proteína antiapoptótica del grupo Bcl-2

**Bcl-2:** Grupo de proteínas involucradas en la apoptosis.

**Bid:** Proteína proapoptótica tipo BH-3, que propicia la abertura del poro mitocondrial.

**Bim:** Proteína proapoptótica tipo BH-3, que ayuda a la introducción de la proteína Bax a la mitocondria

**CARD:** Dominios de reclutamiento de caspasas

**dATP:** Desoxiadenosina trifosfato

**DaXX:** Proteína asociada a muerte número 6

**DD:** Dominio de Muerte

**FADD:** Factor de muerte asociado con Fas

**Fas:** Proteína transmembrana “receptora de muerte”

**IAPS:** Inhibidor de las caspasas

**Raidd:** Receptor de dominio de muerte asociado con interleucina

**SMAC/DIABLO:** Proteína inhibidora de los inhibidores de caspasas

**TNF:** Factor de necrosis tumoral

**Tradd:** Dominio de muerte asociado con el receptor TNF

**Traff:** Factor asociado al receptor TNF

# Índice

Miembros del jurado .....	iii
Comité tutorial .....	v
Dedicatorias .....	vi
Resumen .....	vii
Abstract .....	ix
Abreviaturas .....	xi
Índice.....	xii
Introducción.....	1
Desnutrición.....	1
Desnutrición e Infección.....	2
Composición morfológica del timo .....	3
Efecto de la desnutrición en el timo .....	4
Apoptosis.....	5
Vía extrínseca.....	6
Vía intrínseca o mitocondrial.....	8
Citocromo C.....	10
Bax.....	11
Bcl-2.....	12
Antecedentes .....	14
Justificación:.....	17
Pregunta de investigación: .....	18
Hipótesis:.....	18
Objetivos: .....	18

General:.....	18
Particulares:.....	18
Material y Método.....	19
Desnutrición experimental en ratas.....	19
Obtención de timocitos .....	19
Determinación de apoptosis por citometría de flujo .....	20
Detección de Bcl-2, Cit-C y Bax. ....	21
Análisis Estadístico.....	22
Resultados .....	23
Evaluación de la apoptosis.....	24
Selección de las regiones de análisis.....	24
Detección de Anexina V.....	27
Proteínas intracelulares relacionadas a la apoptosis .....	29
Proteína Bcl-2.....	29
Citocromo C .....	32
Bax.....	34
Discusión.....	36
Proteínas intracelulares .....	38
Bcl-2.....	38
Citocromo C.....	40
Bax.....	41
Conclusiones.....	44
Perspectivas.....	44
Anexo .....	45

Preparación de solución fijadora de paraformaldehido al 1%.....	45
Preparación de solución de BSA en PBS .....	45
Bibliografía .....	46

# Introducción

## Desnutrición

La desnutrición se define como la asimilación deficiente de alimentos por el organismo; conduce a un estado patológico que presenta manifestaciones clínicas y gravedad variables (Gómez, 1946) y en una definición más moderna de la desnutrición infantil, se sabe que además de la falta de equilibrio entre la cantidad de nutrientes que se consumen y las necesidades que tienen los niños, este desequilibrio provoca déficits acumulativos de energía, proteínas o micronutrientes que pueden afectar negativamente el crecimiento y desarrollo de los infantes (Metha, 2013). La desnutrición es una de las causas más comunes de inmunodeficiencia, a nivel mundial, y de susceptibilidad a infecciones en humanos (Chandra, 2002). Existen diversas formas de medir el grado de desnutrición y una de estas la clasifica por el porcentaje de déficit de peso en un individuo, al compararlo a otro bien nutrido, en condiciones similares de edad y grupo étnico. Así se pueden tener 3 diferentes grados de desnutrición, como se describe a continuación: de primer grado o leve, a toda pérdida entre el 10 y 25 % de peso que el paciente debería tener para su edad; la desnutrición de segundo grado o moderada, se desarrolla cuando la pérdida de peso fluctúa entre el 25 y el 39 % y finalmente desnutrición de tercer grado o grave, a la pérdida de peso del organismo más allá del 40 %, utilizando como parámetros para comparar las curvas de crecimiento proporcionadas por la OMS en el 2006 (Gómez, 1946, Metha, 2013).

En otro aspecto la desnutrición grave se clasifica en tres tipos: kwashiorkor, marasmo y kwashiorkor-marasmática, de acuerdo a los siguientes criterios: el individuo con desnutrición tipo kwashiorkor puede o no presentar un peso inferior al 60% al esperado para la edad, ya que puede presentar edema y hepatomegalia; el individuo con desnutrición tipo marasmo posee un peso menor o igual al 60% del peso esperado para la edad y no hay presencia de edema, y por último, el individuo que posee menos del 60% del peso esperado, pero que presenta signos

de edema, es clasificado como marasmo-kwashiorkor (Mukherjee, 1967; Waterlow, 1972).

En los países en desarrollo, los niños en edad preescolar (2 a 6 años) que son víctimas de la desnutrición, ven restringidas sus posibilidades de crecimiento y de desarrollo; como es bien sabido, la desnutrición infantil produce graves consecuencias a los niños que la padecen, ya que existe una relación estrecha entre el momento donde comienzan los problemas de desnutrición y las etapas críticas del desarrollo cerebral. Aunado a esto, se producen otras alteraciones, donde se destaca el bajo nivel de inmunidad frente a las enfermedades infecciosas. La desnutrición afecta principalmente a los niños de edad preescolar, ya que al tener un crecimiento rápido, los requerimientos nutrimentales son más elevados y por ello son difíciles de satisfacer. Y si además se suma la dependencia de los niños hacia otras personas para satisfacer sus necesidades, que muchas veces no son cumplidas por carencia de educación o recursos económicos adecuados, esta situación se ve agravada (Pérez-Robles *et al.*, 1994).

## **Desnutrición e Infección**

La relación entre las infecciones y la desnutrición es muy compleja, puesto que las infecciones requieren de una respuesta inmunológica muy fuerte, pero esta no se puede dar debido a la desnutrición y también ocurre a la manera inversa, al tener un cuadro de desnutrición, la respuesta inmunológica se ve afectada causando que las infecciones sean más frecuentes (Scrimshaw *et al.*, 1968), creando un círculo vicioso donde los procesos de desnutrición están a la par de las infecciones (Bronte, 2005).

La desnutrición grave en recién nacidos y niños preescolares provoca, entre otras afectaciones, atrofia en el timo que está asociada a la disminución celular y un mal desarrollo de los órganos linfoides periféricos (Savino *et al.*, 2002). Esto inicia una cadena que provoca defectos inmunológicos caracterizados por la disminución en la proporción de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, e incremento del número de células T doble negativas inmaduras en la periferia (Schaible *et al.*, 2007).



## Composición morfológica del timo

El timo está dividido en lóbulos pequeños fraccionados por tabiques fibrosos que se extienden desde la cápsula. Cada lóbulo mide de 0,5 a 2 milímetros y constituye la unidad estructural básica de la glándula, cada uno se compone de dos áreas que se pueden distinguir claramente en secciones histológicas: corteza y médula.

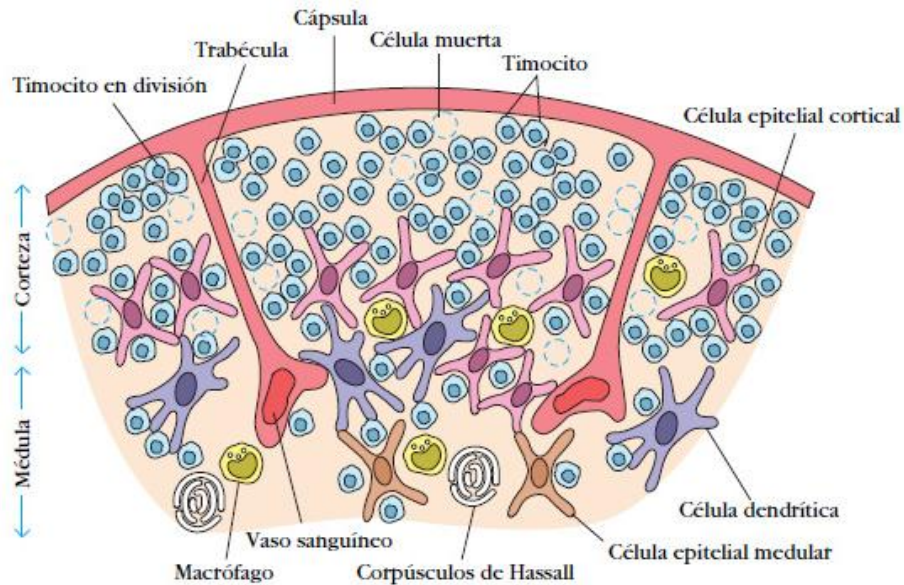
La corteza aparece más oscura debido a su población de linfocitos, conocidos tradicionalmente como timocitos (Suster, 1992). Los timocitos están mezclados con algunas células epiteliales y mesenquimales. En cambio, la médula es más clara, debido al menor número de linfocitos y mayor cantidad de células epiteliales. Las porciones medulares son continuas de lóbulo a lóbulo, dando como resultado una configuración altamente ramificada del tallo.

La corteza tímica está densamente poblada por linfocitos de varios tamaños. Los linfoblastos grandes o protimocitos, mitóticamente activos, representan 10-15% de las células linfoides del timo y se encuentran predominantemente en la porción subcapsular de la corteza externa (Müller-Hermelink *et al.*, 1986; Suster, 1992). Un gradiente de linfocitos más pequeños, menos activos mitóticamente, se ven en la parte externa de la corteza profunda, en la unión córtico-medular y en el interior de la médula. El término timocito fue utilizado originalmente para denominar a todos los linfocitos del timo. La figura 1 muestra un esquema con algunos de los componentes del timo.

Recientemente, el término timocito se ha restringido a los linfocitos T inmaduros en el timo. En la corteza, la intensa linfopoyesis, linfolisis, y la fagocitosis activa son indicativos de una extensa linfopoyesis ineficaz (probablemente 99 % de los timocitos mueren *in situ*). Esto da lugar a un aspecto de cielo estrellado en el timo activo (Suster, 1992)

Las células epiteliales del timo forman el armazón del órgano y su función es esencial para la maduración de los linfocitos T. Han sido divididas tradicionalmente, en base a su localización, en corticales y medulares. Sus

características citológicas son bastante distintivas para ser reconocidas con el microscopio de luz.



**Figura 1.** Esquema de los diferentes componentes del timo (tomado de Kindt, 2007)

### Efecto de la desnutrición en el timo

Dentro de las afectaciones más graves de la desnutrición con respecto a la inmunidad, se observa el daño al timo, que es altamente sensible a la condición nutricional y por ello se ha catalogado por varios autores como el “barómetro de la desnutrición” (Prentice, 1999). Al estudiar los timos post mortem de niños desnutridos, se ha demostrado que la desnutrición se asocia con la atrofia del timo, así como con la disminución de linfocitos timo-dependientes en los ganglios linfáticos y el bazo (Purtilo y Connor, 1975).

En el timo existe una gran tasa de muerte celular por apoptosis, de manera natural, debido a los procesos de selección para la maduración de linfocitos. A continuación se describirá brevemente este proceso.

## **Apoptosis.**

La Apoptosis es un término que indica la muerte celular programada o "suicidio celular". Proviene de la raíz griega apo: "fuera de" o "separación" y ptosis: "caída" y representa una serie de eventos moleculares y bioquímicos organizados por un programa genético (Aimee y Thompson, 2004).

La apoptosis se caracteriza por: activación de caspasas, reducción del volumen celular, fragmentación nuclear, exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática y formación de cuerpos apoptóticos (Saikumar, 1999). La inducción de la apoptosis depende de factores como variaciones de la concentración de factores de crecimiento, estímulos para la permanencia en el tejido o bien estímulos apoptóticos directos que activan a ligandos en la membrana celular, también por factores internos, en los que la célula expresa su programa de muerte celular como consecuencia de un daño celular (Skulachev, 2006).

La apoptosis es un fenómeno biológico fundamental, permanente, controlado e interactivo. Existen mecanismos pro- y anti-apoptóticos, regulados genéticamente y que consumen energía.

El científico alemán Karl Vogt fue el primero en describir el principio de la apoptosis en 1842, mientras que en 1885 el anatomista Walther Flemming dio una descripción más precisa del proceso; sin embargo no fue sino hasta 1965 que se comenzó a describir y a hablar más sobre el tema (Kerr, 1965).

En 1972 Kerr y Foxton, estudiando orgánulos en células neoplásicas, detectaron que muchas células desaparecían de los cultivos (Velasco, 2005). Esto llevó al estudio de imágenes cinemáticas que mostraron, mediante microscopía electrónica, las alteraciones que sufre la célula en un proceso que es de corta duración (menos de una hora en algunos tipos celulares) (Oliveri, 2000).

Utilizando microscopía electrónica, se han identificado los cambios morfológicos que ocurren durante la apoptosis (Hacker, 2000). Durante el proceso temprano de la apoptosis, la retracción de las células y la picnosis son visibles por microscopía

de luz (Kerr *et al.*, 1972). Con la crenación, las células son menores en tamaño, el citoplasma es denso y los organelos están empaquetados más densamente. La picnosis es el resultado de la condensación de la cromatina y es una de las características más importante de la apoptosis. En un análisis histológico con tinción de hematoxilina y eosina, la apoptosis involucra células separadas o pequeños conjuntos de células. La célula apoptótica aparece como una masa redonda u oval con un citoplasma oscuro eosinófilico y fragmentos de cromatina nuclear purpuras (Elmore, 2007).

Ocurre formación de vesículas de la membrana plasmática, seguido por cariorrexis (destrucción de la cromatina en células en proceso de muerte celular) y la separación de fragmentos de células en los cuerpos apoptóticos. Los cuerpos apoptóticos consisten de citoplasma con organelos adentro con o sin un fragmento nuclear. La integridad de los organelos aún se mantiene y todo esto está encerrado dentro de una membrana plasmática intacta. Estos cuerpos son posteriormente fagocitados por los macrófagos, células de parénquima y degradados en los fagolisosomas. Esencialmente no existe reacción inflamatoria asociada con el proceso de la apoptosis ni con la eliminación de células apoptóticas porque: (1) las células apoptóticas no liberan sus constituyentes celulares en el tejido circundante intersticial; (2) son rápidamente fagocitados por las células circundantes por lo que es probable la prevención de la necrosis secundaria, y (3) las células que engullen no producen citocinas anti-inflamatorias (Savill y Fadok, 2000; Kurosaka, *et al.* 2003).

La apoptosis puede desencadenarse por dos vías, la extrínseca y la intrínseca, que se describirá en el apartado siguiente.

### **Vía extrínseca**

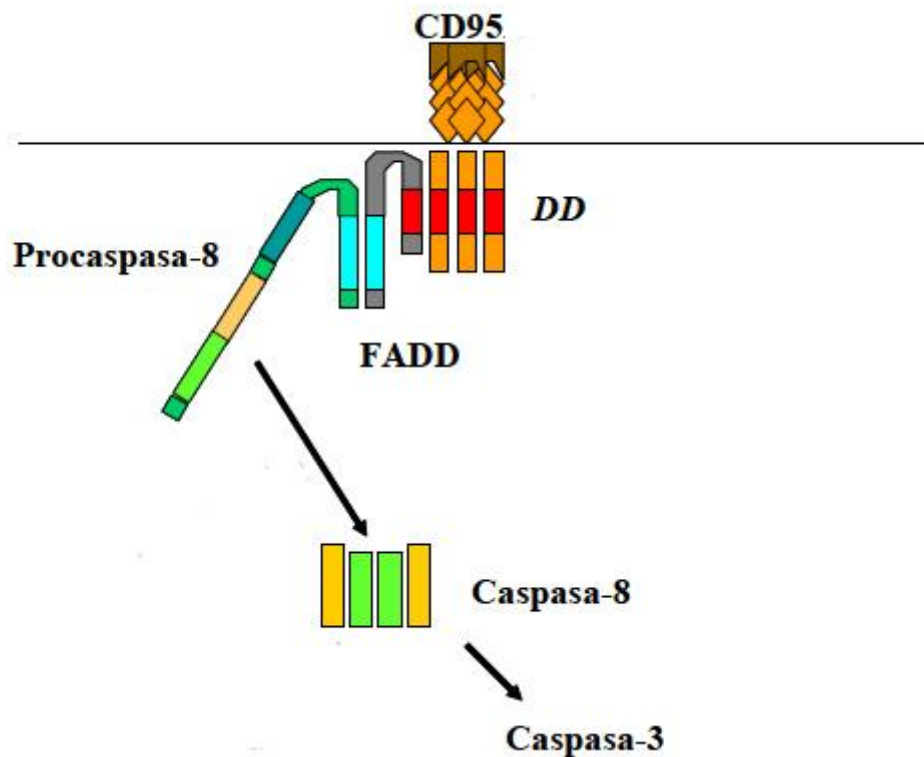
La vía extrínseca o de los "receptores de muerte", establece conexiones con el espacio extracelular, por medio de receptores como FAS (también conocido como CD95), recibiendo señales proapoptóticas desde el exterior y de las células vecinas. Se han identificado dos familias de receptores con estas características:

la proteína FAS y el factor de necrosis tumoral (TNF), que juntos forman el dominio de muerte (DD, *death domain* en inglés) (Skulachev, 2006).

La proteína transmembranal FAS, en su porción intracelular, se enlaza con un factor intermedio denominado FADD (*factor associated death domain* en inglés), que activa a las caspasas 8 y 10. Si el dominio intracelular de la molécula se asocia con el factor DaXX (proteína asociada al dominio de muerte, en inglés), se activa la proteína- kariorrhexiscinasa que conducen al efecto contrario, es decir, estimulan el ciclo celular y la mitosis. Esta vía FAS permanece inactiva hasta que se produce, en su parte externa, el enlace con un ligando FAS, esta proteína actúa como detonador que enciende una vía en donde sólo las caspasas se encuentran activas y el resto de la cadena está preparada para continuar. Esta característica permite actuar con gran rapidez sin necesidad de sintetizar otros factores (Aimee y Thompson, 2004).

Algo similar sucede con el receptor de membrana TNF. Su porción intracelular conecta con proteínas como Tradd (*TNF receptor associated death domain*) y Raidd (*receptor associated interleukine death domain*) que activan caspasas "iniciadoras" de la apoptosis. Pero si se asocian a otro complejo llamado Traf (*TNF receptor associated factor*, por sus siglas en inglés) activan proteína-cinasas y estimulan la proliferación celular (Skulachev, 2006).

En la figura 2 podemos observar una esquematización de este proceso.



**Figura. 2. Esquemmatización de algunas de los factores involucrados en la vía extrínseca de la apoptosis.** Se observa la cascada de eventos desde el receptor CD95, que a su vez activa a DD y este activa a FADD para desencadenar (entre otras proteínas) la cascada de activación de las caspasas (Tomado de Díaz, 2006).

### Vía intrínseca o mitocondrial

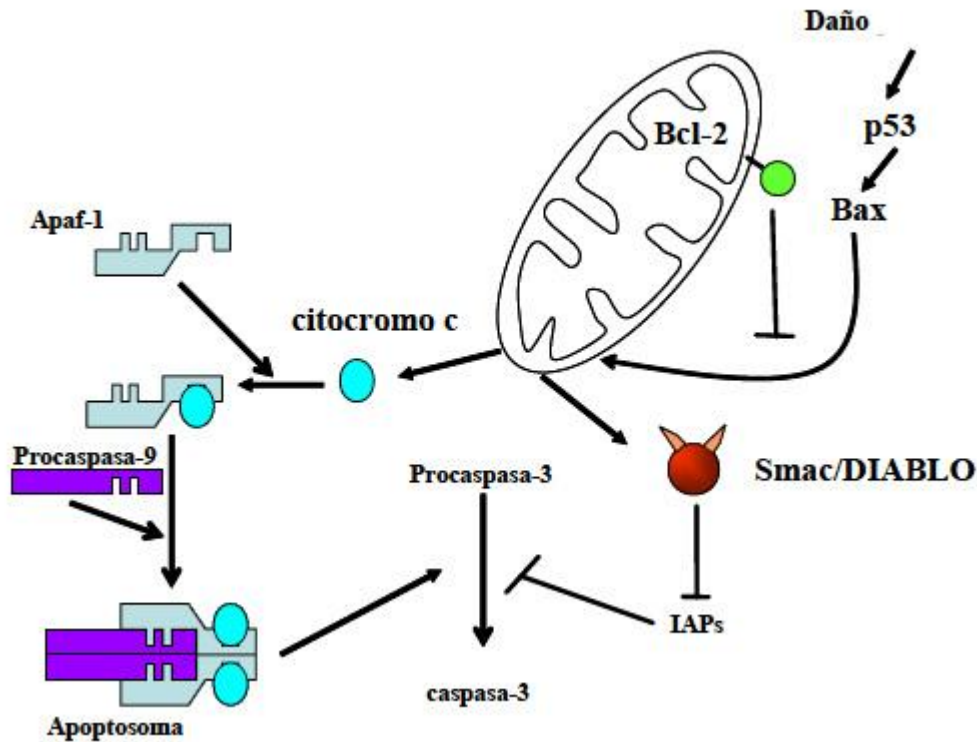
Otra vía de inducción de apoptosis es la vía llamada mitocondrial. Las proteínas de la familia de Bcl-2 regulan la apoptosis ejerciendo su acción sobre la mitocondria. La activación de proteínas pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2 produce un poro en la membrana externa de las mitocondrias que permite la liberación de numerosas proteínas del espacio intermembranal; entre ellas, el Citocromo C (Cit-C). Las proteínas de la familia de Bcl-2 se agrupan en tres subfamilias: la de las proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-Xl, Mcl-1 y otras); la de proteínas proapoptóticas de tipo "multidominio" (Bax y Bak) y las proapoptóticas, de tipo "*BH3-only*" (Bid, Bim, Bad y otras). Las proteínas tipo multidominio pueden producir poros por si solas en liposomas, lo que indica que probablemente son

suficientes para formar el poro mitocondrial que permite la liberación del Citocromo C. Las proteínas tipo *BH3-only* activan a las proteínas de la familia Bcl-2, y las antiapoptóticas inhiben la formación del poro. Estas proteínas son los reguladores más importantes del proceso de apoptosis (Desagher y Martinou, 2000).

El citocromo C, una vez en el citosol, activa un complejo proteínico llamado "apoptosoma", que activa directamente a la caspasa-9, ésta activa a las caspasas efectoras como la caspasa-3, lo que desencadena las últimas fases de la apoptosis (Bossy y Green, 1999).

Además de la salida de Citocromo C de la mitocondria, la proteína SMAC/DIABLO, neutraliza a los inhibidores de caspasas (IAPS) (Colin *et al.*, 2001). Así, se tiene una vía en la que la caspasa efectora está libre para actuar.

La vía mitocondrial puede conectarse también con la vía de receptores de muerte, ya que una vez activada la caspasa-8 por dichos receptores, esta caspasa activa a la proteína Bid, lo que provoca la apertura del poro mitocondrial y la activación de la caspasa-9 (Green, 2005). En la figura 3 se pueden observar, de manera esquemática, algunos de los factores que participan en esta vía.



**Figura 3. Esquematación de algunos de los factores que participan en la vía intrínseca de la apoptosis.** Se comienza con la recepción del daño que activa al gen p53, posteriormente se moviliza a la proteína Bax desde el citoplasma hacia la membrana mitocondrial externa y se crea un poro por el cual el Cit-C será liberado al citoplasma y al unirse a la caspasa 9 construirán el apoptosoma e iniciarán la cascada de caspasas ejecutoras del proceso apoptótico. (Tomado de Díaz, 2006).

Dentro de los diferentes componentes que existen en la vía mitocondrial de la apoptosis están las proteínas Citocromo C, Bax y Bcl2 que a continuación se describen brevemente.

### Citocromo C

La proteína Citocromo C se sintetiza en el citoplasma como apocitocromo C y luego es trasladada a la membrana externa de la mitocondria. Durante o después



de su importación al espacio intermembranal de la mitocondria, un grupo hemo es colocado al apocitocromo por enlaces tioéster a dos residuos de cisteína en la proteína, dando origen al Cit-C (van Gurp *et al.*, 2003). Esta molécula tiene un importante papel en la fosforilación oxidativa de los electrones, como transportador de electrones entre el complejo III (Citocromo C reductasa), y el complejo IV (Citocromo C oxidasa) de la cadena de electrones . Por mucho tiempo esa fue la única función conocida de la proteína, pero en los años 90's se describieron éstas nuevas funciones (Shi, 2001).

En mamíferos, el Citocromo C activa el ensamblaje del apoptosoma, que es un complejo formado por Cit-C, Apaf-1 (Apoptosis protease-activating factor-1) y dATP (desoxiadenosina trifosfato). Cit- C se une a Apaf-1 en presencia de ATP o dATP, convirtiendo a Apaf-1, de una forma monomérica cerrada, a una forma heptamérica abierta para que la procaspasa 9 se una. La procaspasa 9 se une a Apaf-1 en una secuencia de aminoácidos llamada dominio de reclutamiento de caspasa (CARD por sus siglas en ingles), lo cual provoca el cambio de la procaspasa 9 a caspasa 9 activa. La importancia de Cit-C, en la ejecución de la muerte celular en mamíferos ha sido confirmada por estudios genéticos en donde los genes correspondientes al Cit-C fueron dañados; los animales con esta característica mostraron sobre desarrollo de estructuras neuronales debido a la ausencia del proceso de apoptosis durante el desarrollo embrionario, resultando en muerte prenatal o perinatal (van Gurp *et al.*, 2003).

## **Bax**

El regulador de apoptosis Bax (que es también conocido como proteína parecida a bcl-2 4), es miembro de la familia de proteínas Bcl-2. Bax es un promotor de la apoptosis al unirse y antagonizar con la proteína Bcl-2 (Sedlak *et al.*, 1995).

El gen que codifica para la proteína Bax fue el primero que se identificó como un miembro pro-apoptótico de la familia de proteínas Bcl-2 (Sedlak *et al.*, 1995), los miembros de esta familia comparten uno o más de los 4 dominios característicos de esta familia y pueden formar hetero- u homodímeros.

En las células de mamíferos sanos, la mayor parte de Bax se encuentra en el citosol, pero con el inicio de la señalización de la apoptosis, Bax sufre un cambio conformacional, conforme avanza el proceso de apoptosis, Bax se convierte en una proteína asociada a la membrana mitocondrial (Gross *et al.*, 1998).

Se cree que Bax interactúa con los canales voltaje-dependientes de la mitocondria, además de inducir su apertura (Shi, 2003). Existe evidencia de que Bax, y/o Bak en su forma activada, forman un poro oligomérico (llamado MAC) en la membrana externa de la mitocondria con la consecuente liberación del Cit-C (Buytaert *et al.*, 2006). Este proceso también es conocido como permeabilización de la membrana externa mitocondrial, que lleva a la activación de las caspasas. Esto define el papel directo de Bax en la permeabilización de la membrana externa de la mitocondria, que es común a las proteínas de la familia Bcl-2 que contienen los dominios BH1, BH2 y BH3 (Weng *et al.*, 2005).

## **Bcl-2**

El nombre de esta proteína es el acrónimo de linfoma 2 de célula B. Fue descubierto en las células B de pacientes con linfoma no Hodgking, en donde las traslocaciones en los cromosomas 14 y 18 activan este gen (Reed, 1994).

La proteína Bcl-2 reside en la cara citoplasmática de la membrana externa de la mitocondria, en el retículo endoplasmico y en la envoltura nuclear; además puede registrar el daño a estos organelos y afectar su comportamiento, al parecer al modificar el flujo de pequeñas moléculas o proteínas. Aun cuando el dominio terminal COOH hidrofóbico, es un anclaje a la membrana importante, su delección no impide la función de sobrevivencia del Bcl-2. Se supone que Bcl-2 y sus familiares se anclan en proteínas específicas en los diferentes organelos.

Las proteínas pro-sobrevivencia también mantienen la integridad de los organelos. Bcl-2, directa o indirectamente, previene la liberación de Citocromo-C de la mitocondria lo cual, junto con ATP, puede facilitar el cambio estructural en Apaf-1 que permite el reclutamiento de la caspasa 9 y su procesamiento. Impedir la liberación del Citocromo-C parece no ser la única función de Bcl-2, porque Bcl-2 puede proteger a las células mucho después de que el Citocromo-C fue liberado.

Sin embargo, si el daño a los organelos es una señal apoptótica o no, aún se encuentra en duda (Adams y Cory., 1998), aunque se piensa que, en primera instancia, puede llevar a autofagia (Mathew y White., 2011).

## Antecedentes

Los efectos de la desnutrición en el sistema inmunológico se han estudiado en modelos experimentales, los análisis con animales de laboratorio proporcionan ventajas como son: el control de factores extra nutricionales (infecciones y medicamentos), que podrían enmascarar los efectos causados por la misma desnutrición. Aunque es claro que los resultados obtenidos con animales no son extrapolables a lo que sucede en los humanos, se reconoce que aportan información básica sobre los efectos de la desnutrición (Ortiz, *et al.* 1999). Las formas de estudio que se han utilizado a lo largo de los años incluyen aquellas que hacen uso de ratas. Este modelo permite fijar la variable nutricional y determinar cuáles son los procesos intratímicos que provocan la depresión de la inmunidad celular (Pallaro, 1997; Feliu y Slobodianik, 2002). Así, el modelo experimental en rata posibilita la generación de hipótesis que podrán ser referidas en el humano (Jambon *et al.*, 1988).

Para lograr este objetivo de generar hipótesis aplicables en humanos se utiliza una técnica para generar desnutrición en los animales, conocida como desnutrición por competencia de alimento durante la lactancia, que permite estudiar los efectos de la desnutrición en el sistema inmunológico. Este método consiste en colocar mayor número de crías por nodriza, que durante el periodo de lactancia recibirán la misma calidad de leche, pero en menor cantidad que las crías del grupo testigo o crías bien nutridas. Este modelo toma gran importancia, ya que se muestran diversos síntomas que son similares a las características clínicas de niños con desnutrición de tercer grado (Ortiz *et al.*, 1999).

Como se mencionó anteriormente, la desnutrición afecta a los mecanismos de defensa específica e innata del organismo (Dai *et al.*, 1998) con lo cual se aumenta la susceptibilidad a contraer infecciones, tanto bacterianas como virales, provocando, incluso, la muerte (Redmond *et al.*, 1991).

Algunos de los efectos de la desnutrición en la inmunidad innata son: se afecta la producción de células mieloides y su liberación de la médula ósea; se reduce la movilización de células inflamatorias hasta el sitio de lesión; se alteran los

procesos de fagocitosis, movilidad y quimiotaxis de neutrófilos; hay una disminución en la producción de citocinas (Simpson y Hoffman, 1993; Borrelli, 1995; Dai *et al.*, 1998), hay una alteración en la secreción de IgA y existe una disminución en la afinidad de anticuerpo. Ante necesidades inmediatas del organismo, los linfocitos se expanden de forma rápida (Janeway *et al.*, 2000).

Así, en estudios realizados en ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia, se ha mostrado una disminución en el número de linfocitos T en sangre periférica, esta etapa de desarrollo se podría extrapolar a la infancia temprana en niños (Ortiz *et al.*, 1999).

También otro estudio con ratas (Ortiz *et al.*, 2001) se demostró que en las ratas desnutridas la apoptosis espontánea es mayor a la que se presenta en ratas bien nutridas. Los autores proponen que puede ser debido a cambios en el microambiente del timo. Además, se encontró en otro trabajo (en ratas tratadas con dexametasona) que las células CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>, presentaron mayor frecuencia de apoptosis que las otras dos poblaciones celulares (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> y CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>+</sup>, al ser comparadas con timocitos de ratas bien nutridas (Ortiz, *et al.* 2008).

Mientras, que en niños nacidos con bajo peso se ha observado que el porcentaje de linfocitos en apoptosis es de 5 a 12 veces mayor que en linfocitos de niños nacidos con peso normal (Barg, 2004). La desnutrición inducida por deficiencia de proteínas, minerales o vitaminas, afecta los componentes linfoide y epitelial del timo, esto se refleja como cambios en el microambiente del timo, y posteriormente en una atrofia de este órgano debida a una disminución de los timocitos inducida por apoptosis, afectando particularmente a los linfocitos inmaduros (Prentice, 1999). En necropsias de niños desnutridos se determinó la disminución de timocitos por medio de estudios histológicos ultra estructurales e inmunohistoquímicos en los que se observó un incremento consistente en la red intraocular conteniendo matriz extracelular, lo cual fue detectado por la densa tinción de reticulina. Esta densa red en la matriz extracelular contenía fibronectina, laminina y colágena tipo IV. El aumento de matriz extracelular tímica en individuos

desnutridos correlacionó positivamente con el grado de disminución de timocitos (Lyra *et al.*, 1993).

En estudios con pacientes desnutridos se ha demostrado que existe una disminución en el número absoluto y relativo de linfocitos T maduros circulantes (Shenkin *et al.*, 1996) y una disminución más marcada en la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, también hay una pérdida de las funciones efectora y reguladora de linfocitos T, disminuye la resistencia contra enfermedades infecciosas presentándose una pérdida de reacciones de hipersensibilidad retardada y una reducción de la proliferación inducida por mitógenos y antígenos, aunque este trabajo aporta información al tema, los resultados son controversiales (Dai *et al.*, 1998). El deterioro en el sistema inmunológico podría no sólo deberse a la disminución en el número de linfocitos específicamente de los T CD4<sup>+</sup> (Dai *et al.*, 1998), sino también o principalmente a la fisiología alterada de éstos (González *et al.*, 1997).

Por otro lado, López (2012) demostró que la desnutrición afecta negativamente el desarrollo del timo y favorece al incremento de apoptosis temprana y tardía en los timocitos, reiteró que los sub tipos CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> y CD8<sup>+</sup> son las subpoblaciones más afectadas. También observó incremento en la proporción de timocitos positivos a caspasas 8 y 9, determinó que la caspasa-9 fue mayor en los CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> (López, 2012).

## **Justificación:**

Los modelos de desnutrición durante la lactancia producen estrés sobre los organismos, especialmente en el sistema inmunológico. Una de las respuestas ya reportadas a este estrés es el incremento de la apoptosis. Resulta importante conocer, con mayor precisión, cuál es la vía de inicio de la apoptosis preferente en este caso, para de esa manera poder encontrar a futuro una forma de contrarrestar las afectaciones que puedan causar o incluso tratar de evitar su aparición, esto a través de la medición de diferentes proteínas asociadas al proceso de apoptosis, como el Cit-C, Bax y Bcl2 en una misma muestra.

## **Pregunta de investigación:**

¿Cuál es el efecto de la desnutrición sobre las proteínas relacionadas a la apoptosis (Cit-C, Bax y Bcl2) de las subpoblaciones celulares CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> del timo?

## **Hipótesis:**

La falta de nutrientes en las ratas lactantes alterará el microambiente del timo, lo cual provocará aumento en la frecuencia de apoptosis, que estará relacionada con el aumento en la expresión de las proteínas Cit-C y Bax y disminuyendo la presencia de Bcl2, en las células del timo de las ratas desnutridas; por lo tanto se presentara la apoptosis preferentemente por vía intrínseca.

## **Objetivos:**

### **General:**

- Analizar la frecuencia de apoptosis y la expresión de algunas moléculas participantes de este proceso en células de timo de ratas desnutridas.

### **Particulares:**

- Comparar la proporción de células en apoptosis de timo de ratas bien nutridas contra ratas desnutridas.
- Evaluar la apoptosis en subpoblaciones celulares del timo (CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>) de ratas desnutridas.
- Determinar la presencia de Citocromo C, Bax y Bcl-2 en los timocitos de ratas desnutridas.
-



## **Material y Método**

### **Desnutrición experimental en ratas.**

En este estudio se utilizaron crías de ratas de la cepa Wistar de 21 días de edad, criadas en el Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, con ciclos 12/12 horas de luz/oscuridad, temperatura entre 22-25 °C y humedad relativa de un 60 %.

Se estudiaron dos grupos de ratas: bien nutridas (BN) y desnutridas (DN). La desnutrición se indujo experimentalmente por competencia de alimento durante el periodo de lactancia, que comprende los primeros 21 días de vida. Los grupos se formaron con crías de un día de edad: las camadas de las ratas BN fueron formadas con 7 crías por nodriza, y las camadas de ratas DN con 16 crías por nodriza. Se realizó el seguimiento del peso de las ratas durante el periodo de lactancia. Transcurridos los 21 días de lactancia, se procedió a calcular el grado de desnutrición. Para lo cual se determinó el déficit de peso de las crías DN en relación al peso alcanzado por las del grupo de ratas BN. Se seleccionaron los individuos que presentaron desnutrición grave o de grado tres , es decir con un déficit de peso del 40% o mayor..

### **Obtención de timocitos**

Al cabo de los 21 días de edad, las ratas fueron pesadas y sacrificadas por dislocación cervical. Se sacrificó a una rata por grupo en cada ensayo. Se extrajo el timo de cada rata, se eliminó el tejido conjuntivo y se mantuvo en solución amortiguadora de fosfatos (PBS en inglés). Cada timo fue disgregado con 3 mL de PBS, utilizando una malla de plástico y un pistilo de vidrio. De la suspensión celular obtenida se tomaron 10  $\mu$ L que se mezclaron con 990  $\mu$ L de ácido acético al 2% durante 10 minutos, para realizar la cuenta celular al microscopio se utilizó una cámara de Neubauer.

La obtención de la cuenta celular por órgano se obtuvo al realizar el cálculo siguiente:  $(\eta) (1 \times 10^4) (100) (3) =$  número de células por timo. Dónde:  $\eta =$  Media

celular en los cuadrantes de la cámara Neubauer.  $1 \times 10^4$  = Factor constante. 100 = Factor de dilución de la muestra para su conteo. 3 = Volumen total en mL, en que se disgregó el órgano.

### **Determinación de apoptosis por citometría de flujo**

Se prepararon muestras marcadas como BN y DN y se realizó el siguiente procedimiento:

1. De la suspensión celular obtenida (timocitos) se colocaron alícuotas de 100µl en tubos falcon de acuerdo al cuadro 1
2. Se realizó un lavado con 1ml de PBS a 200g por 5 minutos.
3. Se adicionaron los anticuerpos de superficie CD4<sup>+</sup>(FIT-C) o CD8<sup>+</sup>(PE) por 30 minutos a temperatura ambiente y se protegió de la luz.
4. Se realizó otro lavado a 200 X g por 5 minutos, y posteriormente se resuspendió en 200 µl de buffer de unión diluido (1:4 V/V).
5. En el tubo para la medición de Anexina V se agregaron 5 µl de Anexina V y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
6. Se realizó un lavado en 200 µl de buffer de unión a 200 X g por 5 minutos.
7. Se resuspendió en 190 µl de buffer de unión.
8. Se realizaron las mediciones en el citómetro de flujo de modelo FACScalibur (Becton Dickinson). Todas las muestras se analizaron utilizando el software CELL Quest., analizando 10,000 células por tubo.

<b>Tubos</b>
1. Auto fluorescencia
2. Anexina
3. IP
4. CD4 <sup>+</sup> + Anexina
5. CD8 <sup>+</sup> + Anexina
6. Anexina + IP

**Cuadro 1.** Tubos utilizados para los experimentos de apoptosis y necrosis. Cada uno de los tubos citados se utilizo para cada rata de ambos grupos (BN y DN)

## **Detección de Bcl-2, Cit-C y Bax.**

Las muestras se dividieron en dos grupos: BN y DN y se realizó el siguiente procedimiento:

Marcaje de antígenos de superficie.

1. Se colocaron 100 µl de suspensión celular en tubos para citómetro de flujo.
2. Se colocaron 2 µl de anticuerpos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en cada uno de los tubos, se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad. Al control se le agregaron 2 µl de IgG1<sub>k</sub>-FITC.
3. Transcurrido el tiempo se realizó un lavado con 2ml de PBS-BASA al 0.5% a 300 X g por 3 minutos. Se repitió este paso dos veces.

Detección intracelular de proteínas

1. Se adiciono 0.5ml de solución permeabilizadora, agitando suavemente con el vórtex y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente.
2. Se realizó un lavado con 2ml de PBS-BSA al 0.5% a 500 X g por 5 minutos.

3. Se agregaron 10  $\mu$ l de Cit-C, Bcl-2 o Bax (dependiendo del tubo) y se dejaron incubar durante 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
4. Nuevamente se procedió a lavar con 200 $\mu$ l de PBS-BASA a 500 X g por 5 minutos.
5. Se resuspendieron las muestras con 100  $\mu$ l de paraformaldehído al 1% para fijar las células.
6. Se realizaron las mediciones en el citómetro de flujo, analizando 10,000 células por muestra.

Para las mediciones en el citómetro se verificó el funcionamiento del equipo y se realizó una calibración, posteriormente se adquirieron 10,000 células de cada una de las muestras utilizando un citómetro de flujo modelo FACScalibur (Becton Dickinson). Todas las muestras se analizaron utilizando el software CELL Quest.

### **Análisis Estadístico**

Al obtener los resultados de las pruebas se realizó una prueba de normalidad de Kolmogorov, resultando negativa. Ante este resultado se decidió usar una prueba de U de Mann-Whitney y se utilizó el Error Estándar (EE) por la cantidad de muestras que se generaron, en el caso de las mediciones de citometría de flujo. Se consideraron diferencias significativas de  $p < 0.05$ .

## Resultados

### Grupos de estudio

Para el estudio se utilizaron 5 ratas que no presentaron déficit de peso, de estas fueron 4 machos y 1 hembra con un promedio de peso corporal de 57.6 g; este grupo fue el grupo comparativo, llamado BN. El grupo de ratas desnutridas (DN) se integró con 5 ratas, su promedio de peso fue de 31.18 g y con un déficit de peso promedio de 59.69%. Fueron 2 machos y 3 hembras con desnutrición grave (déficit de peso mayor al 40%) (Cuadro 2).

	BN	DN	Déficit de peso
	Peso (g)		(%)
	60.6	13.1	47.50
	65.4	43.9	67.12
	58.03	32.2	55.48
	51.6	36.0	69.76
	52.4	30.7	58.58
<b>Promedio</b>	57.60	31.18	59.69

**Cuadro 2.** Pesos de las ratas BN y DN empleadas en el presente estudio.

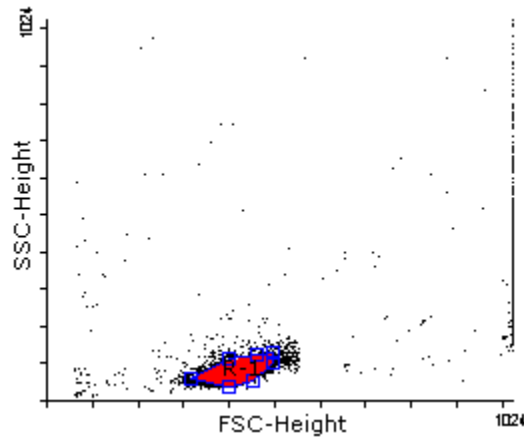
El peso de los timos de las ratas anteriormente mencionadas tuvieron un promedio de 186.03 mg en las ratas del grupo BN y de 79.26 mg en el grupo de las DN.

# Evaluación de la apoptosis

## Selección de las regiones de análisis

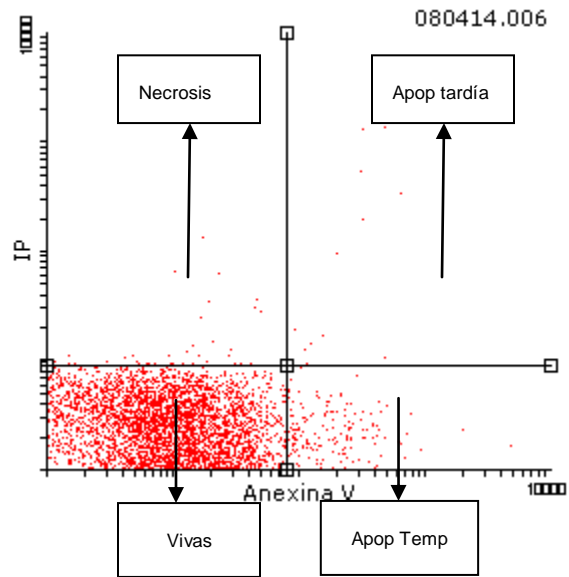
A continuación se muestra en la figura del procedimiento para la selección de las poblaciones en las gráficas de puntos (*dot plot*) que se generaron.

Para elegir la zona de la población utilizada, se localizo el área de mayor cantidad de células y que estas se encontraran en una zona donde se deberían encontrar los linfocitos en el dot plot de acuerdo a su tamaño y complejidad.

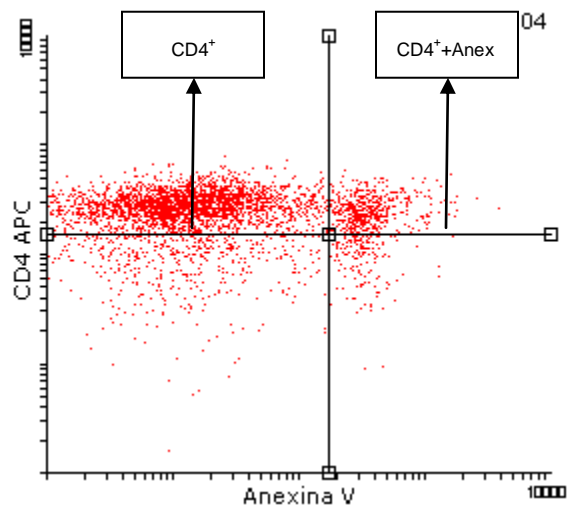


**Figura. 4.** Selección de la población que se utilizo para el estudio en el *dot plot* generado durante la adquisición de las muestras. R1= región 1 que fue la utilizada para el trabajo.

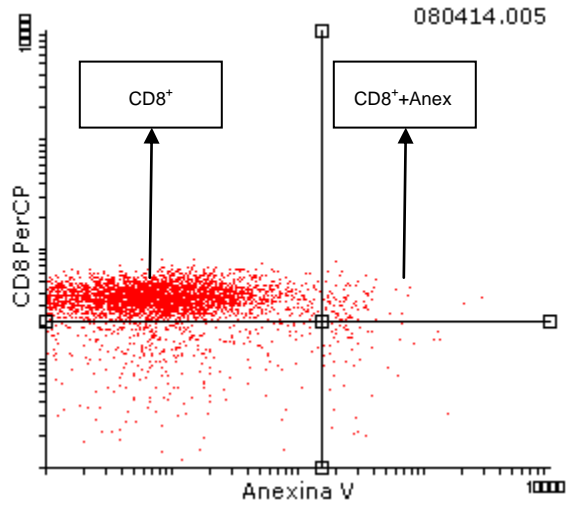
En las figuras 5 a 8 se aprecia, en forma esquemática, la forma en la que se interpretaron las gráficas de punto (*dot plot*).



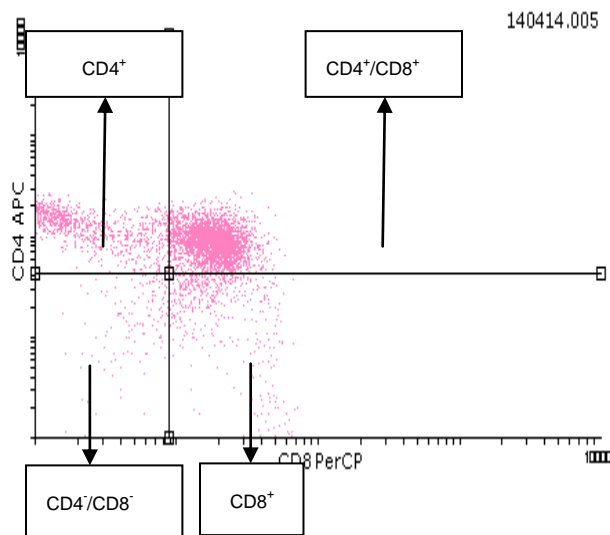
**Figura 5.** Selección de los cuadrantes en el dot plot para las mediciones de Anexina V y IP, en los cuales se midieron células vivas, en apoptosis temprana, tardía y en necrosis.



**Figura 6.** Selección de los cuadrantes en el dot plot en las mediciones de Anexina V y CD4<sup>+</sup>



**Figura 7.** Selección de los cuadrantes en el *dot plot* en las mediciones de Anexina V y CD8+.



**Figura 8.** Selección de los cuadrantes en el *dot plot* en las mediciones de los diferentes tipos celulares.

Se identificaron cuatro tipos de células: CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (dobles positivas, para las dos fluorescencias); CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> (dobles negativas, para las dos fluorescencias); CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup> (simples positivas, sólo para la fluorescencia de CD4<sup>+</sup>); y CD8<sup>+</sup>/CD4<sup>-</sup> (simples positivas, sólo para la fluorescencia de CD8<sup>+</sup>).



## DetECCIÓN DE ANEXINA V

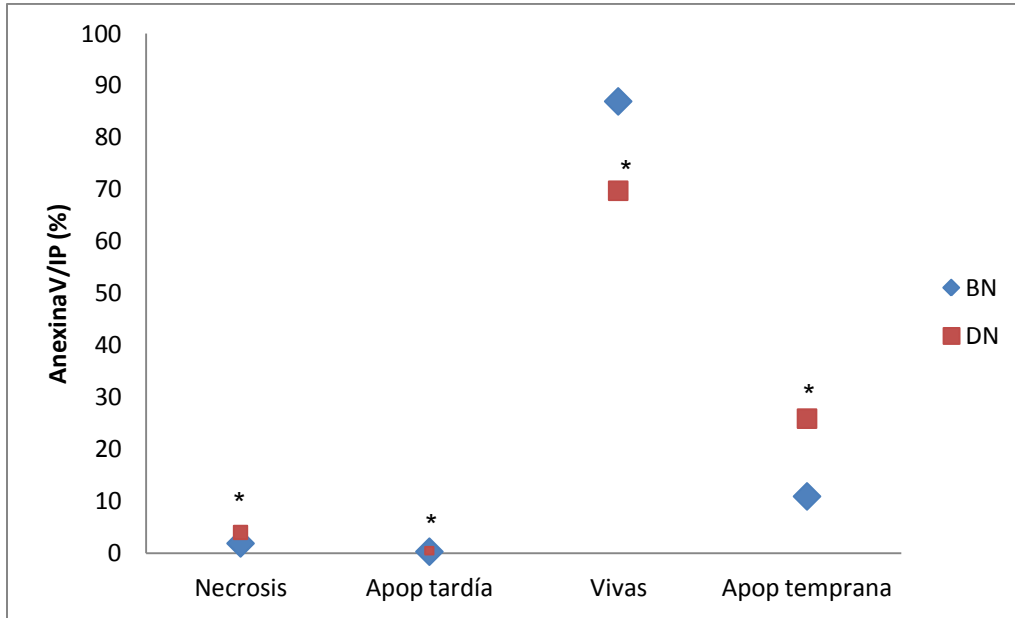
La evaluación de apoptosis realizada a través de la detección de Anexina V, mostró un  $0.27 \pm 0.03\%$  de células en apoptosis tardía en las ratas BN y para apoptosis temprana se observó un promedio de  $10.91 \pm 3.46\%$ . También en las ratas BN se observó  $1.86 \pm 0.46\%$  de células en necrosis y por último, se detectó un promedio de  $86.94 \pm 3.48\%$  de células vivas.

En el grupo DN se observó en apoptosis tardía  $0.41 \pm 0.03\%$  de células y para apoptosis temprana un promedio de  $25.88 \pm 3.46\%$ . Mientras, que para el promedio de necrosis se presentó un promedio de  $3.96 \pm 0.46\%$  y por último para células vivas hubo un promedio de  $69.74 \pm 3.48\%$ .

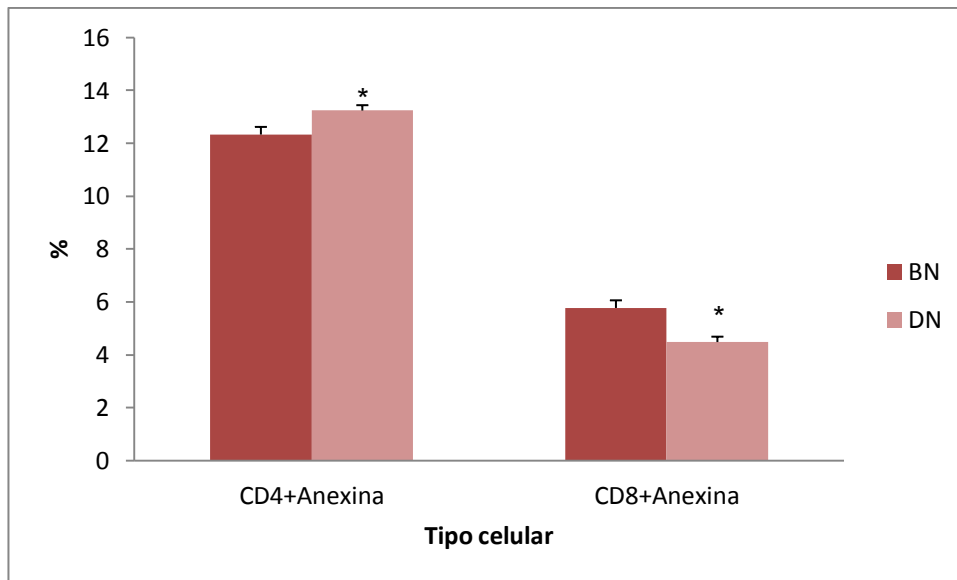
Al comparar los resultados entre los grupos podemos observar que los porcentajes de necrosis y de apoptosis fueron mayores en el grupo de las DN al ser comparadas con las BN; cabe mencionar que todas las mediciones fueron estadísticamente significativas con  $p \leq 0.05$ .

Grupo	Vivas	Apoptosis temprana	Apoptosis tardía	Necrosis
BN	86.94	10.91	0.2775	1.86
DN	69.74	25.88	0.4175	3.96

**Cuadro 3.** Porcentajes promedio de células en necrosis (positivas a yoduro de propidio), en apoptosis tardía y temprana (positivas a Anexina V) y células vivas, en timocitos de ratas bien nutridas y desnutridas. Los resultados representan el promedio de 5 ratas por grupo.



**Figura 9.** Promedio de timocitos en necrosis (IP), en apoptosis tardía y temprana (Anexina V) y células vivas, en timocitos de ratas bien nutridas (BN) y desnutridas (DN). \*  $p \leq 0.05$  entre grupo DN y BN. Los valores representan el promedio de 5 ratas por grupo de animales.



**Figura 10.** Promedio de células de timo de ratas bien nutridas (BN) y desnutridas (DN) positivas a los marcadores de superficie  $CD4^+$  +Anexina ( $p=0.009$ ) y  $CD8^+$  + Anexina V ( $p=0.009$ ). Las barras representan el promedio de 5 ratas por grupo de animales.\*  $p \leq 0.05$  entre grupo DN y BN.

Cuando se observaron los datos específicos de las subpoblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> Anexina V<sup>+</sup>, se observó un promedio en células de ratas BN de 12.33 ± 0.20% y 5.77 ± 0.28%, respectivamente. De la misma manera para el grupo DN se presentaron los valores de 13.23 ± 0.20% y 4.48 ± 0.28%, respectivamente. Como en el caso anterior, ambas poblaciones presentaron un aumento en el promedio de células positivas a Anexina V, al comparar el grupo de DN contra el grupo BN, también se encontró una diferencia estadísticamente significativa con una p ≤ 0.05. En el cuadro 3 se encuentran los promedios de ambos grupos y en las figuras 9 y 10 muestran las desviaciones estándar de cada caso.

## Proteínas intracelulares relacionadas a la apoptosis

### Proteína Bcl-2

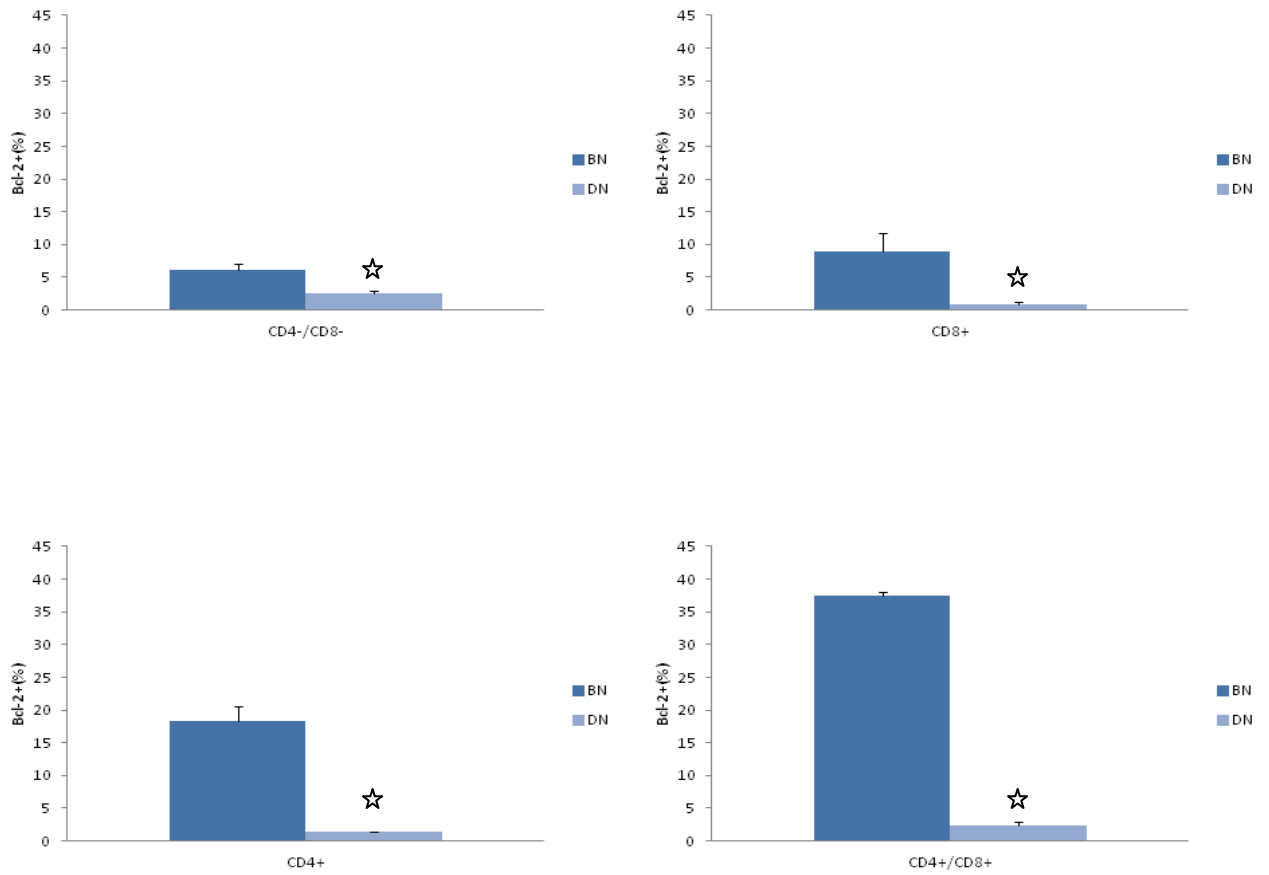
Bcl-2 +								
Grupos	CD4 <sup>-</sup> /CD8 <sup>-</sup>	EE	CD8 <sup>+</sup>	EE	CD4 <sup>+</sup>	EE	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	EE
BN	6.20	0.82	8.85	2.97	18.24	2.38	37.44	0.54
DN	2.47*	0.54	0.86*	0.47	1.36*	0.15	2.31*	0.58

**Cuadro 4.** Porcentajes de células de timo de rata positivas a Bcl-2 de acuerdo a las subpoblaciones celulares. CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> (p=0.009), CD8<sup>+</sup> (p=0.009), CD4<sup>+</sup> (p=0.009) y CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (p=0.009) de ratas bien nutridas y desnutridas. \*=presentaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo DN vs el BN; se utilizó la prueba estadística de U de Mann-Whitney. Se presentan los promedios de 5 ratas por grupo.

Los resultados obtenidos en la determinación de células positivas a la proteína Bcl-2 en timocitos de las ratas bien nutridas se encontró para la subpoblación celular CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> un promedio de 6.20 ± 0.82%. Mientras, que en el grupo de ratas DN, el promedio fue de 2.47 ± 0.54%. Hubo diferencia significativa p = 0.009 entre los valores promedio.

Para la subpoblación celular CD8<sup>+</sup> el promedio fue de  $8.86 \pm 0.86\%$  y  $2.97 \pm 0.47\%$  para los grupos BN y DN, respectivamente. Se encontró diferencia significativa entre los valores promedio.

Mientras, que para la subpoblación celular CD4<sup>+</sup> el promedio para el grupo BN fue de  $18.24 \pm 2.38\%$  y para el grupo DN fue de  $1.36 \pm 0.15\%$ . Los valores promedio mostraron diferencia estadística ( $p = 0.009$ ). Por último, para la subpoblación celular CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, el promedio en las ratas BN fue de  $37.44 \pm 0.54\%$  y en las ratas DN, promedio fue de  $2.31 \pm 0.58\%$ , Los valores promedio mostraron diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.009$ ). El cuadro 4 muestra los resultados obtenidos en ambos grupos y la figura 11 presenta las gráficas comparativas entre las diferentes subpoblaciones celulares estudiadas



**Figura 11.** Porcentajes de células de timo de rata positivas a Bcl-2 de acuerdo a las subpoblaciones CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> (p=0.009), CD8<sup>+</sup> (p=0.009), CD4<sup>+</sup> (p=0.009) y CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (p=0.009) de ratas bien nutridas y desnutridas. \*=presentaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo DN vs el BN; se utilizó la prueba estadística de U de Mann-Whitney. Se presentan los promedios de 5 ratas por grupo.

## Citocromo C

Citocromo C+								
Grupos	CD4 <sup>-</sup> /CD8 <sup>-</sup>	EE	CD8 <sup>+</sup>	EE	CD4 <sup>+</sup>	EE	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	EE
<b>BN</b>	2.25	0.39	3.42	0.26	1.92	0.17	2.43	0.23
<b>DN</b>	15.07	2.22	8.00	1.49	9.75	1.75	14.96	4.65

**Cuadro 5.** Porcentajes de células de timo de rata positivas a Bcl-2 de acuerdo a las subpoblaciones celulares. CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> (p=0.009), CD8<sup>+</sup> (p=0.009), CD4<sup>+</sup> (p=0.009) y CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (p=0.009) de ratas bien nutridas y desnutridas. \*=presentaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo DN vs el BN; se utilizó la prueba estadística de U de Mann-Whitney. Se presentan los promedios de 5 ratas por grupo.

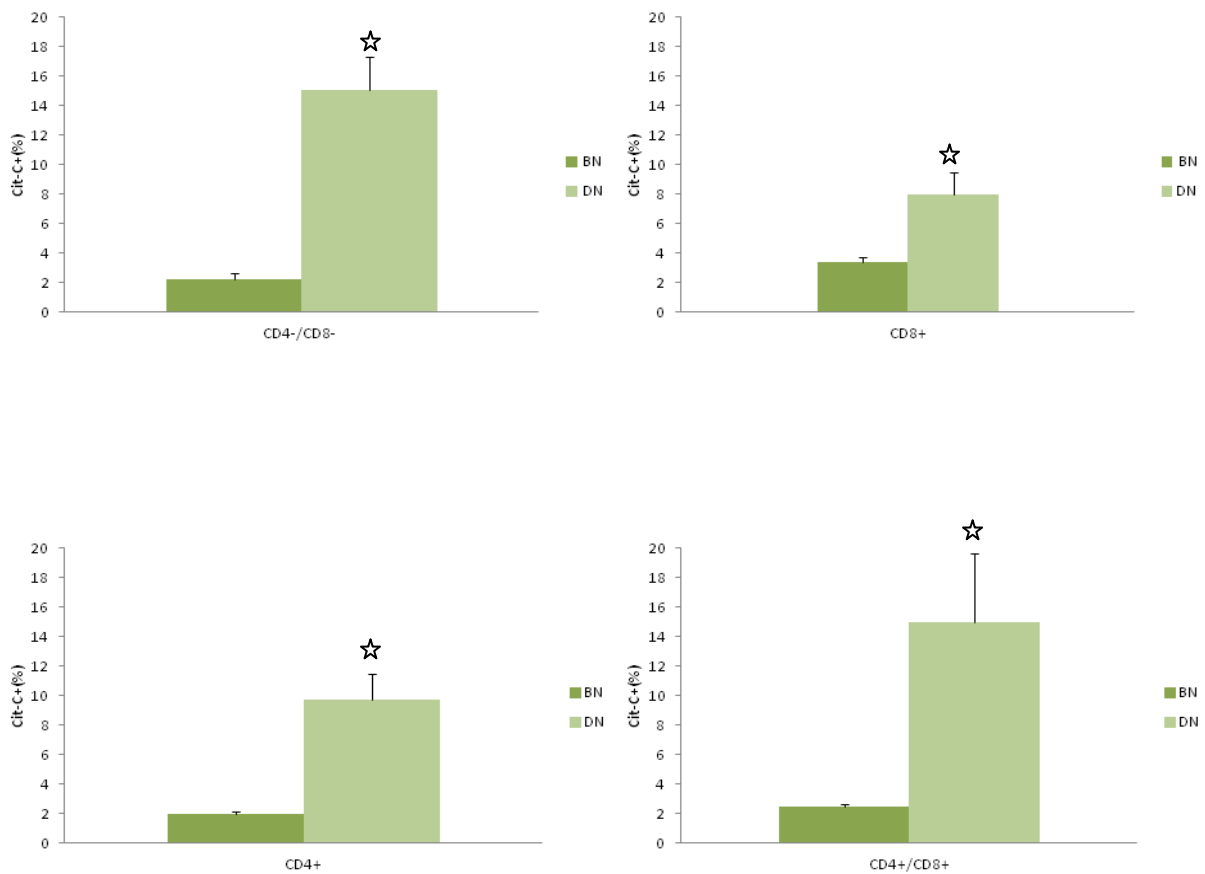
Mientras que para el análisis de las células positivas a Citocromo C se obtuvieron los siguientes resultados. En las ratas bien nutridas se encontró un promedio de  $2.25 \pm 0.39\%$  para la subpoblación celular CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>, mientras que en las ratas desnutridas el valor promedio de éstas subpoblaciones celulares fue de  $15.07 \pm 2.22\%$ . La comparación estadística mostró que hubo diferencia significativa  $p < 0.05$ .

Por otro lado, en la subpoblación celular CD8<sup>+</sup> de ratas BN se obtuvo un valor promedio de  $3.42 \pm 0.26\%$ , y en el grupo de ratas DN el promedio fue de  $8.00 \pm 1.49\%$ .

El análisis en la subpoblación celular CD4<sup>+</sup> en las ratas BN, se obtuvo un valor promedio de  $1.92 \pm 0.17\%$ , y en las ratas DN, el promedio fue de  $9.75 \pm 1.75\%$ . Siendo los valores promedio diferentes estadísticamente ( $p = 0.009$ ).

El promedio de células positivas a citocromo C en la subpoblación CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> en el grupo de ratas BN fue de  $2.43 \pm 0.23\%$ , y en el grupo de ratas DN, el promedio fue de  $14.96 \pm 4.65\%$ . Los valores promedio mostraron diferencia estadística ( $p = 0.009$ ).

Estos resultados, también se muestran en el cuadro 5 y en la figura 12 se pueden apreciar las gráficas comparativas entre las diferentes subpoblaciones celulares estudiados.



**Figura 12.** Porcentajes de células de timo de rata positivas a Bcl-2 de acuerdo a las subpoblaciones CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> (p=0.009), CD8<sup>+</sup> (p=0.009), CD4<sup>+</sup> (p=0.009) y CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (p=0.009) de ratas bien nutridas y desnutridas. \*=presentaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo DN vs el BN; se utilizó la prueba estadística de U de Mann-Whitney. Se presentan los promedios de 5 ratas por grupo.

## Bax

Bax +								
Ratas	CD4 <sup>-</sup> /CD8 <sup>-</sup>	EE	CD8 <sup>+</sup>	EE	CD4 <sup>+</sup>	EE	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	EE
<b>BN</b>	3.62	1.21	2.326	0.31	5.074	1.05	3	0.77
<b>DN</b>	58.72	11.7	9.758	1.02	25.76	4.49	17.62	1.95

**Cuadro 6.** Porcentajes de células de timo de rata positivas a Bcl-2 de acuerdo a las subpoblaciones celulares. CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> (p=0.009), CD8<sup>+</sup> (p=0.008), CD4<sup>+</sup> (p=0.009) y CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (p=0.009) de ratas bien nutridas y desnutridas. \*=presentaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo DN vs el BN; se utilizó la prueba estadística de U de Mann-Whitney. Se presentan los promedios de 5 ratas por grupo.

En la detección de células positivas la proteína pro-apoptótica Bax, se obtuvieron los siguientes resultados; para el grupo de las ratas bien nutridas se mostraron en la subpoblación celular CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> un valor promedio de  $3.62 \pm 1.21\%$ , mientras que en las ratas DN, el valor promedio fue de  $58.72 \pm 11.67\%$ . Los valores promedio mostraron diferencia significativa ( $p = 0.009$ ).

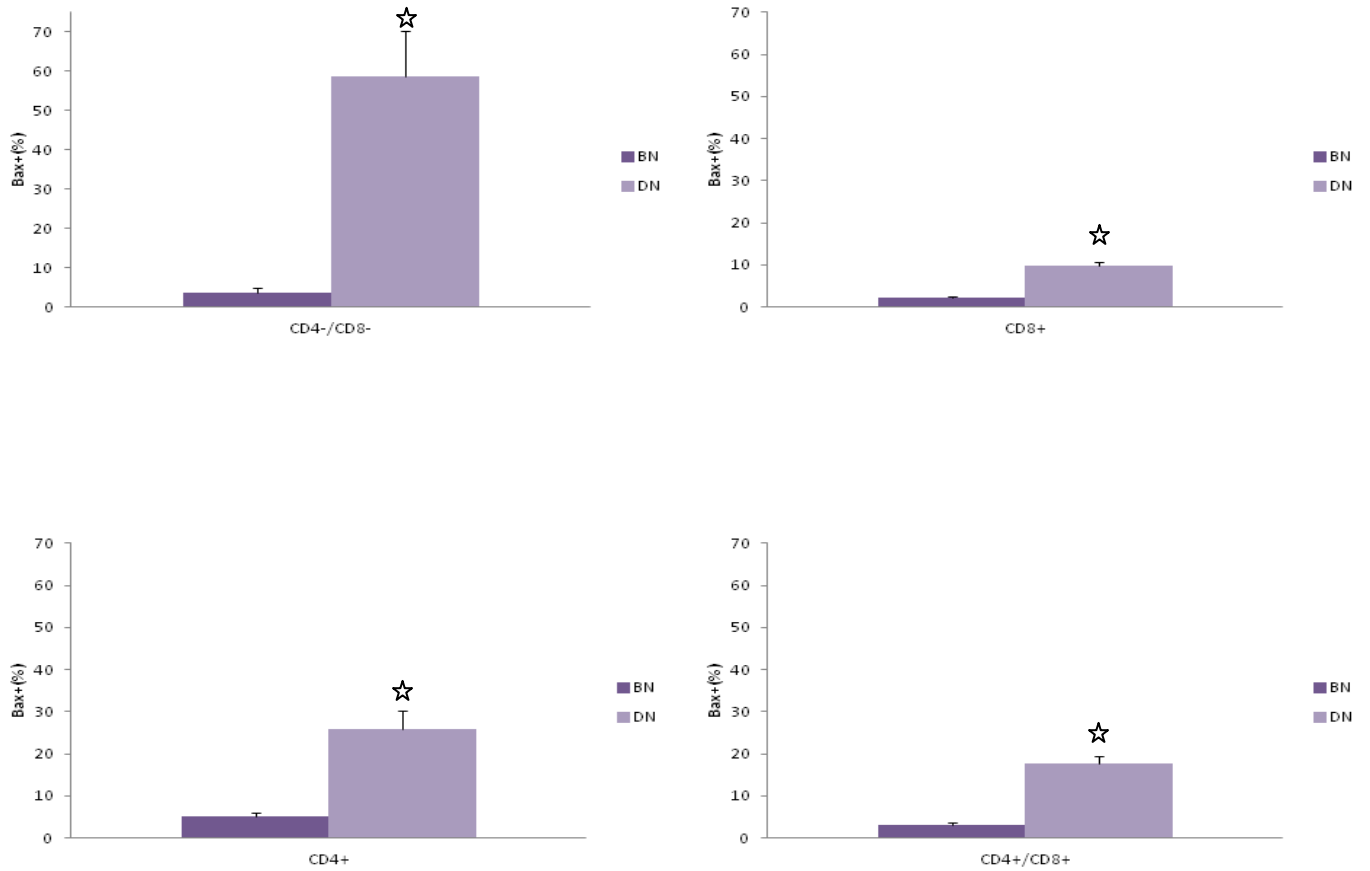
En el caso de la subpoblación celular CD8<sup>+</sup> en ratas BN se obtuvo un valor de  $2.32 \pm 0.31\%$  y para las células DN, el valor promedio fue de  $9.75 \pm 1.02\%$ . Se encontró diferencia estadística entre los valores promedio ( $p = 0.008$ ).

En el análisis en la subpoblación CD4<sup>+</sup> en ratas BN se obtuvo un promedio de  $5.07 \pm 1.05\%$ , y en el grupo de ratas DN se obtuvo un promedio de  $25.76 \pm 4.49\%$ . Los valores promedios fueron diferentes significativamente ( $p=0.009$ ).

Finalmente, en la medición de la subpoblación CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> se obtuvo para el grupo BN un valor promedio de  $3.00 \pm 0.77\%$  y en el grupo DN  $17.63 \pm 1.95\%$ . La comparación estadística mostró diferencia significativa ( $p = 0.009$ ).

Estos datos se pueden apreciar en el cuadro 6 y en la figura 13 se pueden observar las gráficas comparativas entre los diferentes tipos celulares estudiados.





**Figura 13.** Porcentajes de células de timo de rata positivas a Bcl-2 de acuerdo a las subpoblaciones CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> (p=0.009), CD8<sup>+</sup> (p=0.008), CD4<sup>+</sup> (p=0.009) y CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (p=0.009) de ratas bien nutridas y desnutridas. \*=presentaron diferencias estadísticamente significativas al comparar el grupo DN vs el BN; se utilizó la prueba estadística de U de Mann-Whitney. Se presentan los promedios de 5 ratas por grupo.

## Discusión

En el cuadro 2, se muestra que el modelo de desnutrición experimental por competencia de alimento durante la lactancia indujo en las ratas un déficit en el peso corporal del 54.13 %, respecto al peso corporal de ratas bien nutridas de la misma edad cronológica. Confirmándose que el modelo experimental permite emular y/o duplicar diversos síntomas y signos clínicos semejantes a las descritas en niños con desnutrición de tercer grado (Ortiz, 1999).

La desnutrición es una de las causas de deficiencias en el sistema inmunológico (Savino, 2002), esta condición nutrimental afecta a los componentes linfoides y epitelial del timo, lo cual se refleja como cambios en el microambiente y posteriormente en una atrofia de este órgano debida a una disminución en el número de timocitos. Además de la atrofia del timo, también se disminuye la producción de hormonas tímicas. En este estudio, se corrobora que el timo es un barómetro de la desnutrición. La atrofia tímica y la linfopenia, son marcadores inmunológicos de la desnutrición (King, 2002).

Un defecto en la diferenciación y maduración de los linfocitos puede verse reflejado en el número de estas células en sangre periférica, por lo que podría haber una alteración en el número de los linfocitos T y sus subpoblaciones.

Se ha establecido que una disminución en la celularidad del timo, es inducida por apoptosis, afectando particularmente a los linfocitos inmaduros durante los procesos de selección positiva y/o negativa (Abbas y Litchman, 2007).

En el presente estudio se determinó la frecuencia de apoptosis (temprana y tardía) y necrosis. Los resultados mostraron que el grupo de las ratas DN presentó un mayor porcentaje (el doble o superior) de células tanto en apoptosis temprana como en apoptosis tardía (donde hubo diferencia estadísticamente significativa entre grupos). Este mismo comportamiento, se observó en la necrosis, siendo significativamente diferente entre los grupos DN y BN.

Y por último, en el grupo de ratas desnutridas se observa una disminución en un 15% en células vivas, siendo significativa con el grupo de ratas bien nutridas.

En la figura 9, se muestra el análisis en las subpoblaciones CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, mostró entre ellas una susceptibilidad distinta a la desnutrición. En el caso de las células CD4<sup>+</sup>/Anexina V<sup>+</sup> en ratas desnutridas mostraron un aumento en 1%, y una disminución similar en la subpoblación CD8<sup>+</sup>/Anexina V<sup>+</sup>.

Estos datos muestran un comportamiento similar a lo descrito por Cuervo-Escobar (2014), en el cual realizaron un análisis histológico y por citometría de flujo en timo y bazo de ratas desnutridas infectadas con *Leishmania infantum*. Ese estudio demostró una disminución en los timocitos CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>; que si bien estos resultados son obtenidos en células que además se encuentran infectadas, son comparables a los datos del presente estudio ya que usualmente las condiciones de desnutrición e infección están íntimamente relacionadas y usualmente ambas condiciones se presentan juntas.

Por otro lado, respecto al aumento en la frecuencia de apoptosis total, estos datos concuerdan con los hallazgos de Ortiz y colaboradores (2001), quienes analizaron por citometría de flujo la frecuencia de apoptosis en ratas desnutridas y/o tratadas con dexametasona, y encontraron que en las ratas desnutridas la apoptosis espontánea es mayor a la que se presenta en ratas bien nutridas. Los autores sugieren que esta diferencia se podría relacionar con cambios en el microambiente del timo.

Del mismo modo, López (2012) observó que la desnutrición afecta negativamente el desarrollo del timo e incrementa la apoptosis temprana y tardía en los timocitos, siendo las subpoblaciones CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> y CD8<sup>+</sup> las más susceptibles. Asimismo, se observó un incremento en la proporción de timocitos positivos a caspasas 8 y 9, siendo la caspasa 9 la que se encontró mayormente en las subpoblaciones CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup>, CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.

No sólo la desnutrición provoca efectos deletéreos sobre las subpoblaciones en el timo, previamente Nodera y colaboradores (2001) indujeron en ratas una carencia en el zinc y evaluaron la frecuencia de apoptosis, encontrando que esta es mayor en las células de diferentes tejidos al ser comparadas contra las ratas control.

Finalmente, El-Hodhod y colaboradores (2005) en niños desnutridos encontraron un incremento en la frecuencia de apoptosis en los linfocitos totales en sangre periférica al compararlo con las muestras de niños en buen estado nutricional, este estudio fue realizado con citometría de flujo, utilizando Anexina V e IP. Con lo cual se comprueba que la incidencia de apoptosis si es influenciada por la condición nutricional y que esta al ser carencia provoca un aumento en la frecuencia de muerte celular por apoptosis en las ratas desnutridas, haciendo que el sistema inmunológico no posea la respuesta adecuada para enfrentar a las infecciones y poniendo en riesgo la vida de los individuos que la padecen.

### **Proteínas intracelulares**

Para determinar la posible vía por la cual se da la apoptosis, se examinaron tres moléculas: Citocromo C, Bax y Bcl-2. Tanto, el Citocromo-C como Bax son esenciales en los procesos de apoptosis de vía intrínseca.

### **Bcl-2**

Bcl-2 es una proteína, que al expresarse puede evitar la progresión de la muerte celular por apoptosis (Rivadeneira, 2001). Por lo que, su medición puede ayudar a conocer el estado de protección de las células en las que se estudia y dar información sobre su estado.

Se ha propuesto que la proteína Bcl-2 es importante en la respuesta inmunológica. En un estudio realizado por Hotchkiss y colaboradores (1999), encontraron en ratones transgénicos que una sobre-expresión de la proteína Bcl-2 protegía a las células de los efectos de la sepsis causada por la excesiva apoptosis en el timo.

Los datos del presente estudio muestran, al evaluar las células positivas a Bcl-2, que las ratas desnutridas presentan una disminución significativa en su expresión (en un 87%) en las diferentes subpoblaciones de células del timo.

El análisis en las diferentes subpoblaciones, muestra que las células CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (disminución en un 94%) y CD4<sup>+</sup> (disminución en un 93%) fueron drásticamente afectadas por la desnutrición. Estos resultados parecen correlacionarse con la proporción de células en apoptosis observado en tales subpoblaciones. Mientras,

que las células CD4<sup>+</sup> aumenta el promedio. En las células CD8<sup>+</sup> el promedio de apoptosis disminuye, la diferencia en el promedio de células positivas a Bcl-2 fue de un 33%, siendo menor que el encontrado en las células CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>.

Como se ha descrito, se puede notar que la tendencia de muerte celular aumenta en las células de las ratas desnutridas, probablemente al presentar un menor contenido de ésta proteína anti apoptótica, no se tendrá la misma protección que en las otras células de ratas bien nutridas. Esta disminución probablemente sea debida a los cambios en el microambiente, que incluyen un aumento en la densidad de la red de tejido epitelial y un aumento de la deposición de matriz extracelular del timo. Estos cambios podrían provocar alteraciones en la dinámica de la célula, provocando que tal vez la síntesis de proteínas sea anormal o escasa, lo cual a corto plazo provocara una mayor cantidad de muerte celular. Aunque no existen al momento estudios sobre la síntesis de proteínas pro o anti apoptóticas, previamente en el estudio de Wykes (1996) se midió la síntesis de proteínas utilizando isotopos de hidrógeno. En ese estudio se utilizaron cerdos de 8 semanas a los cuales se les dio una dieta baja en proteínas para lograr un estado de desnutrición parecido al Kwashiorkor. Los autores reportaron que la síntesis de proteínas en los cerdos con desnutrición era menor en varios tipos celulares (entre ellos células de la piel, el intestino, musculo e hígado), lo cual podría ser extrapolado también a la producción ineficiente de las proteínas pro y anti apoptóticas en las células de las ratas DN, lo cual explicaría la falta de protección en las células, sobre todo en las doble negativas.

Estos resultados concuerdan con lo encontrado por Rivadeneira y colaboradores (2001), quienes observaron en ratas con desnutrición una disminución en la expresión de Bcl-2 en macrófagos peritoneales, esto en consecuencia provocó mayor frecuencia de apoptosis.

La pérdida de la cantidad de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, pueden traer como consecuencias que las funciones celulares de el timo se vean comprometidas no solo a nivel del órgano, sino a nivel de la defensa sistémica del organismo, lo cual implicaría una falla en la capacidad de defensa de el organismo y esta a su vez

provocaría una mayor propensión a la enfermedad, que también provoca que los nutrientes no sean correctamente aprovechados, creando así un círculo vicioso de enfermedad y desnutrición.

## **Citocromo C**

El citocromo C, además de ser parte de la cadena respiratoria mitocondrial participa en la muerte celular por apoptosis en la vía intrínseca, cuando es exportado desde el interior de la membrana interna mitocondrial hacia el citoplasma celular, y posteriormente, se une a la procaspasa 9 y a la proteína Apaf-1 para formar el apoptosoma y ejecutar la reacción de las caspasas y demás proteínas involucradas en la realización de muerte celular. Como el Cit-C es una de las proteínas implicadas en la apoptosis, su detección e identificación puede ser utilizada como un marcador de apoptosis (Ng et al., 2012).

Los resultados del presente estudio muestran que en el grupo de ratas DN hubo un mayor porcentaje de células positivas al Citocromo C en el citoplasma (48%), al ser comparado con el grupo BN (10%). Todos los resultados fueron estadísticamente significativos. Bajo el supuesto que el citocromo-C es una proteína marcadora del proceso de apoptosis, estos resultados son una evidencia de que en las células de ratas DN, la muerte celular por apoptosis se incrementa, al ser comparado con las ratas del grupo BN.

En el análisis de los resultados se muestra que los promedios de la sub población CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> positivas a Cit-C de las ratas desnutridas, presentaron un promedio más alto que el presentado en las ratas bien nutridas en la misma sub población. Este mismo comportamiento se observa en las sub poblaciones CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>.

Estos datos concuerdan con estudios previos, como el de Ferreira y colaboradores (1984) quienes al realizar la medición espectrofotométrica del Citocromo C en hígado de ratas desnutridas, determinaron un aumento en la cantidad de Citocromo C en el citoplasma celular al compararlos con el grupo control. Por otro

lado, Salmon y colaboradores (1962) estimaron en corazón e hígado de ratas desnutridas el contenido de Citocromo C por espectrofotometría, y encontraron una tendencia al incremento del Citocromo C en ambos tejidos al ser comparados con el grupo control.

El incremento en el porcentaje de Cit-C en el grupo de las ratas DN podría deberse a los cambios en el microambiente del timo, donde al haber una reducción de nutrientes disponibles, la célula se hace susceptible a la muerte para la reutilización de los componentes celulares y propiciar la vida de otras células en vez de la manutención de células con daños irreparables, aunque no existen muchos estudios relacionados con la reutilización de componentes celulares en la desnutrición. A este respecto, el trabajo de James (1972) propone que la retención de Nitrógeno y de algunos aminoácidos, mantiene el metabolismo de las proteínas y su producción.

## **Bax**

Bax es una proteína del grupo Bcl-2, tipo multidominio, que normalmente se encuentra en el citoplasma y cuando la señal de muerte celular hace su efecto sobre la célula, ésta forma homo- o heterodímeros en la membrana mitocondrial, creando un poro por el cual saldrá el Citocromo C (Desagher y Martinou, 2000; Reed, 2006).

Como se mostró en resultados, en el grupo ratas DN se estimó un aumento en el promedio de células positivas a Bax, al ser comparadas con las del grupo de las BN. Un comportamiento similar al análisis del citocromo C. No obstante, la subpoblación CD4<sup>-</sup>/CD8<sup>-</sup> fue la que mostró un mayor aumento de células positivas (16 veces), seguidas por las células CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (6 veces), CD4<sup>+</sup> (5 veces), y finalmente, CD8<sup>+</sup> (4 veces).

Aunque es bien sabido que Bax es uno de los precursores de la salida del Citocromo-C de la mitocondria (Desagher, 1999), no ha habido muchas investigaciones que lo usen como un marcador de la apoptosis en la desnutrición. Sirotkin y colaboradores (2010) en cultivos de ovarios de cerdos encontraron que en condiciones de desnutrición, al medir Bax en células granulares, fue mayor el

promedio de células positivas a la de los controles normales que se estudiaron; lo cual concuerda con los datos de este estudio, al tener una patrón similar en el porcentaje de Bax en las células de los tejidos de las ratas DN.

Xiaori y colaboradores (2014) en células renales de ratas nacidas de madres desnutridas, observaron una mayor expresión de ARNm de Bax al ser comparadas con las ratas del control. En este aspecto, los resultados que se obtuvieron concuerdan con los de este estudio, ya que también en el grupo de las ratas desnutridas hubo un incremento en el porcentaje de Bax.

Al revisar los resultados de las tres proteínas analizadas (Bcl-2, Cit-C y Bax), podemos ver lo que pareciera un patrón de respuesta de las células ante los diferentes efectos de desnutrición; como lo son Citocromo C y Bax, ya que la presencia de Bax es necesaria para la salida del Cit-C de la mitocondria y lograr su acción pro-apoptótica (Gómez, 2013); y aunque existe la presencia de la proteína protectora Bcl-2, esta no tiene la acción protectora suficiente para mantener vivas a las células, es decir se ve superada, probablemente por la condición nutricional que se presenta, ya que al no haber suficientes nutrientes en el ambiente extra celular, se prefiere la muerte celular que el mantenimiento de las células deficientes, también para la posible reutilización de los componentes celulares.

Las funciones normales de las células CD4<sup>+</sup> (colaboradoras) y CD8<sup>+</sup> (citotóxicas) están relacionadas al inicio y ejecución de las defensas de los organismos; las CD4<sup>+</sup> son las encargadas del inicio y la dirección de esta defensa, mientras que las CD8<sup>+</sup> son las encargadas de la ejecución de estas defensas al fagocitar a los patógenos señalados por las células. Por lo que la disminución en ambos tipos celulares no sólo compromete la función de defensa, si no que en un momento determinado podría incluso ser tan baja que no se presenten ninguna resistencia ante cualquier tipo de infección provocando una infección muy severa que se podría alargar durante mucho tiempo y que inclusive lleve a la muerte del individuo. Por lo tanto la disminución de cualquiera de los dos tipos de células,



incluyendo de sus formas más inmaduras puede representar un riesgo para el correcto desarrollo y vida de los sujetos.

## Conclusiones

Los resultados obtenidos mostraron que en el grupo de ratas DN, los porcentajes de apoptosis y necrosis fueron mayores que en las del BN.

Los porcentajes de células positivas a las proteínas Cit-C y Bax fueron mayores en las células del grupo DN que en las del grupo BN.

El porcentaje de células positivas a la proteína Bcl-2 fue menor en las células del grupo DN que en las del grupo BN.

En conclusión y al observar los resultados presentados, se puede decir que la desnutrición causa un aumento en la apoptosis espontánea en los timocitos, principalmente en la subpoblación CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>-</sup>, esto basándonos en los resultados obtenidos de las diferentes determinaciones realizadas en este trabajo, que al ser comparadas, mostraron ésta tendencia.

## Perspectivas

Para complementar los datos presentados en este trabajo, se proponen los siguientes estudios:

- Microscopia confocal para detectar la zona en la célula donde se encuentra la mayor cantidad de daño y comprobar si las moléculas pro y anti apoptóticas se encuentran en las localizaciones usuales o se encuentran en otras diferentes.
- Microarreglos para conocer qué genes se activan o desactivan durante la desnutrición en diferentes grados. Principalmente para observar si algún gen implicado en la linfogénesis se altera o se inactiva.

## **Anexo**

### **Preparación de solución fijadora de paraformaldehído al 1%.**

Pesar 0.4g de paraformaldehído en polvo (usar cubre bocas, bata y guantes pues es muy toxico, cuidar el área de trabajo), luego agregar 9.6 ml de agua destilada. Se puede calentar, pero se debe de hacer en una campana de extracción.

Para aclarar la solución, se usa una solución 0.1M de NaOH, se ajusta el pH a 7.4, utilizando soluciones 0.1M de NaOH o 0.1M de HCl.

### **Preparación de solución de BSA en PBS**

Se pesan 0.5g de albumina en polvo y se agregan lentamente 100ml de PBS en un matraz aforado, con cuidado de no agitar, esto dará una solución al 0.5%.

## Bibliografía

- Abbas, K. A. and Litchman, H. A., Pillai, S. (2007). *Inmunología Celular y Molecular*. México. Elsevier Saunders.
- Adams, M. J. and S., C. (1998). "The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival." *Science* **281**: 1322-1326.
- Aimee, L. E. and Thompson, B. C. (2004). "Death by desing: apoptosis, necrosis and autophagy." *Curr Op Cell Biol* **16**: 663-669.
- Barg E, Gasiorowski K, Brokos B, Swiedrych y Skórkowska K. (2004). "A high frequency of apoptosis was found in cultures of lymphocytes isolated from the venous blood of children born with a low birth weight". *Cell Mol Biol Lett*. **9**:135-143.
- Bossy, E. W. and Green, D. R. (1999). "Apoptosis: check point at the mitochondrial frontier." *Mutat Res* **434**: 243-251.
- Bronte, V., Zanovello, P. (2005). "Regulation of immune responses by L-arginine metabolism." *Nat Rev Immunol* **5**(8): 641-654.
- Buytaert, E., Callewaert G., Vandenhede J. R., Agostinis P. (2006). "Deficiency in apoptotic effectors Bax and Bak reveals an autophagic cell death pathway initiated by photodamage to the endoplasmic reticulum." *Autophagy* **2**(3): 238-240.
- Colin, A., Creagh, M. E., et al. (2001). "Apoptosis-associated release of Smack/DIABLO from mitochondria requires active caspases and is blocked by Bcl-2." *EMBO J* **20**(23): 6627-6636.
- Cuervo-Escobar S, L-B. M., Umaña-Pérez A, Porrozzi R, Saboia-Vahia L, (2014). "T-Cell Populations and Cytokine Expression Are Impaired in Thymus and Spleen of Protein Malnourished BALB/c Mice Infected with *Leishmania infantum*." *PloS ONE* **9**(12): e114584.
- Chandra, R. K. (2002). "Nutrition and the immune system from birth to old age." *Eur J Clin Nutr* **56** (Suppl 3): 73-76.
- Dallman R.P. (1971). "Under nutrition in the neonate: long term effects upon mitochondrial and microsomal constituents of the rat hepatocyte". *J. Nutr* **101**: 669-676.
- Desagher, S. and Martinou, J. C. (2000). " Mitochondria as the central control ponit of apoptosis." *Trends Cell Biol* 369-377.
- Desagher, S., Osen-Sand A.,Nichols A.,Eskes R.,Montessuit S.,Lauper S.,Maudrell K.,Antonsson B.,Martinou J.C. (1999). "Bid-induced Conformational Change of Bax Is Responsible for Mitochondrial Cytochrome c Release during Apoptosis." *J Cell Biol* **144**: 891-901.
- Díaz, M. D. (2006). Desarrollo de nuevas metodologías para la enumeración de células en cultivo y cuantificación de la apoptosis Doctorado, Universidad de Alcalá.

- El-Hodhod, M. A. A., Nassar, M. F., et al. (2005). "Apoptotic changes in lymphocytes of protein energy malnutrition patients." Nutr Res **25**(1): 21-29.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death." Toxicol Pathol **35**: 495-516.
- Feliu, S. and Slobodianik, H. (2002). "Efectos de la desnutrición proteica y de su recuperación nutricional en el timo de rata." Rev Chil Nutr **29**: 125-135.
- Ferreira, J., Gil L. (1984). "Nutritional effects on mitochondrial bioenergetics. Alterations in oxidative phosphorylation by rat liver mitochondria." Biochem. J. **218**: 61-67.
- Gómez, F. (1946). "Desnutrición." Bol Med Hosp Infant Mex **3** (4): 543-551.
- Gómez-Crisóstomo N.P., López-Marure R., Zapata E., Zazueta C., Martínez-Abundis E. (2013) "Bax induces cytochrome c release by multiple mechanisms in mitochondria from MCF7 cells". J Bioenerg Biomembr **45**: 441-448.
- Green, D. R. (2005). "Apoptotic pathways: ten minutes to die." Cell **121**: 671-674.
- Gross, A., Jockel J, Wei MC, Korsmeyer SJ (1998). "'Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis'." EMBO J **17**(14): 3878-3885.
- Hacker, G. (2000). "The morphology of apoptosis." Cell Tissue Res **301**: 5-17.
- Hotchkiss, R. S., Swanson P.E., Knudson C.M., Chang K.C., Cobb J.P., Osborne D.F. (1999). "Hotchkiss RS, Swanson PE, Knudson CM, Chang KC, Cobb JP, Osborne DF, et al. Overexpression of Bcl-2 in transgenic mice decreases apoptosis and improves survival in sepsis." J Immunol **162**(4148-4156).
- Jambon, B., Zalles, L., Sevilla, R., Bustos, M., Cuellar, E., Chevallier, P., Dhenin, J., Parent, G (1988). "Inmunocompetencia y función hormonal linfo-diferenciadora del timo del niño desnutrido." Rev Chil Nutr **16**: 147-151.
- Janeway CA, Travers P, Walport M y Capra D. (2000). El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. Edit. Masson, Barcelona 115-136.
- Kerr, J. F., Wyllie, A. H., et al. (1972). "Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics." Br J Cancer **26**: 239-257.
- Kindt, T. J., Goldsby, A. R., Osborne A. B. (2007). Inmunología de Kuby. México, McGraw-Hill Interamericana.
- King LE, O.-A. F. a. F. P. (2002). "Apoptosis plays a distinct role in the loss of precursors lymphocytes during zinc deficiency in mice." J Nutr **132**: 974-979.
- Kurosaka, K. T., M. Watanabe, N. Kobayashi, Y (2003). "Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. ." J Immunol **171**(4672-4679).
- Lopez, T. D. (2012). Análisis de las vías indicadoras de apoptosis en timocitos de ratas desnutridas. Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa.

- Lyra F. S., Madi K., Maeda C. T. y Savino W. (1993). "Thymic extracellular matrix in human malnutrition". J Pathol **171**:231-236.
- Mathew R., W. E. (2011). "Autophagy in tumorigenesis and energy metabolism: friend by day, foe by night." Curr Op Genet Develop **21**(1): 113-119.
- McMurray D N. (1984). "Cell-mediated immunity in nutritional deficiency." Prog Food Nutr Sci **8**3: 193-228.
- Metha M N, mCorkins M R., Lyman B., Malone A., Goday S P., Carney N L., Monczeka L J., Plogsted W S., Schwenk F W., and the American Society for Parental and Enteral Nutrition (A.S.P.E.N.) Board of directors (2013) "Defining Pediatric Malnutrition: A Paradigm Shift Toward Etiology-Related Definitions". Journal of Parental and Enteral Nutrition **Mar**:1-22.
- Mukherjee, K. L. (1967). "Classification of protein-calorie undernutrition in children." Arch Dis Child **42**(226): 647-651.
- Müller-Hermelink, H. K., Marino, M. Palestro, G. (1986). "Pathology of thymic epithelial tumors." Curr Top Pathol **75**: 207-268.
- Ng, H., Smith, J. D., et al. (2012). "Application of Flow Cytometry to Determine Differential Redistribution of Cytochrome c and Smac/DIABLO from Mitochondria during Cell Death Signaling." PLoS ONE **7**(7): 1-10.
- Nodera, M., Yanagisawa, H., et al. (2001). "Increased apoptosis in a variety of tissues of zinc-deficient rats." Life Sciences **69**(14): 1639-1649.
- Oliveri, R. (2000). "Apoptosis en la insuficiencia cardiaca." Rev. Argent. Cardiol.: 603-607.
- Ortiz R, C. E., Pérez L, Cortés L, González C, Rodríguez E, Betancourt M. (1999). "Desnutrición experimental por competencia de alimento durante la lactancia y su efecto sobre la fórmula leucocitaria en sangre periférica." Rev Hispanoamericana **4**: 33-39.
- Ortiz R, C. L., Cortés E, Medina H. (2008). "Malnutrition alters the rates of apoptosis in splenocytes and thymocyte subpopulations of rats." Clin Exp Immunol **155**(1): 96-106.
- Ortiz R, C. L., González-Márquez H, Gómez JL, González C, Cortés E (2001). "Flow cytometric analysis of spontaneous and dexamethasone-induced apoptosis in thymocytes from severely malnourished rats." Brit J Nutr **86**: 545-548.
- Pallaro, A. (1997). Efecto de la calidad proteica sobre el timo de rata en período de crecimiento activo. Tesis Doctoral, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires.
- Pérez-Robles, R., Nina, R., Tejeda, S., Acosta, C., Acosta, J., Vitoria, M. (1994). "Características de la desnutrición en niños menores de seis años residentes en zona rural fronteriza." Rev Med Dom **55**: 24-26.
- Prentice, A. M. (1999). "The thymus: a barometer of malnutrition." Br J Nutr **81**(5): 345-347.

- Purtilo, D. T. and Connor, D. H. (1975). "Fatal infections in protein-calorie malnourished children with thymolymphatic atrophy." Arch Dis Child **50**(2): 149-152.
- Reed, C. J. (1994). "Mini-Review: Cellular Mechanisms of Disease Series." J Cell Biol **124**(1-2): 1-6.
- Reed, C. J. (2006). "Proapoptotic multidomain Bcl-2/Bax-family proteins: mechanisms, physiological roles, and therapeutic opportunities." Cell Death Diff **13**: 1378-1386.
- Redmond, H. P., Shou J., Kelly C. J., Schreiber S., Miller E., Leon P. y Daly J. M. (1991) "Immunosuppressive mechanisms in protein-calorie malnutrition." Surgery, **110**:311-317.
- Rivadeneira, D. E., Grobmyer S.R., Naama H.A., Mackrell P.J., Mestre J.R., Stapleton P.P., Daly J.M. (2001). "Malnutrition-induced macrophage apoptosis." Surgery **129**(5): 617-625.
- Salmon H.A. (1962) " The cytochrome c content of the heart, kidney, liver and skeletal muscle of iron-deficient rats". J.Physiol **164**: 17-30.
- Saikumar, P. (1999). "Apoptosis: Definition, Mechanisms, and Relevance to Disease." Am J Med **107**(489-506).
- Savill, J. and Fadok, V. (2000). " Corpse clearance defines the meaning of cell death." Nature **407**: 784-788.
- Savino, W., Dardenne M., Velloso L.A. Silva-Barbosa S.D. (2002). "The thymus is a common target in malnutrition and infection." Brit J Nutr **98**(Suppl. 1): S-11-S16.
- Scrimshaw, N. S., Taylor, C. E., y Gordon, J. E. (1968). "Interactions of nutrition and infection." Monogr Ser World Health Organ **57**: 3-329.
- Schaible, U. E., Kaufmann, S. H. (2007). "Malnutrition and infection: complex mechanisms and global impacts." PLoS Med **4**(5): e115.
- Sedlak, T. W., Oltvai Z.N., Yang E., Wang K., Boise L.H., Thompson C.B., Korsmeyer S.J. (1995). "Multiple Bcl-2 family members demonstrate selective dimerizations with Bax." Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **92** (17): 7834-7838.
- Shenkin, A., Cedarblad G., Elia M., Isaksson B. (1996). " Laboratory assessment of protein-energy status." Clin Chim. Acta **253**(1-2):S5-S59.
- Shi, Y. (2001). "A structural view of mitochondria-mediated apoptosis." Nature structural biology **8**(5): 394-401.
- Shi, Y., Chen J, Weng C, Chen R, Zheng Y, Chen Q, Tang H (2003). "Identification of the protein-protein contact site and interaction mode of human VDAC1 with Bcl-2 family proteins." Biochem. Biophys. Res. Commun. **305**(4): 989-996.

- Sirotkin, V. A. (2010). "Effect of two types of stress (heat shock/high temperature and malnutrition/serum deprivation) on porcine ovarian cell functions and their response to hormones." J Exp Biology **213**: 2125-2130.
- Skulachev, P. V. (2006). "Bioenergetic aspects of apoptosis, necrosis and mitoptosis." Apoptosis **11**: 473-485.
- Suster, S., Rosai J (1992). Thymus. New York, Histology for pathologists Raven Press. .
- van Gurp M., F. N., van Loo G., Saelens X., Vandenabeele P (2003). "Mitochondrial intermembrane proteins in cell death." Biochemical and Biophysical Research Communications **304**: 487-497.
- Velasco, R. C. (2005). "La apoptosis en biología y patología." Revista peruana de cardiología: 119-128.
- Waterlow, J. C. (1972). "Classification and definition of protein-calorie malnutrition." Br Med J **3**(5826): 566-569.
- Weng C, L. Y., Xu D, Shi Y, Tang H (2005). "Specific cleavage of Mcl-1 by caspase-3 in tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in Jurkat leukemia T cells." J. Biol. Chem **280**(11): 10491-10500.
- Xiaori H., Zongde X., Qingyi D., Pingyang C., Jingtao H. y Tao W. (2014) "Apoptosis in the kidneys of rats that experienced intrauterine growth restriction". Nephrology **20**: 34-39.