



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“DETECCIÓN DE APOPTOSIS EN LEUCOCITOS DE  
SANGRE PERIFÉRICA DE NIÑOS PREMATUROS”**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**CINTHIA ADRIANA PEÑA MARTÍNEZ**



**MÉXICO, D.F.**

**2012**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Prof. SOBEIDA SANCHEZ NIETO  
**VOCAL:** Prof. PATRICIA ELVIRA BERRON RUIZ  
**SECRETARIO:** Prof. JOSE GUTIERREZ SALINAS  
**1º SUPLENTE:** Prof. NATIVIDAD GARCIA ESCAMILLA  
**2º SUPLENTE:** Prof. LAURA CARMONA SALAZAR

**LAB. BIOQ. MED. EXPERIMENTAL, DIVISION DE INVESTIGACION  
BIOMEDICA DEL CMN "20 DE NOVIEMBRE" ISSSTE.**

**ASESOR DEL TEMA:**

**JOSÉ GUTIERREZ SALINAS**



---

**SUSTENTANTE:**

**CINTHIA ADRIANA PEÑA MARTINEZ**



---



**ESTA TESIS TITULADA:**

**“DETECCIÓN DE APOPTOSIS EN LEUCOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA DE NIÑOS PREMATUROS”**

**FUE REALIZADA BAJO LA TUTORIA DEL  
DR. JOSÉ GUTIÉRREZ SALINAS,  
DEL LABORATORIO DE BIOQUÍMICA Y MEDICINA EXPERIMENTAL,  
DE LA DIVISIÓN DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA  
DEL CENTRO MÉDICO NACIONAL “20 DE NOVIEMBRE”, DEL  
ISSSTE.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A MIS PADRES Y HERMANO:**

PROF. **ARNULFO PEÑA GALICIA**

PROFA. **MARÍA DEL CARMEN MARTÍNEZ MÉNDEZ.**

ING. **CESAR AUGUSTO PEÑA MARTÍNEZ**

Por darme todo el cariño del mundo, así como el apoyo incondicional en cada etapa de mi vida. Gracias por guiarme en todo momento para llegar a ser lo que soy!! Y seguir el camino correcto. Muchas gracias por todo lo que han enseñado y por darme el mejor regalo que puedo tener en mi vida; por su paciencia, confianza y comprensión... **LO LOGRAMOS!!!... los QUIERO MUCHO!!!...**

**A LA MEMORIA DE MIS ABUELOS:**

JUAN MARTÍNEZ LUIS

ARNULFO PEÑA VITAL

JOAQUINA MÉNDEZ ACEVEDO

GABRIELA GALICIA PIÑA

Gracias por toda una vida llena de tantas enseñanzas, alegrías y recuerdos hermosos y sobre todo por formar un pilar importante en mi vida que jamás olvidare.

**A TODA MI FAMILIA.**

**AL DOCTOR: JOSÉ GUTIÉRREZ SALINAS**

Por la disposición que tuvo hacia mí, para que juntos concluyéramos este trabajo. Por su dedicación y todo su apoyo.

**AL TEC. LAB: SERGIO HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ.** Del Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental, del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" ISSSTE, por ser asesor técnico.

**A LA FAMILIA: ENRÍQUEZ CABRERA**

Por formar parte de mi familia, gracias por su apoyo y cariño incondicional que me brindan a mí y a la familia. Juankeque, Amanda, Emilio gracias por todo!!!

**A MIS AMIGOS.**

**INDRA, LAURA ADRIANA, CHANTAL, LUIS ANGEL, ALDO, JUAN, ORLANDO, DARIEL, LUZ, LAURA, CECY, ELVIS, JANET, LIZZ, JULIO, JONY, SERGIO, ROUZ, MARCE, LUIS ALBERTO, LUPITA, A TODOS LOS QUE FORMARON Y FORMARÁN PARTE DE MI VIDA SIEMPRE.**

Gracias por todos esos momentos que compartimos juntos y por el privilegio de haberlos conocido, por siempre apoyarme en las buenas y en las malas, por estar siempre que los necesitaba y sobre todo por esas anécdotas que siempre recordaremos

Lo LoGrE!!!! C=

## ÍNDICE

Lista de figuras	7
Lista de cuadros	9
Introducción	10
1. Prematurez	10
2. El ciclo celular y sus características	14
2.1 Regulación del ciclo celular	17
3. Apoptosis y estímulos iniciadores	19
3.1 Cambios morfológicos y moleculares Durante la apoptosis	19
4. Principales moléculas en apoptosis	21
4.1 Familia Bcl-2	21
4.2 Función de p53	22
4.3 Caspasas	24
4.4 Fragmentación de ADN	25
Hipótesis	28
Objetivo General	28
Objetivos específicos	28
Material y Métodos	29
5. Protocolo experimental	29
5.1 Grupo experimental	29
5.2 Tratamiento	30
6. Western Blot	32
6.1 Determinación de la concentración de proteínas	32
6.2 Electroforesis	33
6.3 Transferencia	36
6.4 Bloqueo e incubación con anticuerpos	37
6.5 Detección	38
7. Determinación de la actividad de caspasa-3	39
8. Fragmentación de ADN	41
8.1 Extracción de ADN	42
8.2 Separación del ADN mediante	

Electroforesis en gel	43
Resultados	45
Discusión y Análisis de Resultados	52
Conclusiones	59
Bibliografía	61

## **LISTA DE FIGURAS**

1. Crecimiento del feto por semanas durante el embarazo.	10
2. Diferentes células que conforman la sangre vista por microscopio electrónico.	14

3. Ciclo celular (Rodrigo V. et al., 2002).	17
4. Fases del ciclo celular donde se señalan el punto de restricción en la fase G <sub>1</sub> y los puntos de regulación en las fases G <sub>2</sub> y M .	18
5. Diagrama que muestra el orden cronológico de los cambios morfológicos y bioquímicos durante la estimulación apoptótica.	20
6. Estructura de los miembros de la superfamilia de Bcl-2 (Tanuja T, Cols. 2002).	22
7. Estructura tridimensional de la caspasa-3.	24
8. Como actúan las principales moléculas durante la apoptosis.	27
9. Ejemplificación de la punción lateral externa o interna del talón.	30
10. Tubos con Ficoll Hipaque.	31
11. Separación de leucocitos por gradiente de Ficoll Hipaque.	31
12. Tópicos del protocolo experimental.	33
13. Pasos generales de la técnica de Electroforesis.	34
14. Ejemplificación de la transferencia.	36
15. Componentes del sándwich de transferencia.	37
16. Principales pasos del inmunoreconocimiento y detección de una proteína.	39
17. Determinación de Caspasa-3.	40
18. Electroforesis horizontal.	41
19. Técnica de extracción de ADN.	42
20. Esquema del desarrollo de una electroforesis de ácidos nucleicos en gel de agarosa.	43
21. Imagen representativa de un Western Blot de una muestra de proteínas totales de leucocitos provenientes de niños sanos y prematuros.	47
22. Imagen representativa de leucocitos provenientes de niños	



prematuros y a término para detectar la presencia de la proteína Bcl-2 por medio de Western Blot .	48
23. Imagen representativa de leucocitos provenientes de niños prematuros y a término para detectar la presencia de la proteína p53 por medio de Western Blot .	49
24. Gráfico de la actividad de la proteína caspasa-3.	50
25. Imagen representativa de una gel de agarosa para observar la fragmentación de ADN en muestras provenientes de niños prematuros y a término.	51

### **LISTA DE CUADROS**

1. Clasificación de los niños.	29
2. Soluciones para preparar Tris-Glicina-SDS-PAGE	

en geles de 1,5 mm de espesor.	35
3. Características generales de las madres de los recién nacidos del grupo control y de los prematuros.	45
4. Características generales de los recién nacidos prematuros y los del grupo control inducidos en el estudio.	46

## **INTRODUCCIÓN**

### **1. PREMATUREZ.**

La prematurez se define como el niño nacido antes de completar las 37 semanas de Gestación. El objetivo principal del manejo de la prematurez es disminuir la mortalidad

perinatal, la mortalidad neonatal y la morbilidad. Un manejo adecuado de las mujeres embarazadas con riesgo de parto prematuro, permite prolongar la vida intrauterina, optimizando las condiciones del feto para el nacimiento (1).

La primera definición de prematuridad fue aquella que considera a los recién nacidos con un peso de 2500 g o inferior. Esta definición se basó en la facilidad y exactitud de la medida ponderal y en la dificultad de medir con exactitud la duración del embarazo (2-4).

Se consideran prematuros los niños nacidos antes de la trigésimo séptima semana, los cuales habitualmente, tienen poco peso al nacimiento (1,4). La mortalidad perinatal está relacionada sin duda, con la duración del embarazo, ya que aumenta, en grados extremos, a medida que se aleja de la mortalidad mínima, que corresponde al periodo de las 38 a las 42 semanas (Fig.1) de gestación (5). Debemos recordar que el periodo durante el cual el feto aumenta de peso con más rapidez va de las 32 a las 38 semanas, ya que es en esta fase cuando el feto almacena tanto grasas como hidratos de carbono. Los que nacen antes de este momento aparecen como consumidos (5,6).



Figura 1. Crecimiento del feto por semanas durante el embarazo.

La incidencia de prematuridad depende del número de mujeres con factores de riesgo predictivos de parto prematuro. Los principales factores epidemiológicos habitualmente relacionados con el parto prematuro espontáneo son: (7,8).

### Factores maternos

- Historia de partos prematuros previos
- Malnutrición
- Anomalías uterinas
- Distensión uterina (hidramnios)
- Edad inferior a 16 años o superior a 35 años
- Cardiopatía cianótica y otras enfermedades crónicas
- Intervalo corto entre nacimientos
- Infección
- Trauma
- Hipertensión
- Administración de dietilestilbestrol

#### Factores fetales

- Malformaciones
- Embarazo múltiple
- Rotura prematura de membranas

#### Factores ambientales

- Clase socioeconómica baja

#### Hábitos

- Tabaco
- Fatiga/actividad

Si bien los nacimientos prematuros suceden habitualmente cerca del término, los problemas asociados con el parto prematuro ocurren con mayor frecuencia en relación con los recién nacidos más inmaduros (1-3).

Los problemas más importantes de los recién nacidos están relacionados al número y severidad de problemas perinatales como:

- Isquemia o asfixia del sistema nervioso central
- Hemorragia interventricular
- Síndrome de dificultad respiratoria
- Bronco displasia pulmonar
- Fibroplasia retrolental
- Problemas infecciosos y metabólicos (acidosis, hipoglucemia, hiperbilirrubinemia y raquitismo)

Son los recién nacidos de bajo peso al nacimiento aquellos que pueden presentar problemas cognoscitivos, auditivos y visuales, así como motores del SNC, con enfermedades tales como hidrocefalia, parálisis cerebral y enfermedad pulmonar crónica (1,9).

Si un recién nacido de bajo peso no presenta los problemas agudos antes mencionados en el periodo neonatal el pronóstico deberá ser excelente; esto es, no es la inmadurez sino los problemas que se asocian a ella los que pueden provocar dificultades posteriores.

Casi la mitad de los niños que nacen muy prematuramente sufren problemas significativos sin embargo con el adelanto de la ciencia los nacidos más pequeños e inmaduros han aumentado sus posibilidades de vida en los últimos años.

Los principales problemas que sufren este tipo de niños son, infecciones en el sistema respiratorio y en el aparato digestivo debido a un sistema inmunológico deficiente (10).

El sistema inmunológico está formado por un conjunto de mecanismos que protegen al organismo de infecciones por medio de la identificación y eliminación de agentes patógenos. La función del sistema inmunológico es mantener a los microorganismos infecciosos como determinadas bacterias, virus y hongos fuera de nuestro cuerpo y destruir cualquier microorganismo que logre invadir nuestro organismo. Este sistema está formado por una red compleja y vital de células y órganos que protegen al cuerpo de las infecciones (11).

El sistema inmunológico se divide:

**Humoral:** El objetivo de esta respuesta es la producción de anticuerpos por las células plasmáticas. Estos se fijarán a los organismos y moléculas extrañas con capacidad antigénica provocando una serie de reacciones que conducirán a la destrucción de los agentes extraños, que serán fagocitados por los macrófagos fundamentalmente.

**Celular:** La respuesta celular va dirigida a destruir células infectadas y a evitar que los agentes extraños puedan seguir reproduciéndose en ellas. Como sabemos existen varias células por estudiar, pero nosotros nos basaremos en los leucocitos principalmente ya que son las células encargadas de proteger el sistema inmune (12).

Los leucocitos (células blancas de la sangre) actúan como organismos unicelulares independientes y son el segundo brazo del sistema inmune innato. Estas células identifican y eliminan patógenos, bien sea atacando a los más grandes a través del contacto o englobando a otros para así matarlos.

Los leucocitos tienen un tiempo de vida media y se sabe que en situaciones de estrés pueden activar su sistema de apoptosis (13,14).

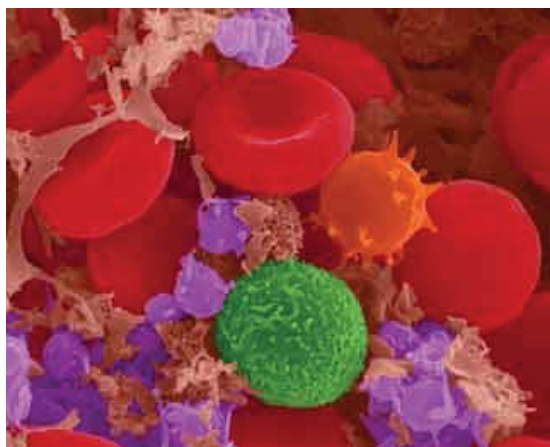


Figura 2. Diferentes células que conforman la sangre vista por microscopio electrónico.

[Glóbulos blancos, plaquetas (teñidas de violeta), un linfocito T (teñido de verde) y monocitos (teñidos de dorado) vistos a través de un microscopio electrónico.]

## 2. EL CICLO CELULAR Y SUS CARACTERÍSTICAS.

El ciclo celular consiste en una serie de procesos cuya finalidad es regular la división celular y es fundamental tanto para generar nuevas células en el desarrollo embrionario como para reemplazar las células dañadas en un órgano adulto (15). De acuerdo a la teoría celular establecida, las células se dividen a través de una serie ordenada de pasos en los cuales la célula aumenta su tamaño, el número de componentes intracelulares (proteínas y organelos), duplican su material genético y finalmente se divide (16).

El ciclo celular (Fig.3) es el proceso ordenado y repetitivo en el tiempo en el que la célula crece y se divide en dos células hijas. Las células que se encuentran en el ciclo celular se llaman células proliferantes y las que se encuentran en fase  $G_0$  se llaman células quiescentes.

La mayoría de las células pasan la parte más extensa de su vida en interfase, durante la cual duplican su tamaño y el contenido cromosómico. La división celular puede considerarse como la separación final de las unidades moleculares y estructurales previamente duplicadas (17).

El ciclo celular se divide en dos fases: (Fig.3).

### 1) **Interfase**, que consta de :

**Fase de síntesis (S):** En esta etapa la célula duplica su material genético para pasarle una copia completa del genoma a cada una de sus células hijas. El

núcleo contiene el doble de proteínas nucleares y de DNA que al principio (15, 16,19).

**Fase G<sub>1</sub> Y G<sub>2</sub> (Intervalo):** Entre la fase S y M de cada ciclo hay dos fases denominadas intervalo en las cuales la célula esta muy activa metabólicamente, lo cual le permite incrementar su tamaño (aumentando el número de proteínas y organelos), de lo contrario las células se harían más pequeñas con cada división. A estas fases también se los conoce como puntos controles, en la fase G<sub>1</sub> este punto comprueba que los procesos de la fase anterior se realizaron correctamente y que las condiciones ambientales son adecuadas asegurándose de que todo esté listo para la síntesis de DNA en este punto la célula aumenta de tamaño, sintetiza nuevo material citoplasmático, sobre todo sintetiza proteínas y RNA (15, 16,19).

Si se detecta daño en el ADN o que la síntesis de ADN se ha realizado de manera incompleta, la entrada en la fase mitótica se retrasa para permitir la reparación del DNA. La fase G<sub>2</sub> es la segunda fase de crecimiento, en el cual se sigue sintetizando RNA y proteínas en esta etapa se determina si la célula debe entrar en fase M y dividirse (15, 16, 19).

## 2) Fase M

**Mitosis (M):** En esta fase se reparte a las células hijas el material genético duplicado, a través de la segregación de los cromosomas por lo que se producen dos células hijas idénticas, los cromosomas replicados se disponen de manera que cada célula nueva recibe una donación completa (15,16-19).

La fase M, para su estudio se divide en:

**Profase:** En esta etapa los cromosomas (constituidos de dos cromatidas hermanas) se condensan en el núcleo, mientras en el citoplasma se comienza a



ensamblar el huso mitótico entre los cromosomas. Esta fase es la de mayor duración.

**Metafase:** Comienza con el rompimiento de la membrana nuclear, de esta manera los cromosomas se pueden unir al huso mitótico (mediante los cinetocoros). Una vez unidos los cromosomas estos se alinean en el ecuador de la célula.

**Anafase:** Se produce la separación de las cromátidas hermanas, las cuales dan lugar a dos cromosomas hijos, los cuales migran hacia polos opuestos de la célula.

**Telofase:** Aquí ambos juegos de cromosomas llegan a los polos de la célula y adoptan una estructura menos densa, posteriormente se forma nuevamente la envoltura nuclear. Al finalizar esta fase, la división del citoplasma y sus contenidos comienza con la formación de un anillo contráctil.

**Citocinesis:** Finalmente se divide la célula mediante el anillo contráctil de actina y miosina, produciendo dos células hijas cada una con un juego completo de cromosomas (15,16-19).

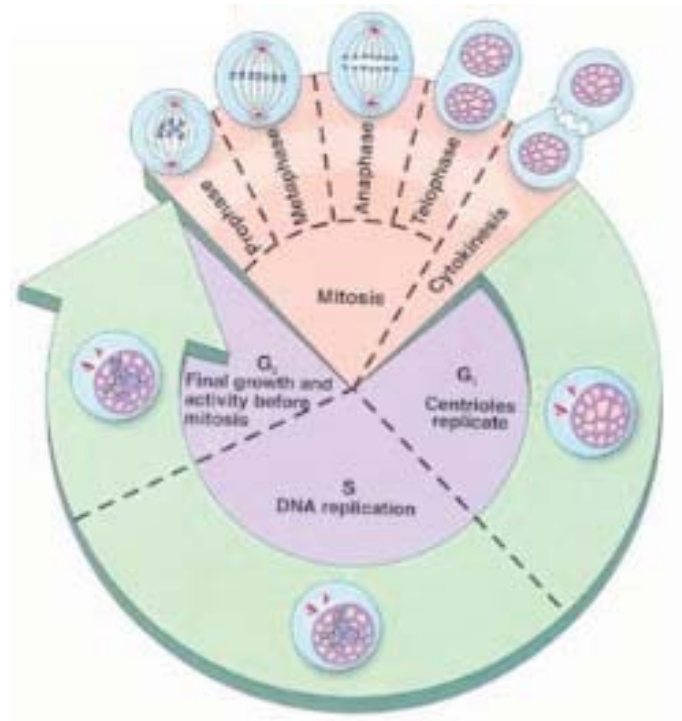


Figura 3. Ciclo celular (Rodrigo V. et al., 2002).

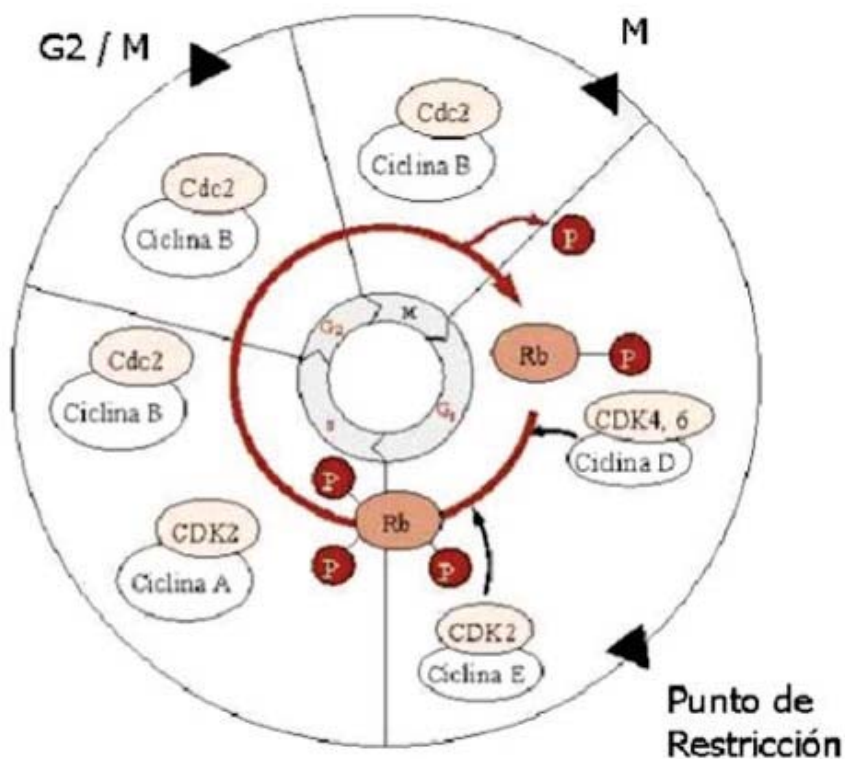
Los puntos de control del ciclo celular tienen una función importante en el mantenimiento de la fidelidad e integridad de la replicación y reparación del genoma. La dinámica del ciclo celular está regulada por estos puntos de control que actúan en la transcripción de los genes de CDK y de las ciclinas, en las modificaciones postranscripcionales de estas proteínas, o en la degradación de las mismas. Los procesos de regulación por retroalimentación positiva y negativa también contribuyen a la progresión del ciclo celular (20,21).

## 2.1 REGULACIÓN DEL CICLO CELULAR.

La secuencia de los acontecimientos del ciclo celular está regulada por un sistema complejo de control que vigila cada uno de los pasos que realiza la célula para completar el ciclo o llevarla a la muerte. El que la célula complete el ciclo o no, depende de que se cumplan los requisitos en los puntos de regulación para continuar en la siguiente etapa (22).

Dentro de la regulación del ciclo celular existen tres puntos especialmente importantes llamados puntos de regulación; el primero de ellos está entre las fases G<sub>1</sub> y S (también llamado punto de restricción), el segundo entre las fases G<sub>2</sub> y la mitosis y un tercero en la anafase durante la mitosis. En estos puntos el ciclo se puede detener en caso de daño al ADN o cuando los eventos moleculares para la transición a la siguiente fase no se han completado.

El sistema de regulación es altamente complejo e involucra varias familias de proteínas como: las cinasas dependientes de ciclinas (CDKs), las ciclinas, los inhibidores de las CDKs (CDKI) y las proteínas supresoras de tumores como la del retinoblastoma (Rb) y la p53 (Fig.4). Las ciclinas y las CDKs forman complejos ciclina-cinasa que actúan fosforilando serinas y treoninas de las proteínas blanco. Dichas fosforilaciones permiten la progresión de las células en las diferentes fases del ciclo celular (22-24).



**Fig. 4** Fases del ciclo celular donde se señalan el punto de restricción en la fase G<sub>1</sub> y los puntos de regulación en las fases G<sub>2</sub> y M. También se observan los sitios donde participan los complejos Ciclina/CDK y la proteína Rb.

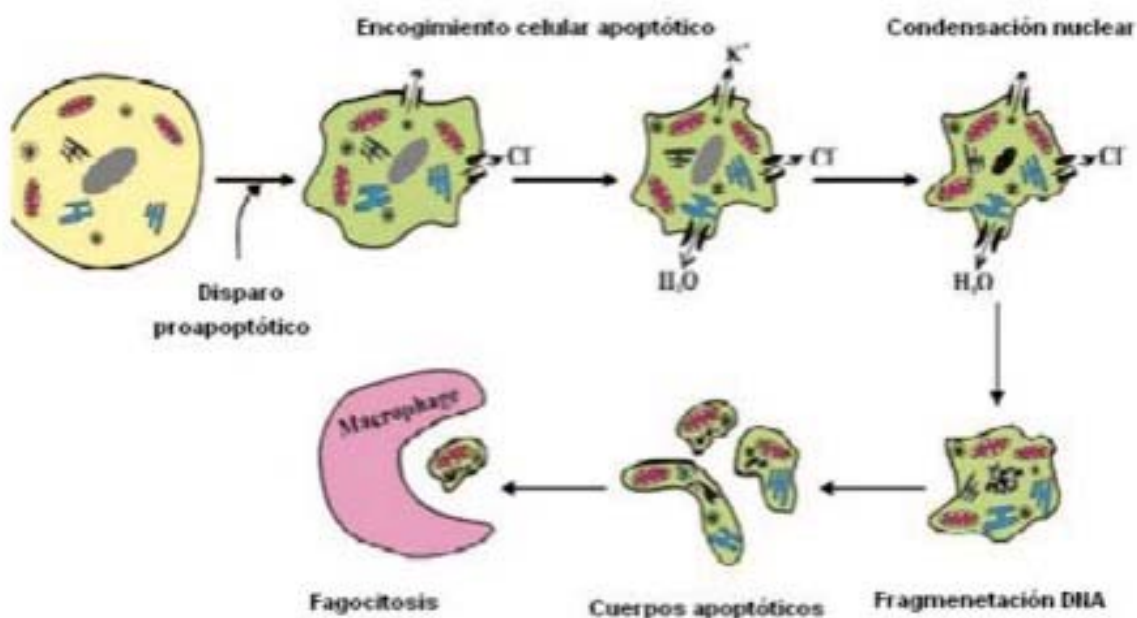
### **3. APOPTOSIS Y ESTÍMULOS INICIADORES.**

La apoptosis es una forma de suicidio celular que es ampliamente observado en la naturaleza. Es un proceso biológico donde las células individuales son eliminadas de distintos tejidos en organismos multicelulares en respuesta a una señal específica sin afectar a células vecinas o inducir una respuesta inflamatoria (25,26). Una célula entra en apoptosis cuando esta pierde el contacto con sus alrededores o cuando existe un daño interno irreparable; otra razón se presenta cuando la célula recibe señales simultáneamente para inducir o atenuar su división celular (26,27).

La muerte celular programada puede ser inducida por diversos estímulos fisiológicos o fisiopatológicos que activan distintas cascadas de señalización apoptótica. Entre ellos destacan moléculas receptoras como CD95, Trail o Factor de Necrosis Tumoral (TNF), glucocorticoides, distintas formas de estrés, como la supresión de factores de crecimiento, irradiación, luz ultravioleta (UV), fármacos citotóxicos, peróxidos de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), tratamiento con ceramida, bacterias, toxinas o virus (28-30).

#### **3.1 CAMBIOS MORFOLÓGICOS Y MOLECULARES DURANTE LA APOPTOSIS.**

Hace varias décadas, algunos investigadores evidenciaron cambios morfológicos y moleculares durante el desarrollo de la apoptosis; entre los cambios morfológicos identificados se encuentran la condensación de la cromatina, pérdida del volumen celular o encogimiento celular y formación de burbujas en la membrana plasmática para la desintegración celular, llevando a la formación de cuerpos apoptóticos que serán fagocitados por macrófagos subsecuentemente (31,32).



**Fig. 5** Diagrama que muestra el orden cronológico de los cambios morfológicos y bioquímicos durante la estimulación apoptótica. A diferencia de la necrosis, el contenido celular nunca se libera en una célula en proceso apoptótico, por lo tanto se previene una respuesta inflamatoria al tejido huésped (Remillard *et al.*, 2004).

Después de estos cambios morfológicos se ha reportado hinchamiento en la membrana mitocondrial externa así como liberación del citocromo *c* y el factor de inducción apoptótica (AFI) del espacio intermembranal mitocondrial hacia el citoplasma (33-35). Dentro de los cambios moleculares destaca la fragmentación del DNA, estos fragmentos son divididos en regiones ricas en adenina/timina (A/T) localizados en sitios de andamiaje nuclear dando fragmentos entre 50-200pb; y por otro lado la exposición al azar de la fosfatidilserina (PS) en la cara externa de la membrana plasmática (33-35). Recientemente se ha propuesto que además PS se libera otro fosfolípido, posiblemente lisofosfatidilcolina (LPC), que actúa como un químico-atrayente.

Dichos cambios han sido observados de manera exclusiva en este tipo de muerte celular por análisis con microscopía electrónica, así como técnicas basadas en la detección de estos cambios (33,34).

## 4. PRINCIPALES MOLÉCULAS EN APOPTOSIS

### 4.1 FAMILIA BCL-2.

La familia de proteínas BCL-2 han sido consideradas como uno de los principales reguladores en la ruta intrínsecas del proceso apoptótico (35,36). Inicialmente, Bcl-2 fue identificada como producto del oncogén Bcl-2 (37) siendo uno de los miembros de una familia de moléculas pro y antiapoptóticas (Fig.6). Debido a la homología compartida entre cuatro regiones conservadas llamadas homología Bcl-2 (BH) dominios 1-4, la familia de proteínas Bcl-2 han sido divididas en tres grupos, los miembros del grupo I poseen una actividad antiapoptótica y poseen dominios BH1-4, ejemplo de ellos son Bcl-2, Bcl<sub>x<sub>L</sub></sub>, Mcl-1, entre otros. Los miembros del grupo II poseen dominios BH1-3, y presentan actividad proapoptótica, a este grupo pertenecen Bax y Bak. Hasta la fecha se han propuesto varios mecanismos para explicar cómo los miembros de la familia Bcl-2 participan en la regulación de la apoptosis, esencialmente en la liberación del citocromo c y otras proteínas intramembranales inductoras de la apoptosis de la mitocondria. Ninguno de estos mecanismos ha sido probado definitivamente (37-39).

Existen tres modelos básicos que explican la regulación de los miembros de la familia Bcl-2 durante la apoptosis.

- 1.Los miembros de la familia Bcl-2 forman canales que facilitan el transporte de proteínas.
- 2.Los miembros de la familia Bcl-2 interactúan con otras proteínas para formar canales.
- 3.Los miembros de la familia Bcl-2 inducen la ruptura de la membrana externa mitocondrial (38).

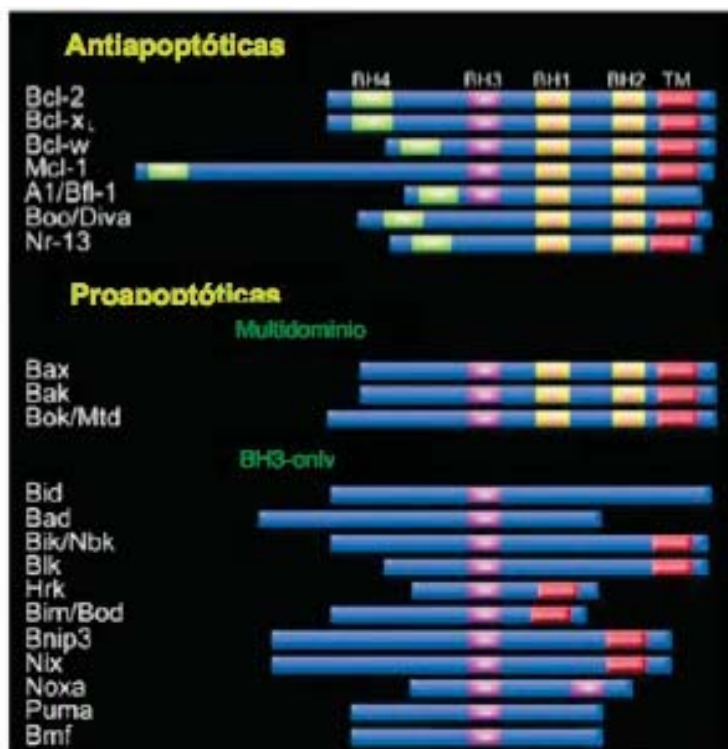


Figura 6. Estructura de los miembros de la superfamilia de Bcl-2 (Tanuja T, Cols. 2002).

#### 4.2 FUNCIÓN DE P53.

La proteína p53 es un transregulador transcripcional conocido como un gen supresor de tumores. La proteína presenta tres dominios: el N-terminal, que activa la transcripción; el central hidrofóbico, con regiones conservadas que al mutar alteran la capacidad de unión al DNA y su actividad como factor transcripcional y el C-terminal, que participa en la oligomerización y unión específica al DNA (40-42).

Entre las funciones más importantes de la p53 se encuentra su capacidad para regular la transcripción de genes que participan en el control del ciclo celular. Mutaciones de p53 pueden inducir cambios en el ciclo celular y por lo tanto, contribuir al desarrollo de cáncer. En varios estudios, se ha encontrado a p53 mutado asociado a diversas neoplasias. La proteína p53 funciona como un regulador negativo del ciclo celular, por lo que alteraciones en el gen que interfieren con su función conducen a la pérdida de esta regulación, lo que produce proliferación celular (43).

El gen supresor de tumores p53 se activa en respuesta a daño en el DNA o mediante estímulos de estrés celular. Su activación da lugar a un paro del ciclo celular (en G1 y/o G2) y a un proceso de senescencia o de apoptosis. El que suceda una cosa u otra depende de las señales que le lleguen tanto externas como internas (44).

Se sabe que la elevación de los niveles de p53 induce a que las células se detengan al final de la fase G1 y se reparen los daños en el DNA propiamente por la maquinaria de reparación de éste, antes de continuar con su replicación en la fase S. Las células con p53 mutado no interrumpen el ciclo celular aun después de que el DNA ha sufrido daño (40-42).

Como ya se menciona, se conocen dos estadios donde operan los puntos de control en la progresión del ciclo celular: en relación con el primero, al final de la fase G1 y la entrada a la fase S del ciclo celular, p53 tiene una función central, ya que aumenta los niveles de los complejos CDK-ciclina, que a su vez modulan la expresión de genes que participan en la proliferación celular, específicamente en la interrupción del paso de la fase G1 a la fase S y esto permite la reparación del DNA dañado antes de que continúe el ciclo celular.

Además, hay evidencias que demuestran que p53 interactúa con los complejos CDK-ciclina. De esta manera, la p53 puede reprimir la expresión de genes que participan en los procesos de replicación y transcripción del DNA, como es el caso del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), la DNA polimerasa  $\alpha$ , C-fos, 19 C-jun, 19 MDM2; o bien, activa los genes reguladores negativos de la proliferación celular como Rb, WAF1/CIP1/SD11, GADD45 y GADA, produciendo interrupción del ciclo celular o muerte por apoptosis (45).

La pérdida de la función de p53 está asociada con la inmortalización y/o transformación in vitro y al desarrollo de neoplasias in vivo. Se ha propuesto que p53 funciona como un punto de control para regular el paso de las células de un estado de reposo a otro de proliferación. Esto se observa cuando las células se exponen a agentes que dañen el DNA (46).

#### **4.3 CASPASAS.**



Los cambios morfológicos y bioquímicos observados durante la apoptosis se deben a un grupo de proteasas cisteína denominadas caspasas. Estas moléculas proteicas han sido consideradas como las ejecutoras centrales en este proceso (47).

Todas las caspasas conocidas poseen en su sitio activo una cisteína y dividen sustratos en los enlaces Asp-Xxx (esto es, un residuo de ácido aspártico). La estructura tridimensional de las caspasas indica su función y sus mecanismos de activación: consta de un pre-dominio N-Terminal, una subunidad larga (17-21KDa) y otra pequeña (10-13 KDa), que a veces están unidas por un pequeño conector.

Las caspasas son proteasas que cortan selectivamente después de un residuo de ácido aspártico, tienen un sitio activo muy conservado. Las caspasas actúan como una cascada de señalización y como sustrato final tienen a proteínas que van a producir los cambios morfológicos de la muerte celular. Actualmente se han descrito 12 miembros en humano. Las caspasas se sintetizan en forma de zimógenos y para realizar su función requiere de activación proteolítica (48,49).

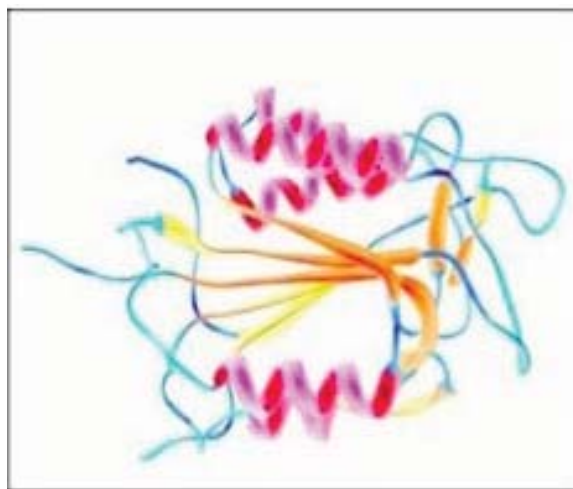


Figura 7. Estructura tridimensional de la caspasa 3.

Esta proteólisis se da en dos fases: la primera proteólisis divide la cadena en la subunidad grande y la subunidad pequeña; la segunda proteólisis elimina el pre-dominio N-terminal. Esta activación da lugar a un heterotetrámero activo formado por el ensamblaje de dos subunidades grandes y dos pequeñas, conteniendo dos sitios

activos de catálisis con una secuencia altamente conservada dentro de un residuo cisteína. Esta forma activa, a su vez llevará a cabo la proteólisis de sus sustratos específicos después de un residuo de aspártico (49).

La actividad de las caspasas es fundamental en procesos de activación de muerte celular por apoptosis. Existen tres tipos de caspasas:

1. Caspasa inflamatorias: participan en procesos de activación de citocinas (caspasas-1,-4,-5 y -14) (50).
2. Caspasas iniciadoras: son activadas en respuesta a señales de estrés o daño celular o cuando la célula recibe una señal que activa sus mecanismos de apoptosis (caspasas-8, -9, -10 y -12) (51).
3. Caspasas efectoras: sufren proteólisis para su activación misma que se lleva a cabo por las caspasas iniciadoras. Son las responsables de la proteólisis directa de otros sustratos que producirán el cambio morfológico en la célula. La principal caspasa efectora es la caspasa-3 (Fig.7), aunque también ejercen funciones ejecutoras las caspasas-6 y -7. La caspasa-3 es responsable de la condensación de la cromatina, la fragmentación del DNA y la formación de cuerpos apoptóticos mediante la activación y proteólisis de otros sustratos (52).

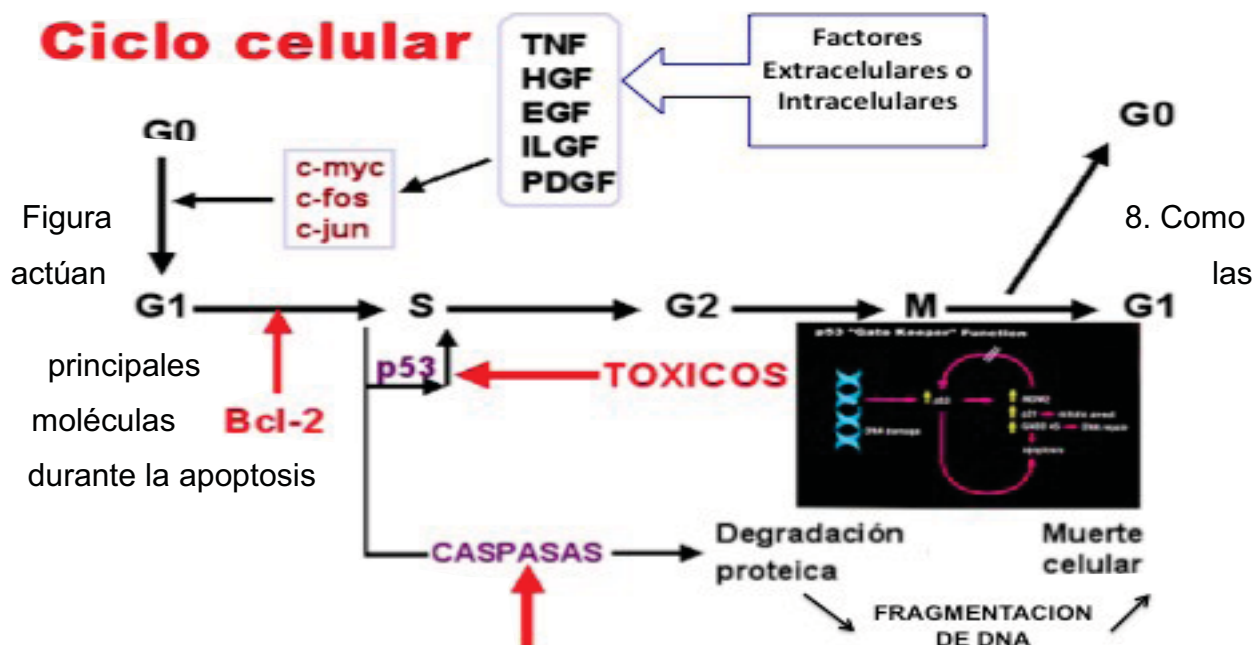
#### **4.4 FRAGMENTACIÓN DEL ADN.**

El aspecto del núcleo de una célula apoptótica se convierte en lo más característico de esta. Aunque existen variaciones entre los distintos tipos celulares, en general se produce un aumento en la densidad de la cromatina que comienza formando parches alrededor de la envoltura nuclear y terminan dando lugar a una o varias esferas densas en las últimas etapas. Los cambios iniciales se acompañan de una reducción del núcleo. Esta alteración en la cromatina es fruto de la ruptura de la lámina nuclear, estructura que se encuentra bajo la envoltura nuclear y que participa en su estabilidad. Además de estos cambios morfológicos, en el núcleo celular se produce durante la

apoptosis, la fragmentación del ADN en una escalera de subunidades regulares que resultan del corte al azar entre los nucleosomas, llegan a sumarse hasta un millón de cortes dando como consecuencia una situación en la que la transcripción se para, ya que no existe forma de ser reparada. Se conoce muy poco sobre el papel que este fenómeno puede jugar dentro del proceso global de la apoptosis (53).

La ruptura del ADN es llevada a cabo por una endonucleasa que se activa vía caspasa. Esta endonucleasa fue primero descrita en un ratón y se le denominó CAD (caspase-activated deoxyribonuclease). Esta enzima se encuentra normalmente en el citoplasma de forma inactiva por efecto del inhibidor ICAD que posee sitios de corte por caspasa-3. Durante el proceso de apoptosis, ICAD es degradado por la caspasa-3 y esto libera y permite la activación de la nucleasa CAD, que realiza su función sobre el núcleo de la célula. En humano existe un sistema homólogo al descrito en ratón. Existe una proteína humana DFF45 (DNA fragmentación factor 45), que presenta una secuencia significativa similar a la de ICAD y que media también fragmentación del DNA en núcleos cuando se produce activación de la caspasa-3. De esta forma, se supone que DFF45 actúa en humanos sobre una nucleasa similar a CAD inhibiéndola igual que ocurre en ratón. Aunque los efectos de la endonucleasa sobre el ADN celular sean tan drásticos, estudios realizados induciendo apoptosis en células con un inhibidor ICAD mutante resistente a caspasas, demuestran que la célula muere por apoptosis en ausencia de fragmentación del ADN.

Esta muerte se traduce en ruptura de sustratos en el citoplasma, alteraciones típicas en la membrana plasmática, en la integridad de la mitocondria etc. Todo esto conduce a la muerte de la célula que mantiene su ADN íntegro aunque la cromatina sí presenta las alteraciones típicas de apoptosis, probablemente por la acción de caspasas sobre proteínas nucleares común como poli (ADP-ribosa), polimerasa (PARP) o lámina nuclear. Este hecho permite replantear la degradación del ADN en el proceso de apoptosis, no como medio de destrucción de la célula si no como parte del proceso de limpieza de las células muertas, facilitando su fagocitosis o previniendo que el ADN íntegro pueda transformar a la célula fagocítica (53).



## HIPÓTESIS:

Los leucocitos provenientes de niños nacidos prematuramente presentaran signos de apoptosis en comparación a los obtenidos de niños nacidos a término.

## OBJETIVO GENERAL:

Determinar la presencia de signos de apoptosis en leucocitos provenientes de niños nacidos prematuramente, en comparación con los nacidos a término.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Determinar en leucocitos provenientes tanto de niños prematuros como nacidos a término, la presencia de signos de apoptosis como son:

- a. Detección de la proteína bcl-2 y p53 por el método de Western Blot
- b. Determinación de la actividad de la enzima caspasa-3
- c. Detección de la fragmentación del ADN usando geles de agarosa.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### **5. PROTOCOLO EXPERIMENTAL**

#### **5.1 GRUPOS EXPERIMENTALES.**

Los sujetos de estudio son niños que nacieron en el Centro Médico Nacional “20 De Noviembre”. ISSSTE en la sección de cuidados intensivos materno-fetales. El estudio fue aprobado por el Comité de Ética de éste hospital y se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Medicina Experimental de la División de Investigación Biomédica de ésta institución.

A todos los tutores de los niños que participaron en el estudio se les solicitó el consentimiento informado y su aprobación, informándoles previamente de las características e implicaciones del mismo.

El estudio se realizó en niños de ambos sexos recién nacidos que fueron clasificados en dos grupos (Cuadro 1).

Cuadro 1. Clasificación de los niños.

<b>A</b> <b>PREMATUROS</b>	<b>B</b> <b>A TERMINO (control)</b>
18 niños (10 femeninos y 8 masculinos) Edad de nacimiento < 36 semanas	10 niños nacidos a término (6 femeninos y 4 masculinos) Edad de nacimiento > 36 semanas

A todos los niños de ambos grupos se les tomó una muestra de sangre periférica por punción venosa de la región lateral externa o interna del talón, inmediatamente después del nacimiento (Fig.9). La sangre fue obtenida en tubos con heparina o EDTA como anticoagulante.

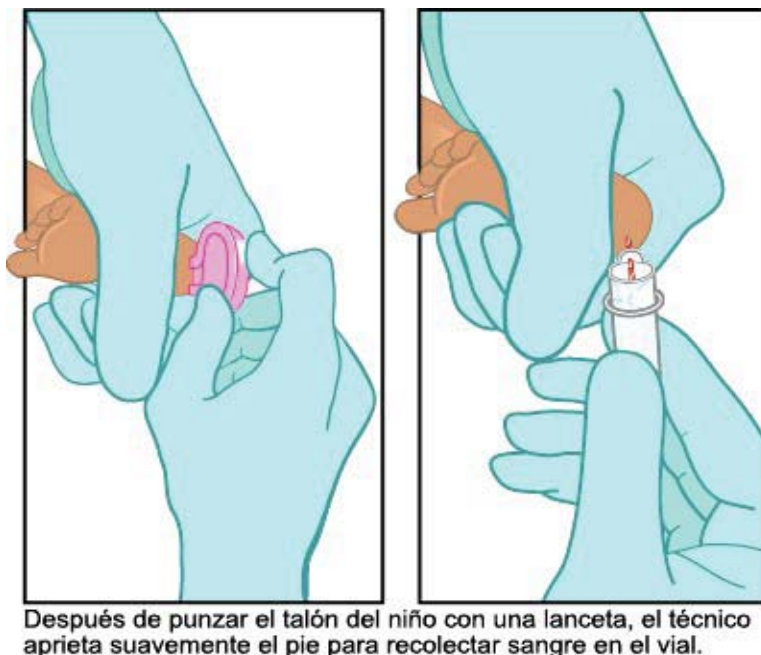


Figura 9. Ejemplificación de la punción lateral externo o interno del talón.

## 5.2 TRATAMIENTO.

Las muestras de sangre fueron preparadas para la obtención de leucocitos usando un gradiente de Ficoll-Hipaque (Fig.10 y 11). Para ello, se colocó en un tubo de ensayo un volumen de Ficoll-Hipaque y un volumen de sangre. La muestra fue centrifugada por 15 minutos a 2500 rpm en una centrífuga clínica. Al término de la centrifugación, los leucocitos fueron recuperados de la superficie y fueron lavados tres veces con solución salina isotónica fría usando 10 minutos por lavada a 1500 rpm para obtener un extracto total de proteínas el cual se dividió para determinar la actividad de caspasa-3, fragmentación del DNA y la presencia de la proteína bcl-2 y p53 (54).



Figura 10. Tubos con Ficoll Hipaque.

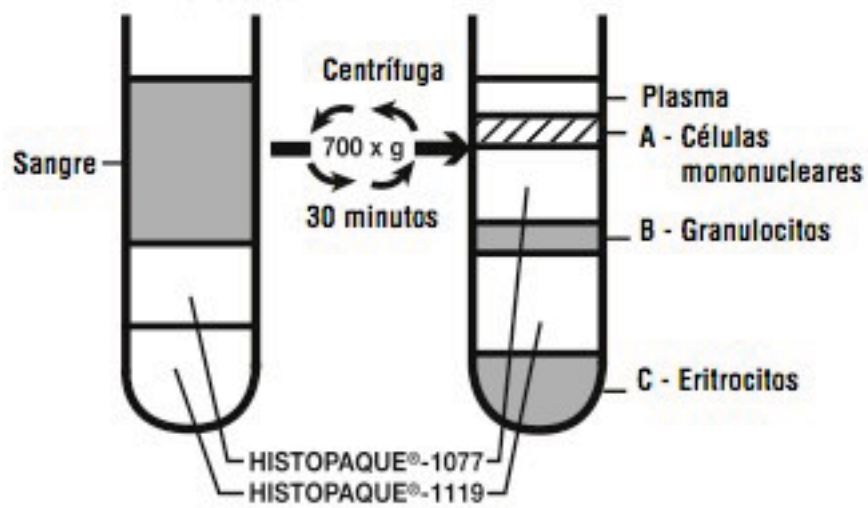


Figura 11. Separación de leucocitos por gradiente de Ficoll Hipaque.



## **6. WESTERN BLOT.**

Una vez obtenidos los leucocitos, se tomó una muestra de ellos para preparar la muestra para Western-Blot usando un buffer de tratamiento (55-57). Brevemente se procedió como sigue: se tomó una muestra de leucocitos y se mezclaron con un volumen de buffer de tratamiento (2-mercaptoetanol 2mM; SDS10%, glicerol1%, PBS a pH8) y se procedió a homogenizar la mezcla usando un sonicador (Marca Turrex) dando cinco “golpes” de 3 segundos cada uno. El homogenado fue centrifugado a 2000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue recuperado y usado como extracto total para realizar el Western-Blot para detectar a la proteína p53 y bcl-2.

### **6.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNAS.**

La concentración de proteína se determinó con el Método modificado de Bradford (58,59). El procedimiento se realizó en una placa para ELISA por duplicado. Para la curva de calibración se agregaron los volúmenes correspondientes a 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8 y 10 µg de proteína a partir de una solución madre de 0.1µg/µl de albúmina sérica bovina y se completaron con solución PBS a 160 µl. En el caso de las muestras, se agregan 5 µl del homogenizado y se adicionaron 155 µl de PBS. Tanto a la curva de calibración como a las muestras se les agregaron 40 µl de reactivo de Bradford, se mezcló cada depósito de la placa y se leyó la absorbancia a 595nm. En un lector para ELISA (Microplate; BIORAD,U.S.A.). Se construyó la curva estándar y por extrapolación se estimó la concentración de proteína de las muestras, empleando regresión lineal (60,61).

Soluciones empleadas:

- Reactivo de Bradford (5x): Se disuelven 100 mg de azul brillante de Coomassie G-250 en 50 ml de Etanol al 95%. Una vez disuelto, se agregan lentamente 100 ml de ácido fosfórico concentrado. Posteriormente se afora a 200 ml con agua desionizada. Se almacena a 4°C evitando la exposición a la luz (Frasco ámbar); en estas condiciones se mantienen estable por 6 meses.

- Solución de PBS (sin calcio ni magnesio): para preparar 1 litro de solución 10x se pesan 80 g de NaCl, 2 g de KCl, 11.5 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 2 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y se afora a 1 litro con agua desionizada; se ajusta el pH a 7.4 con HCl o NaOH 1N.

## 6.2. ELECTROFORESIS.

Se mezclaron alícuotas de las muestras (200  $\mu\text{l}$ ) con 20  $\mu\text{l}$  de buffer de carga. Posteriormente se calentaron a baño maría durante 3 minutos para desnaturalizar las proteínas y se colocaron en hielo inmediatamente.

Las cámaras de electroforesis se lavaron con detergente y abundante agua y se dejaron secar; los cristales donde se prepararon los geles además de haber sido lavados y escurridos, se limpiaron con una toalla y metanol, para retirar trazas de impurezas y grasas (62, 64, 65). Una vez listas, se prepararon geles de poliacrilamida al 10% (gel corrida) y al 6% (gel concentrador) (Cuadro 2) y se cargó una cantidad de proteína constante (50  $\mu\text{g}$ ) de la muestra (Fig.12-C) (61,63).



Fig. 12 Tópicos del protocolo experimental. A) Toma de muestra del recién nacido, B) Proceso de Homogenización, C) Proceso de carga de muestra en el gel de poliacrilamida - SDS.

Se cargaron 10  $\mu$ l de marcador de peso molecular (Rainbow Molecular Weight Markers; Amersham Biosciences) de 10 000 a 250 000 Daltons.

La electroforesis se llevó a cabo en un equipo Mini-PROTEAN-3-Cell de BIO-RAD (83) durante 80 minutos a 150 mV para separar las proteínas en función de su peso molecular a favor de un gradiente eléctrico (Figura 13) (61,63)

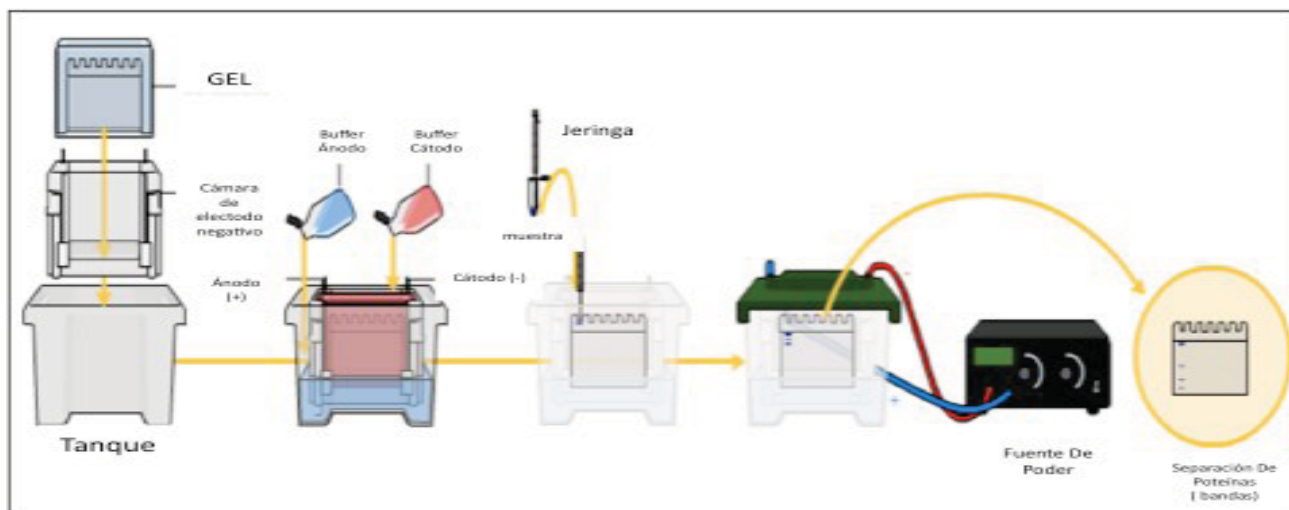


Figura 13. Pasos generales de la Técnica de Electroforesis.

Soluciones empleadas:

- Solución madre de Acrilamida: se disuelven 30 g de acrilamida y 0.8 g de Bis-acrilamida (N,N` methylen-bis-acrilamida) en 50 ml de agua desionizada. Se afora a 100 ml y se almacena por 2 semanas entre 2-8 °C. Debe prepararse en campana de extracción y con guantes.
- Solución de Tris-HCl 1,5 M (pH 8.8): se disuelven 90.75 g de tris-base aforado a 500 ml agua desionizada y se ajusta el pH a 8.8 con NaOH 1N. Se almacena entre 2-8 °C.
- Solución de Tris-HCl 1,0 M (pH 6.8): se disuelven 6.06 g de Tris- base ó 7.882 g de Tris-HCl aforando a 100 ml de agua desionizada y ajusta el pH a 6.8 con HCl 1N. Se conserva entre 2-8 °C.

Cuadro 2. Soluciones para preparar Tris- Glicina-SDS-PAGE para geles de 1.5 mm de espesor. Las cantidades referidas se requieren para preparar un gel de corrida (10 ml) y un gel concentrador (2 ml).

Soluciones	Gel de corrida (poliacrilamida al 10 %)	Gel concentrador (poliacrilamida al 6 %)
Agua desionizada	4,0 ml	1,4 ml
Tris 1,5 M (pH 8,8)	2,5 ml	
Tris 0,5 M (pH 6,8)		0,25 ml
SDS 10 %	0,1 ml	0,02 ml
Acrilamida-Bis acrilamida al 30 %	3,3 ml	0,33 ml
Agitar suavemente 5 a 10 minutos		
Persulfato de amonio al 10 %	0,1 ml	0,02 ml
TEMED	0,004 ml	0,002 ml

SDS, dodecil sulfato de sodio; TEMED, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamida; SDS-PAGE, Electroforesis en gel de poliacrilamida-dodecil sulfato de sodio.

Soluciones empleadas:

- Solución de SDS al 10% se pesan 10 g de SDS y se disuelven aforando a 100 ml de agua desionizada. Se conserva a temperatura ambiente.
- Solución de persulfato de amonio al 10%; se disuelven 0,1 g de persulfato de amonio en 1 ml de agua desionizada. Se conserva entre 2-4 °C.
- Buffer de carga para inmunoblot (10X). Se adicionan en un tubo falcón de 50 ml los reactivos en el siguiente orden: agua desionizada (0.5ml), Tris- HCL 0,5 M pH 6,8 (12.5 ml), SDS al 50% (2 ml), Glicerol (10 ml) y azul de Bromofenol (0.12 g). A la mezcla resultante se le agrega la cantidad necesaria de  $\beta$ -mercaptoetanol para obtener una concentración final de 20% del volumen de buffer de carga. El buffer de carga con  $\beta$ -mercaptoetanol se adiciona a la muestra, de manera que alcance una concentración final del 10% del volumen de la muestra. Se almacena en refrigeración.

- Buffer de corrida para inmunoblot (10x); se pesan 30.2 g de Tris-HCl, 144g de Glicina y 10 g de SDS. Todo se disuelve perfectamente en agua desionizada aforando a 1000 ml. Se almacena entre 2 y 8 °C.

### 6.3. TRANSFERENCIA.

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas separadas presentes en el gel se transfirieron a membranas de PVDF (Hybond-P Amersham Bioscences, UK) empleando un sistema semiseco Trans-blot SD Electrophoretic Transfer Cell de Bio-Rad durante 80 minutos a 100 mA (Figura 14) (55, 56, 60, 64,65).

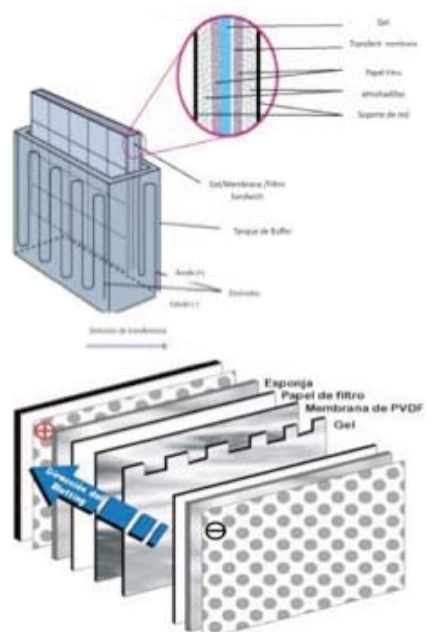


Figura 14. Ejemplificación de la Transferencia.

Para este paso se prehumedeció la membrana de PVDF en metanol absoluto por 5 minutos y posteriormente se sumergió en buffer de transferencia junto con los papeles filtro (Extra Thick Blot Paper de Bio- Rad). Todos los pasos deben realizarse con guantes y de preferencia con pinzas. La membrana de PVDF, el Gel y los papeles filtros se dispusieron de la siguiente manera en la unidad de transferencia (a manera de sándwich Fig.15), procurando eliminar el exceso de buffer (55-56).

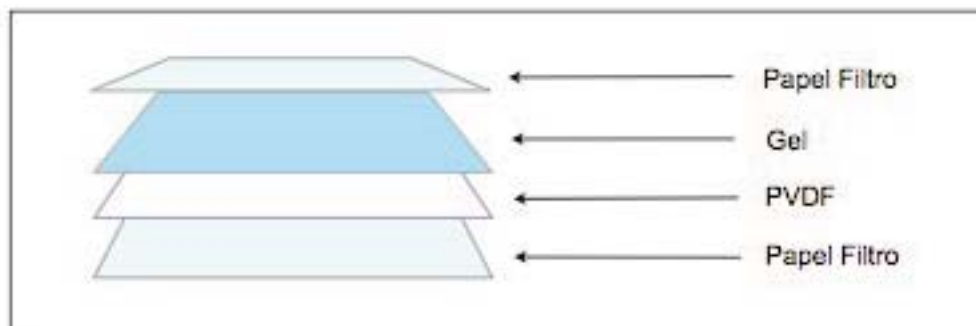


Figura 15. Componentes del sándwich de transferencia.

Al término de la transferencia se tiñeron las membranas de nitrocelulosa con solución de rojo de Ponceu para determinar la ubicación de las proteínas y para comprobar la eficacia de la transferencia (55,56).

Soluciones empleadas:

-Buffer de transferencia 10X (solución madre). Se pesan y mezclan con agua desionizada los siguientes reactivos: Tris-HCl (3.0275 g), Glicina (14.4413 g) y se afora a 1000 ml. Esta solución madre se almacena entre 2 y 8 °C. Para preparar 200 ml de buffer de transferencia se disuelven 20 ml de la solución madre, 140 ml de agua desionizada y 40 ml de metanol. Debe ser en este orden para evitar la precipitación de las sales. La proporción es: 10% de solución madre, 70% de agua desionizada y 20 % de metanol en la solución final.

#### 6.4. BLOQUEO E INCUBACIÓN CON ANTICUERPOS.

Una vez realizada la transferencia, las membranas fueron bloqueadas con TBST- leche al 5%, durante 1 h, a temperatura ambiente, en agitación constante. Con esto se consigue bloquear con caseína el resto de la membrana donde hay proteína transferida (55, 56,62-65).

A continuación, las membranas se incubaron con anticuerpos policlonales de cabra contra la presencia de las proteínas bcl-2 y p53 (Santa Cruz Biotechnology, U.S.A.)

Diluidos 1:200 y 1:1000, Respectivamente, en TBST-leche 5% a 4°C durante toda la noche, en agitación continúa.

Las membranas se lavaron 3 veces con TBST por 10 minutos y se incubaron con anticuerpo secundario anti-cabra (Santa cruz Biotechnology) conjugado con peroxidasa de rábano, diluido 1:1000 en TBST-leche 5% durante 2 h a temperatura ambiente en agitación constante y se lavaron 3 veces con TBST durante 10 minutos (55, 56,62-65).

Soluciones empleadas:

-Solución de TBS (10X): se pesan 12.1 g de Tris-HCl o Tris- HCl o Tris-base y 89 g de NaCl y se afora a 1000 ml. Estando bien disueltos se almacena en refrigeración.

-Solución de TBST (Tween) al 0.1% a 1 litro de TBS 1X se le agrega 1 ml de Tween 20. Es conveniente pipetearlo con una jeringa de insulina debido a que es una sustancia muy espesa.

-Soluciones de TBST- leche al 5% se pesan 5 g de leche en polvo (Svelty) y se afora a 100 ml con solución de TBST al 0.1% posteriormente se mezclan y se mantienen en agitación constante.

## **6.5. DETECCIÓN.**

Las membranas se incubaron con sustrato colorimétrico rojo de ponceau, una vez localizada la proteína requerida, la membrana fue escaneada en un equipo Alpha imagen (Figura 16). Con un sistema de documentación y análisis para determinar por medio de absorbancia (lectura 600nm) la cantidad aparente de cada proteína (55, 56,61-65).

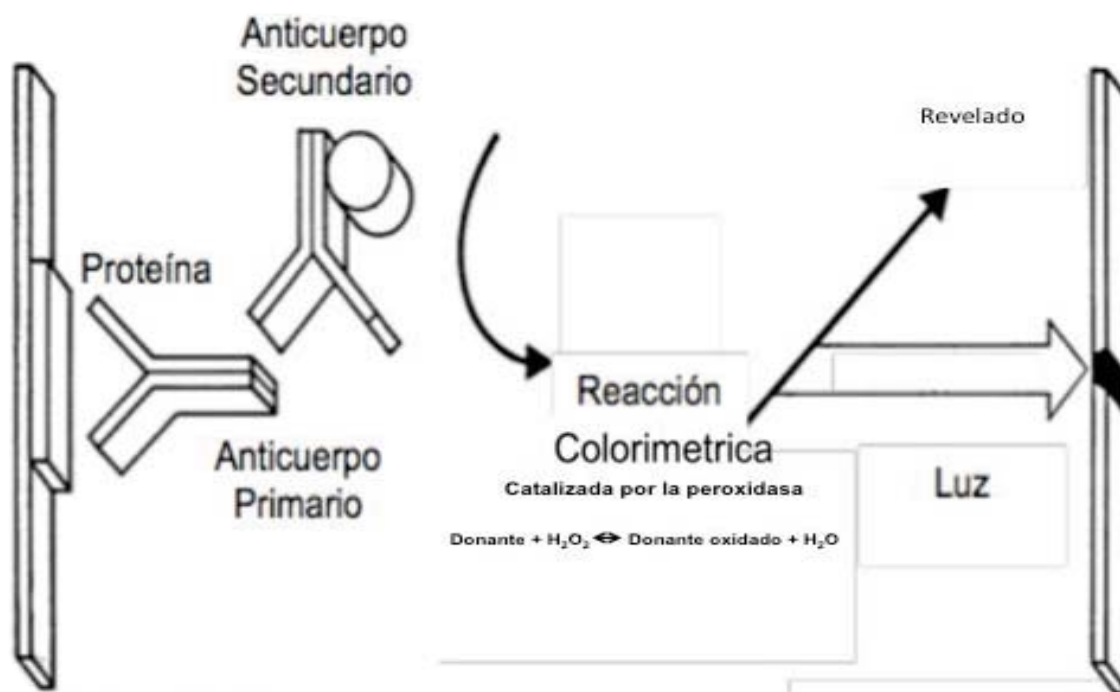


Figura 16. Principales pasos del inmunoreconocimiento y detección de una proteína.

## 7. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE CASPASA-3.

Se utilizó un kit de Ensayo para medir la actividad celular (Calbiochem® Caspasa-3) de caspasa-3, así como su actividad en los extractos celulares (66). La caspasa-3 es un miembro de la familia de las caspasas que juega un importante papel como mediadores de la apoptosis o muerte celular programada. Después de su activación, la caspasa-3 corta una gran variedad de proteínas celulares, causando cambios morfológicos y funcionales en las células que llevan a cabo la apoptosis (66).

El extracto total de proteínas, fue mezclado con un volumen equivalente de tampón de fosfato salino (PBS), posteriormente se resuspenden las células a una concentración deseada con un tampón helado de lisis celular, se incuban durante 5 minutos y se centrifugan a 10000x g, 10 minutos a 4 °C.

Para el ensayo se descongelan todos los componentes del kit manteniéndolos en baño de hielo hasta su uso. Se diluye el inhibidor de caspasa-3 (Ac-DEVD-CHO) 1:200 en el tampón de ensayo, mediante la adición de 1 µl del inhibidor y 200 µl del tampón de



ensayo en un tubo por separado. Por otra parte se diluyó el sustrato colorimétrico de la caspasa-3 (Ac-DEVD-pNA) en el tampón de ensayo a dos veces de concentración final deseada. Equilibrar la dilución a la temperatura de ensayo (37°C). Finalmente obtenemos 15 µl (30U) de la caspasa-3 por pozo. Añadir tampón de ensayo a cada pocillo de la placa de ½ volumen según sea necesario. El volumen final de cada reacción será de 100 µl. Permitir que la placa se equilibre a la temperatura de ensayo (37°C) y añadir 10µl de los extractos celulares o 15 µl de caspasa-3 (diluido) en los pocillos correspondientes.

Incubar la placa a temperatura de ensayo durante 10 minutos o un poco más para permitir la inhibición y la interacción con la enzima. Se realizó una lectura de la absorbancia a 405 nm para detectar el sustrato colorimétrico (Figura 17) (66,67).

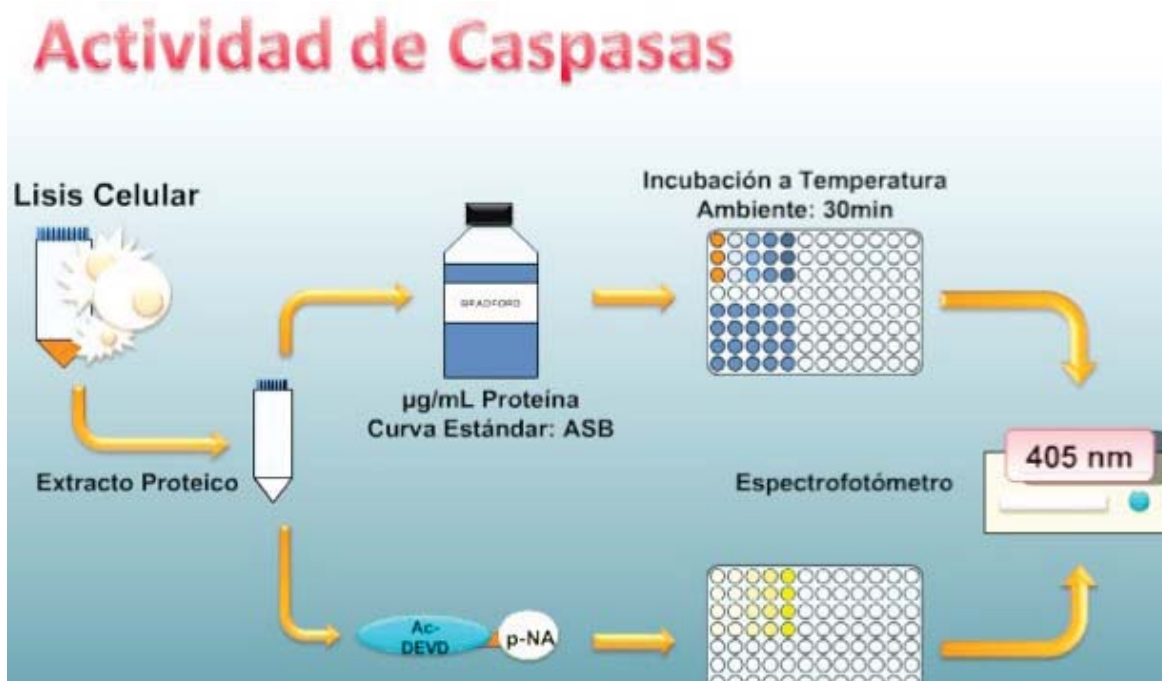


Figura 17. Determinación de Caspasa- 3.

Soluciones empleadas:

-Tampón de lisis Celular (Se suministra de 30 ml de HEPES, 5 mM DTT, 0.1 mM EDTA, 0.1% CHAPS, pH 7.4).

-Búfer de ensayo. Se suministra en 20 ml de 100 mM de NaCl , 50 mM HEPES, 10 mM DTT, 1 mM EDTA, 10% glycerol, 0.1% CHAPS. pH 7.4 .

-Caspasa-3, Humano, recombinante (Se suministra hasta 300 unidades (10 unidades/ $\mu$ l) en búfer de ensayo).

-Sustrato I colorimétrico de caspasa (Ac-DEVD-pNA). Se suministra 1 ml en 2 ml (1.3 mg/ml) en búfer de ensayo.

-p-Nitroanilina (Se suministra 1 ml en 50  $\mu$ M de solución búfer de ensayo).

Inhibidor de la caspasa-3 (Se suministra 50  $\mu$ l de 100  $\mu$ M (0.05mg/ml) en DMSO).

-Estándar de calibración AMC (7-amino-4-metilcumarina). Se suministra 1 ml de solución 30  $\mu$ M en el búfer de ensayo.

## 8. FRAGMENTACIÓN DEL ADN.

Las moléculas de ADN de las células son excesivamente grandes para avanzar a través de un gel de electroforesis normal, pero pueden analizarse si previamente se han fragmentado de forma controlada. Se suelen emplear geles de agarosa (concentración 0.3% y 2%), más porosos que los de poliacrilamida. Las características mecánicas de estos geles hacen aconsejable la realización de la electroforesis horizontal, habitualmente submarina (Figura 18) (68,69).

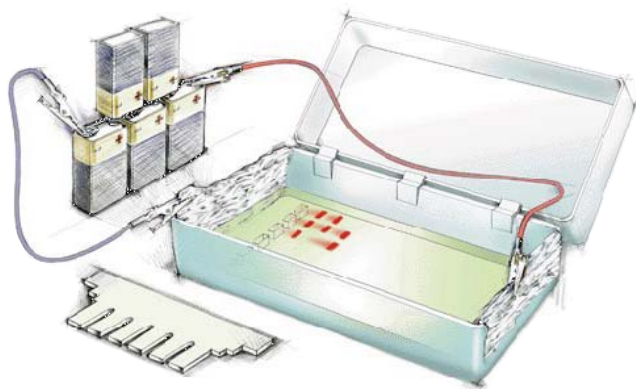


Figura 18. Electroforesis Horizontal.

## 8.1. EXTRACCIÓN DEL ADN.

El primer paso en la purificación del ADN consiste en homogeneizar las células y lisar los núcleos de los cuales se extrae el ADN. Agregar 500  $\mu$ l de buffer de lisis al extracto de proteínas, agitar vigorosamente (con auxilio de un Vortex) e incubar por un mínimo de 2 horas o toda la noche a 4°C, (una hora antes de finalizar, agregar 5  $\mu$ l de RNasa A). Centrifugar a 14000 rpm durante 2 minutos. Pipetear 500  $\mu$ l del sobrenadante a un tubo limpio, lavar con solución de lisis, mezclar con vortex y centrifugar nuevamente a 14000 rpm durante 2 minutos. Decantar el sobrenadante y resuspender agregando 5700  $\mu$ l de NaCl 5.0 mM, agitar brevemente y adicionar 40  $\mu$ l de SDS al 10%. Centrifugar a 14000 rpm por 10 min. Pipetear 500-600 $\mu$ l del sobrenadante a un tubo limpio. Agregar igual volumen de cloroformo–alcohol isoamílico (49:1). Centrifugar a 14000 rpm por 6 minutos. Decantar a un tubo limpio con etanol absoluto frío (-20°C).

Para recuperar mayor cantidad de ADN se realiza una segunda purificación donde se coloca el sobrenadante obtenido anteriormente a -20°C por dos horas o toda la noche. Con la micropipeta transferir el ADN a otro tubo limpio con etanol al 70%. Centrifugar a 14000 rpm por 6 min. Descartar todo el líquido sobrenadante con cuidado de no tirar el pellet. Descartar el alcohol y dejar secar a temperatura ambiente (Figura. 19) (70-71).

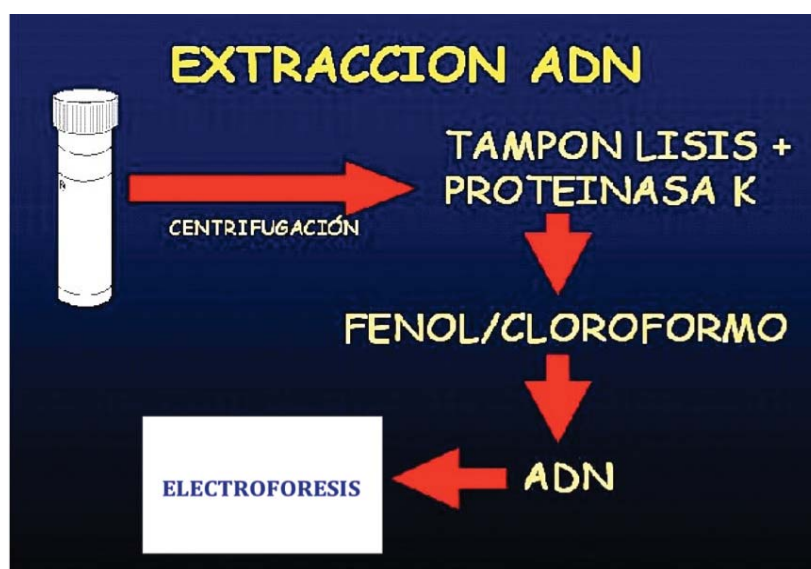


Figura 19. Técnica de extracción de ADN.

## 8.2. SEPARACIÓN DEL ADN MEDIANTE ELECTROFORESIS EN GEL.

La electroforesis en gel se utiliza ampliamente en la separación de ácidos nucleicos de diferente peso molecular (Fig.20). Las moléculas de DNA pequeñas, de unos pocos cientos de nucleótidos o menos, por lo general se separan en un gel de agarosa 1%. Las muestras de DNA se aplican (20  $\mu\text{g}$ ) en pocillos practicados dentro del gel. La carga eléctrica de una molécula de DNA depende de sus grupos fosfatos, y el número de éstos es igual al doble del número de pares de bases. La forma de todas las moléculas de ADN es esencialmente la misma. En consecuencia, resulta que la movilidad en electroforesis depende exclusivamente de la longitud de la molécula (medida habitualmente como número de pares de bases, pb: la electroforesis separa los fragmentos de ADN de acuerdo con su longitud en pb. El avance del frente de electroforesis se sigue con colorantes como azul de bromofenol contenido en el buffer de carga que se le añade a la muestra. La electroforesis se llevó a cabo en un equipo HE 99 Max Submarine Gel Unit durante 45 minutos a 150 mV, para separar las proteínas en función de su peso molecular a favor de un gradiente eléctrico (70,71).

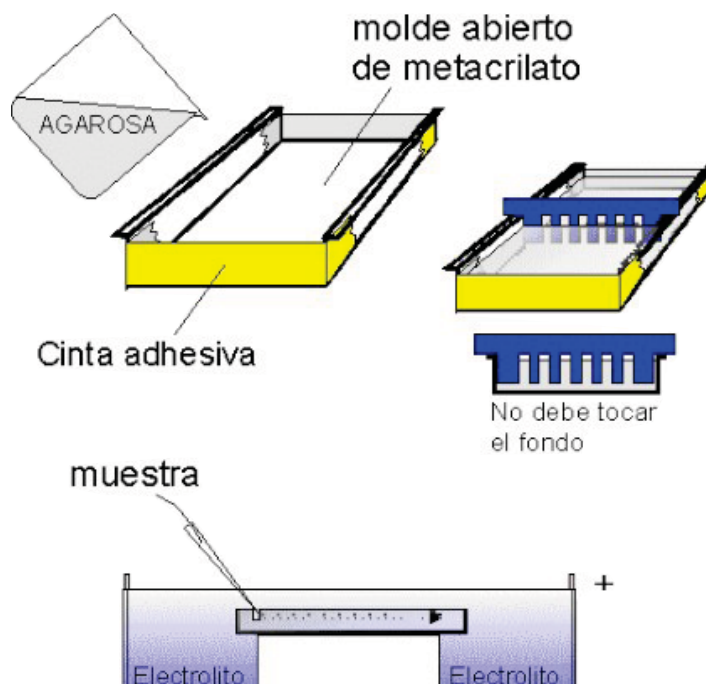


Figura 20. Esquema del desarrollo de una electroforesis de Ácidos nucleicos en gel de agarosa.

Soluciones empleadas:

- Buffer de lisis (50 mM de tris HCL, 50 mM EDTA pH 8.1% de SDS y 50 mM de NaCl )
- NaCl (5 mM)
- Solución de SDS al 10% se pesan 10 g de SDS y se disuelven aforando a 100 ml de agua desionizada. Se conserva a temperatura ambiente.
- Cloroformo-alcohol isoamílico
- Etanol o isopropanol a -20°C

Preparación del gel de agarosa:

- Se vierten en un matraz 30 ml del tampón de electroforesis TBE y 0,21 g de agarosa (0,7 %). 3.3.2. Se funde la solución de agarosa en un microondas o placa calefactora.
- Se deja enfriar la suspensión hasta que alcance unos 50 °C aproximadamente.
- Se sella con cinta adhesiva el soporte donde se va a verter el gel de agarosa y se coloca el peine que servirá para formar los pocillos del gel.
- Una vez que la solución de agarosa ha alcanzado los 50 °C, se le añaden 2 µL de bromuro de etidio (10 mg/ml) y se mezcla bien (uso necesario de guantes).
- Se vierte la solución de agarosa con bromuro de etidio en el soporte, previamente sellado. Se deja polimerizar durante unos 30 minutos.

## RESULTADOS.

Al consultar el expediente clínico de las madres, al ingreso del servicio de ginecología de nuestra institución, se obtuvo una fuente de datos con la que se realizó el Cuadro 3. El cual muestra las características generales de las mujeres cuyo producto nació prematuramente (n=18) así como del grupo control (n=10). Tal como se puede observar, no existen diferencias entre las variables determinadas entre ambos tipos de mujeres con excepción de la presión sanguínea durante el nacimiento en donde se observó que las mujeres con parto prematuro presenta una mediana superior a las del grupo control (175/113 vs 115/70); respectivamente.

**Cuadro 3.** Características generales de las madres de los recién nacidos del grupo control y de los prematuros.

Variables	Control (n= 10)	Prematuros (n= 18)
<b>Edad (años)</b>	30.5 ± 5.41 (23-35)	31.72 ± 6.42 (23-37)
<b>I.M.C. (kg/m<sup>2</sup>)</b>	27.22 ± 4.45 (20-40)	26.43 ± 3.75 (20-40)
<b>Relación</b>	3/7	10/8
<b>Primipara/múltipara</b>		
<b>Presión sanguínea en reposo, (mm Hg)</b>	110/68 (108/63-115/70)	120/75 (118/70-123/78)
<b>Presión sanguínea durante el nacimiento (mm Hg)</b>	115/70 (108/68-120/75)	175/113 (170/110-180/115)
<b>Hemoglobina (g/dL)</b>	11.9 (11.2-12.9)	12.5 (11.1-13.0)
<b>Cuenta de plaquetas (x10<sup>9</sup>/L)</b>	205 (183-236)	198 (161-229)
<b>Ácido úrico (mmol/L)</b>	257 (204-315)	260 (210-317)

\*Los datos se expresan como promedios ± D.E (rangos), o mediana (rangos) según corresponda.

Por otro lado, el Cuadro 4 muestra las características generales de los recién nacidos tanto del grupo control como de los prematuros, los cuales fueron obtenidos de sus notas de ingreso ya sea al cunero o al servicio de cuidados intensivos neonatales.

**Cuadro 4.** Características generales de los recién nacidos prematuros y los del grupo control incluidos en el estudio.

<b>Variables</b>	<b>Control (n = 10)</b>	<b>Prematuros (n = 18)</b>
<b>Edad gestacional (semanas)</b>	32.8 ± 2.21 (26-36)	25 ± 1.37 (24-28)*
<b>Sexo (Fem/Mas)</b>	8/2	11/7
<b>Peso corporal (kg)</b>	1.92 ± 0.62 (1.01-3.10)	1.25 ± 0.26 (0.98-1.52)*
<b>Tipo de nacimiento</b>		
<b>Vaginal</b>	8	2
<b>Cesárea</b>	2	16
<b>Apgar 1 minuto</b>	7 (6-10)	3 (1-6)
<b>Apgar 5 minutos</b>	9 (7-10)	4 (3-6)
<b>Intubado y recibe oxígeno al nacimiento (n)</b>	0	18
<b>Días de oxigenoterapia</b>	0	3-5
<b>Análisis de gases sanguíneos al nacimiento.</b>		
<b>pH</b>	7.32 ± 0.09 (7.25-7.38)	7.15 ± 0.05 (6.89-7.22)*
<b>Deficiencia de Base (mM)</b>	6.08 ± 2.81 (1.82-9.21)	7.31 ± 3.1 (1.11-16.81)*

\*Los resultados se expresan como promedios ± D.E. (rangos), o mediana y rangos, según corresponda. \*p< 0.05 vs grupo control.

Como puede observarse, en el grupo de niños prematuros, se presenta una edad gestacional y peso corporal inferiores al del grupo control; dato por demás esperado; se presentó un mayor número de nacimientos por cesárea, así como un Apgar menor tanto al minuto como a los cinco minutos; además de que todos los niños prematuros fueron intubados. Por otro lado, comparándolos con el grupo control, los recién nacidos prematuros presentaron un menor promedio de pH y deficiencia de base (Cuadro 4).

De los 18 niños prematuros, el 88.8% (n= 16) fueron producto de madres que presentaron preeclampsia las cuales fueron sometidas a cesárea dentro de las 48 horas posteriores a su ingreso al hospital y se registraron datos de sufrimiento fetal en todas

ellas. Además, el 11.2% (n= 2) de las pacientes presentaron un parto por vía vaginal presentando trabajo de parto pretérmino sin conocer la causa etiológica.

Con el objeto de determinar la participación de la expresión de varias proteínas que se relacionan con la muerte celular se determinó su expresión proteica mediante la técnica de Western Blot vistos con tinción del papel de nitocrilosa con rojo de ponceau (Figura 21) empleando un extracto de proteína total proveniente de leucocitos de sangre periférica obtenida de los sujetos de estudio tanto en niños normales como en los prematuros.

#### NIÑOS SANOS (1) Y PREMATUROS (2)



Figura 21. Imagen representativa de un Western Blot de una muestra de proteínas totales de leucocitos provenientes de niños sanos y prematuros

En la figura 22 se muestra un ejemplo del Western-Blot para la determinación de la presencia de Bcl-2 en ambos grupos de estudio. Como se puede observar, existe una mayor presencia de esta proteína en la muestra de leucocitos proveniente de los niños prematuros en comparación con los del grupo control.



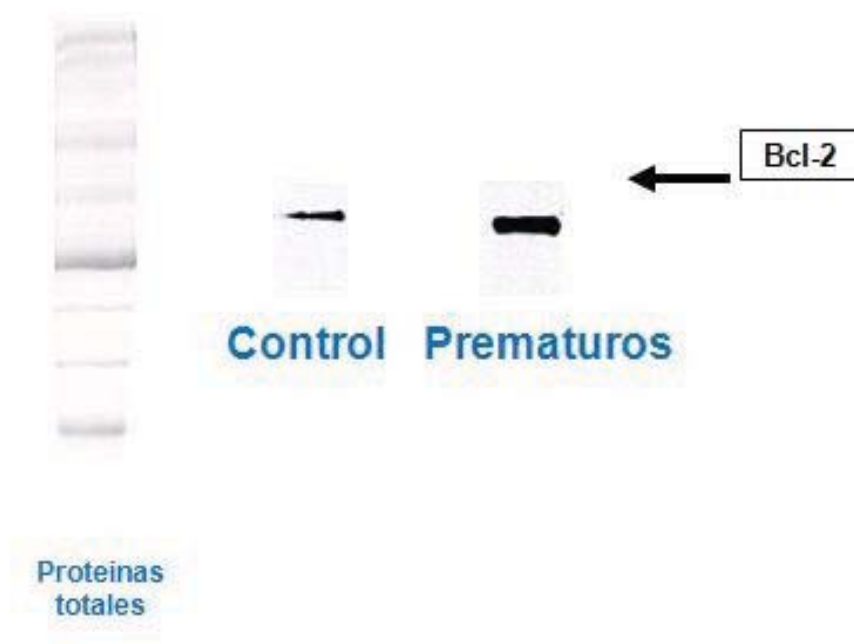


Figura 22. Imagen representativa de leucocitos provenientes de niños prematuros y a término para detectar la presencia de la proteína Bcl-2 por medio de Western Blot.

En la figura 23 se muestra una imagen representativa del Western Blot realizado para detectar la presencia de la proteína p53 en ambos grupos de estudio. Al igual que con la proteína bcl-2, se observa un incremento importante en la presencia de la proteína p53 en las muestras provenientes de niños prematuros en comparación con el grupo control.

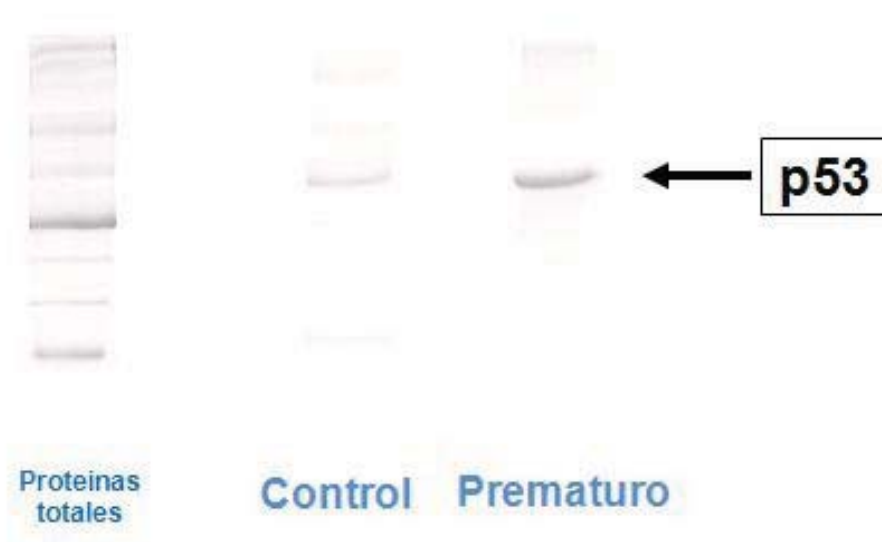


Figura 23. Imagen representativa de leucocitos provenientes de niños prematuros y a término para detectar la presencia de la proteína p53 por medio de Western Blot.

Por medio del kit de Ensayo (Calbiochem® Caspasa-3) se determinó la actividad de la enzima caspasa- 3 y se observa un aumento en la actividad de esta enzima en las muestras de leucocitos de los recién nacidos prematuros en comparación con las muestras de los niños nacidos a término (Figura 24).

## Actividad de Caspasa 3

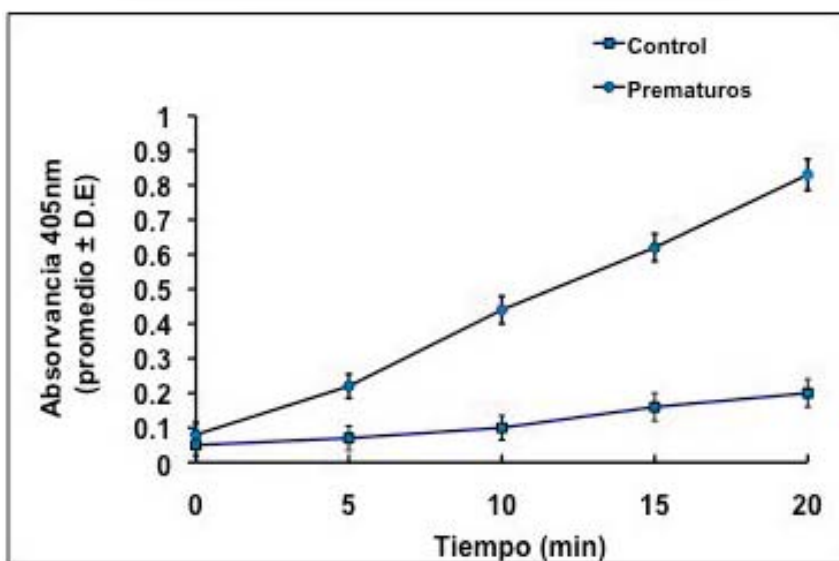


Figura 24. Gráfico de la Actividad de la Enzima Caspasa-3.

La Figura 25 muestra un ejemplo de un gel de agarosa preparado para observar la fragmentación del ADN en muestras obtenidas de leucocitos provenientes de niños prematuros y nacidos a término. Tal como se puede observar, existe un patrón de fragmentación del ADN en “escalera” en las muestras provenientes de los niños prematuros, en comparación con las muestras de ADN obtenidas del grupo control.

## Fragmentación de ADN

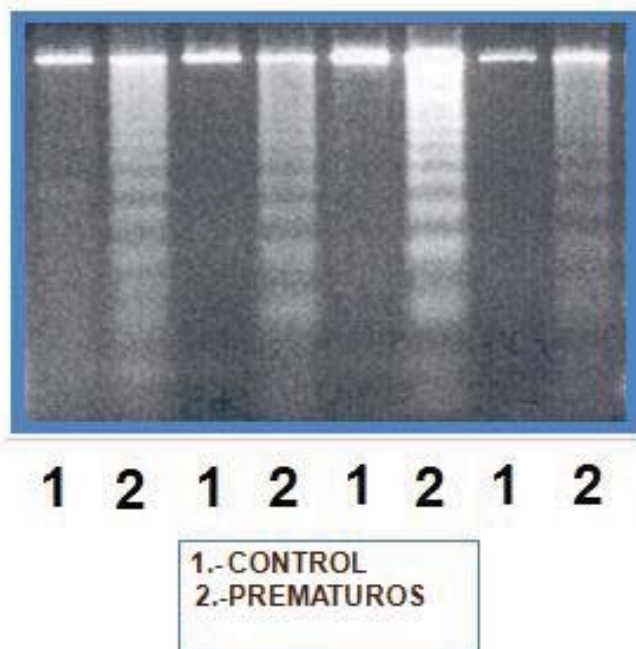


Figura 25. Imagen representativa de un gel de agarosa para observar la fragmentación de ADN en muestras provenientes de niños prematuros y a término.

Nuestros datos sugieren que los leucocitos provenientes de los niños prematuros presentan apoptosis como se ha demostrado en las determinaciones anteriores.

## DISCUSIÓN Y ANÁLISIS DE RESULTADOS.

Al analizar los expedientes clínicos de las mamás que fueron internadas en el servicio de ginecología del CMN "20 de Noviembre", se puede observar que aquellas mamás que presentan un parto prematuro, tuvieron una variación importante en su presión arterial, en comparación de las mujeres que presentaron un parto a término. Estas

variaciones en la presión arterial de las mamás con parto prematuro presentan preeclampsia lo que explica las elevadas cifras en la presión arterial ya que éste factor es importante en este tipo de patologías (7,8).

Como consecuencia de que las mamás con preeclampsia tienen un parto prematuro, sus recién nacidos presentan una edad gestacional y un peso corporal inferiores a los niños nacidos a término, que es como ha sido reportado previamente, ya que éstos dos datos (edad gestacional y peso corporal) son los principales parámetros clínicos que se toman en cuenta para evaluar si un recién nacido es o no prematuro (1-4). Por otro lado, como consecuencia de la preeclampsia que presenta la madre, los niños prematuros nacieron por cesárea y al nacimiento presentaron una calificación de Apgar inferior al minuto y a los cinco minutos posteriores a su nacimiento. La calificación de Apgar es una prueba clínica que sirve para tener una valoración general sobre el estado de salud del recién nacido y saber sobre la tolerancia que tienen los bebés al proceso del nacimiento, así como su posible sufrimiento que nos lleva a evaluar su nivel de adaptabilidad al medio ambiente y su capacidad de recuperación (3,5,6).

Tal como fue mencionado en la sección de la introducción, los niños prematuros son altamente propensos a presentar infecciones que en cierto momento, pueden causarles la muerte. Infecciones del aparato respiratorio y gastrointestinales son las principales causas de muerte en los niños prematuros durante el primer mes de vida (1-6). Además, es conocido el hecho de que el sistema inmune juega una parte importante en la defensa del recién nacido ante el ataque de virus, bacterias y parásitos; además de que los leucocitos son los principales actores en este proceso de defensa (1-6).

Los leucocitos son producidos en la médula ósea y se encuentran en el torrente circulatorio en donde ejercen su función de “vigilancia” del organismo ante la presencia de agentes patógenos (11,12). Los leucocitos presentan una vida media entre 20 a 40 días y posteriormente, son eliminados de la circulación al activarse el sistema de la apoptosis. Al mismo tiempo, en la médula ósea se están madurando nuevos leucocitos que van a sustituir a los que fueron eliminados por este sistema de apoptosis (1,12,18-22). Por otro lado, se sabe que en algunas enfermedades infecciosas (como es el SIDA) o que son crónico-degenerativas (como es la diabetes mellitus); los leucocitos presentan un mayor grado de apoptosis en comparación a población sana, lo que hace

que en este tipo de personas tengan cuadros de infecciones más frecuentemente que en la población normal (12, 17, 42, 43, 45).

Tomando en cuenta lo anterior, los datos sugieren que los leucocitos de los niños prematuros pueden tener un proceso de apoptosis más “activo” lo que los haría más propensos a presentar todo tipo de infecciones que pueden provocarles la muerte (9,10).

Nuestros resultados muestran que los leucocitos que provienen de niños prematuros presentan datos de apoptosis mayores a los que son obtenidos de niños nacidos a término. Para ello, usamos como marcadores de apoptosis la determinación de proteínas consideradas como claves en este proceso, como son la detección de las proteínas bcl-2 y p53, además de determinar la actividad de la enzima caspasa-3 y detectar la fragmentación del ADN.

Estos indicadores nos señalan en que momento la célula, que inicia un ciclo celular, entra a un proceso de autodestrucción (apoptosis) o continuar en el ciclo celular para dividirse por mitosis; lo que es fundamental tanto para generar nuevas células en el desarrollo embrionario como para reemplazar las células dañadas en un órgano adulto (15).

Una célula entra en apoptosis cuando ésta pierde el contacto con sus alrededores; cuando existe un daño interno irreparable; o cuando recibe señales del medio externo que inducen o atenúan el ciclo celular (26,27). El ciclo celular es el proceso ordenado y repetitivo en el que la célula crece y se divide en dos células hijas (15, 16,19). Dentro de la regulación del ciclo celular existen tres puntos especialmente importantes llamados puntos de regulación; el primero de ellos está entre las fases G1 y S (también llamado punto de restricción), el segundo entre las fases G2 y la mitosis y un tercero en la anafase durante la mitosis. En estos puntos el ciclo se puede detener en caso de daño al ADN o cuando los eventos moleculares para la transición a la siguiente fase no se han completado (17).

El ciclo celular es el proceso ordenado y repetitivo en el que la célula crece y se divide en dos células hijas y consta de las siguientes fases: fase G0 (estado de reposo); fase de control G1, fase S (en donde se da la síntesis de ADN); fase de control G2 y fase M. La apoptosis puede iniciarse en el tercio final de la fase G1 del ciclo celular y puede ser

que se active para impedir que una célula que esta dañada (principalmente en su ADN) ingrese a la fase S del ciclo celular; de tal manera que las mutaciones o lesiones no se reproduzcan durante la replicación del ADN (21-25). La fase G1 es el punto del ciclo celular en donde la célula se encarga de revisar las condiciones del medio, buscando factores que induzcan el progreso del ciclo celular, revisar que la célula haya crecido lo suficiente y que el material genético este intacto (21-25).

Podemos decir que las células tienen mecanismos de control capaces de frenar el ciclo celular si algún error ocurre, para poder ser reparado o bien para inducir la apoptosis cuando el daño es muy extenso. En condiciones normales no se permite la progresión del ciclo hasta que el error no se haya corregido; sin embargo, algunas células tienen mutadas ciertas proteínas reguladoras que pueden ser capaces de repetir el ciclo indefinidamente aun sin integridad del ADN, como ocurre en el cáncer (27-35).

Se ha descrito que existen dos vías por la que se da el mecanismo de apoptosis. La llamada vía extrínseca es inducida por la unión de un receptor con un ligando, que hacen que los receptores que están en la superficie celular y que pertenecen a la familia de los receptores TNF (receptor del factor de necrosis tumoral) produzcan la activación de una vía de muerte común. La llamada vía intrínseca se da por una activación de estrés y otras señales las cuales desencadenan la liberación del citocromo C al citoplasma. En cualquiera de las dos vías, los genes más estudiados que participan en el proceso de la apoptosis son: bcl-2, p53 y caspasas entre otros (28-30,33).

Tal como lo muestran nuestros resultados de análisis por Western-Blot, nosotros detectamos un incremento en la expresión de las proteínas bcl-2 y p53 en los leucocitos provenientes de niños prematuros, en comparación con los de niños nacidos a término. Además, detectamos un incremento en la actividad de la caspasa-3 y encontramos un patrón en “escalera” del ADN, que son característicos de un proceso de apoptosis.

Tanto Bcl-2 como p53 son dos proteínas muy importantes durante el proceso del ciclo celular ya que, una vez que la célula pasa a la fase de G1, estos dos factores se encargan de preparar a la maquinaria celular para pasar a la fase S.

En el caso de Bcl-2, ésta proteína es un sensor importante del ciclo celular ya que determina si la célula puede continuar a la siguiente fase o entra en un proceso de apoptosis.

Bcl-2 es una proteína que es miembro de una familia de moléculas pro y antiapoptóticas encargadas de activar la muerte celular, ya que son proteínas que residen en la superficie celular (35,36) y cuando son activadas pueden alterar la integridad de la membrana, ya que ocurre una pérdida de potencial y desestabilización de la membrana externa. Nosotros pensamos que la sobre expresión de Bcl-2 (Figura 22) en los leucocitos de los niños que nacieron prematuros, altera la integridad de la célula y actúa específicamente en los procesos de contracción citoplasmática, condensación nuclear y ruptura endonucleolítica del ADN lo que da la señal de apoptosis más alta en comparación con los niños que nacieron a término ya que la expresión de esta proteína en estas muestras es más baja.

Por otro lado, se sabe que diversos estímulos inducen y activan a diferentes proteínas con ciertos dominios mediante mecanismos transcripcionales y postranscripcionales. Por lo que una lesión del ADN contribuye a la inducción transcripcional, mediada por p53 (40).

Se ha descrito que un aumento de la expresión de p53 se asocia a una detección del ciclo celular favoreciendo la reparación del ADN dañado (43), por lo que la función primordial de esta proteína es encargarse de regular la transcripción en el ciclo celular y si existe una mutación de este o un incremento en la expresión, como es en el caso de las muestras de leucocitos de niños prematuros (Figura 23) a comparación con la de los recién nacidos a término, se puede decir que esta elevación induce a las células a que se detengan desde la fase G1 del ciclo celular para evitar un daño al ADN y así la célula entre a un estado de senescencia o de apoptosis (40-44).

Por otro lado, los receptores de muerte celular activan a una serie de enzimas llamadas caspasas para que se dispare el proceso de muerte celular. Las caspasas realizan su función enzimática de forma específica, eficaz y todas estas proteínas se activan por proteólisis, la cual permite realizar su función con un efecto cascada que se va amplificando a si mismo desde que se da la señal de inicio. De esta forma contribuyen al desmantelamiento y empaquetamiento de la célula moribunda (48,49).



Como ya se mencionó anteriormente esta proteína induce los cambios morfológicos y bioquímicos observados durante la muerte celular, de acuerdo a nuestros resultados obtenidos podemos decir que existe una mayor actividad de la caspasa-3 en las muestras de leucocitos de niños prematuros a diferencia de las muestras de los niños a término. Este incremento en la actividad (Figura 24) de la caspasa-3 que se da en las muestras de los niños prematuros se debe a que la cascada de señalización que desencadena este tipo de enzimas no se está regulando adecuadamente por lo que su activación se desencadena para iniciar el proceso de muerte, en este caso la caspasa-3 nos indica que hay una condensación de la cromatina y es la responsable de la fragmentación del ADN (52). Esta fragmentación es un evento característico del fenómeno apoptótico y es la fragmentación del ADN que se da por una nucleasa de 40 KD. El material genético es roto en 300 kilo bases (Kb) y posteriormente en pequeños fragmentos de 180 a 200 pares de bases (pb) y múltiplos de ellos. Los cuales pueden ser observados en la electroforesis en gel de agarosa donde se produce una fragmentación llamada “patrón de escalera de ADN” (Figura 25) (53).

En si el proceso de apoptosis puede activarse por diferentes tipos de estímulos pero puede diferenciarse este proceso en varias fases como:

- Efectora: En esta fase la célula ya está destinada a morir sin opción de retornar alguna parte del ciclo celular. También existe una activación de ciertos grupos enzimáticos, junto con cambios en el citoesqueleto celular, produciendo cambios en el tamaño y forma celular.
- Degradativa: En esta etapa como su nombre lo dice se degradan los ácidos nucleicos y hay más cambios en la membrana celular. Se activan las endonucleasas que se encargan de fragmentar el ADN lo que hacen que se formen cuerpos apoptóticos; además, se producen cambios marcados en el citoesqueleto y se condensa la cromatina. Estos cuerpos apoptóticos son fagocitados por macrófagos, impidiendo la salida del contenido celular al exterior y evitando inflamación.

- Limpieza: por último en esta fase los macrófagos se encargan de eliminar todas las células apoptóticas, sin que esto afecte al tejido circundante, atraídos por ligandos específicos (26,27).

Las células reciben constantemente señales de vida y de muerte y es el contexto celular el que determina el resultado final. De manera normal, las células tienen en su interior la maquinaria enzimática necesaria para ejecutar el programa apoptótico. Este proceso es innato y evolutivamente conservado, en el cual las células se inactivan, se desensamblan y degradan su propia estructura y componentes de manera coordinada y característica (39).

El mecanismo por medio del cual, los leucocitos de los niños prematuros son activados para entrar en apoptosis y sus mecanismos que lo continúan, no los conocemos en la actualidad. Sin embargo, se ha reportado que pueden existir fenómenos de apoptosis en leucocitos de sangre periférica en enfermedades generalmente con autoinmunidad, infecciones víricas (27,75), metabólicas las cuales podemos suponer que se heredan de forma autonómica recesiva o en este caso sería por una herencia especial llamada materna (mitocondrial) como por ejemplo la diabetes, enfermedades neurodegenerativas, leucemia, enfermedades del hígado, malformaciones hereditarias entre otras (27, 72, 73, 74).

Otros factores que pensamos que pueden desencadenar este proceso son las patologías que afectan a la madre y/o producto como las alteraciones trofoblásticas (76,77), toxicomanías, desnutrición (78,79), rol de la mitocondria y el estrés oxidativo (80).

Como hemos expuesto con anterioridad, existen diferentes factores que dan una alteración en los mecanismos de apoptosis. Los estudios preliminares realizados no han demostrado si estas alteraciones se producen a nivel genómico (mutación, delección, amplificación), a nivel transcripcional o a nivel de la expresión de las proteínas implicadas en la apoptosis. El estudio de la existencia o no de estas alteraciones y su caracterización pueden ayudar, sin duda, a definir mejor la patogenia

y a sugerir implicaciones terapéuticas que podrían tener la restauración del control de la apoptosis.

Sería interesante llegar a profundizar más el estudio ya que el principal problema radica en su inespecificidad de acción, que da lugar a numerosos efectos no deseados al afectar a diferentes tipos de células. Esperemos que en investigaciones futuras se tenga una mejor noción de que es lo que provoca en sí este proceso.

## CONCLUSIONES.

En conclusión podemos decir que el sistema inmune celular de los niños recién nacidos prematuramente es más propenso a todo tipo de infecciones a comparación de los recién nacidos a término.

Como lo mencionamos anteriormente los leucocitos son una parte fundamental de protección para el sistema inmune, pero de acuerdo al estudio realizado sabemos que estas células están en constante proceso de apoptosis debido a una serie de alteraciones que ocurre en ellas, ya que al momento de entrar en el ciclo celular esta se queda detenida en la fase G1 por lo que la célula queda imposibilitada para prepararse y dividir su ADN, dado a que la célula no está apta para seguir por el ciclo celular se desencadena una señalización o alteración de la proteína Bcl-2 la cual es considerada como un indicador de que entro en la fase G1 pero que no puede pasar a otra fase ya que p53 también presenta una sobre expresión la cual indica un daño en el ADN por lo que la cascada de señalización sigue con los distintos tipos de caspasas, pero la más relevante se da en la activación de caspasa-3 ya su incremento de actividad hace que se degrade el citoesqueleto, su estructura y componentes de manera coordinada durante el fenómeno de apoptosis.

Toda esta actividad y presencia de las proteínas de p53, Bcl-2 y caspasa-3 fue evidente en los Western Blot empleados y por el kit de actividad de caspasa-3, los cuales nos muestran una mayor presencia en las muestras de los niños que nacieron prematuramente a comparación con la presencia que se da en las muestras de los niños que nacieron a tiempo.

La actividad y presencia de estas proteínas, indican que en lugar de frenar la muerte celular ocurre un desequilibrio el cual se ve reflejado en que la célula no llega a completar el ciclo celular ni continuar su proliferación ya que se frena este proceso. Donde la célula es abortada por no cumplir con su funciones ni características específicas, por lo que definitivamente es abortada para dar lugar a que ocurra muerte celular la cual podemos comprobar por medio de la fragmentación del ADN que es una

característica fundamental durante este proceso, así como el incremento de la actividad y sobreexpresión que presentan las proteínas p53, Bcl-2 y caspasa-3 los cuales nos indican que efectivamente las células están en constante apoptosis.

Es patente el hecho de que los leucocitos que provienen de niños prematuros presentan un fenómeno de apoptosis. Al momento no podemos afirmar cual puede ser la causa por la que los leucocitos presentan este fenómeno ya que pueden ser muy complejos los mecanismos que pueden activarse durante éste tipo de procesos.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Avery ME, Taeusch HW. Enfermedades del Recién Nacido. 5ª ed. Editorial Interamericana, Philadelphia, Londres: WB Saunders 1984.p 88-97.
2. Casillas CM. Prematuridad, Concepto y factores predisponentes. En Medicina materno fetal; IV Curso Intensivo de Formación Continua. Ediciones ERGON S.A. Madrid,1996.p135-140
3. Roze JC, Breaart G. Care of very premature infants: looking to the future. Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2004; Nov14;117Suppl1:p 29-32
4. Goldeberg RI, Huddleston JF, Nelson KG. Apgar scores and umbilical artery pH in preterm newborn infants. Am J Obstet Gynecol 1984;149:p651-654
5. Agüero O, Navarro L. Prematuros de muy bajo peso. Rev Obstet Ginecol Venez 1988;48:p197-199.
6. Sistema Nacional de Servicios de Salud de Chile (2008) Disponible en: <http://www.prematuros.cl/>
7. Faneite P, Álvarez N, Repilloza M. Factores epidemiológicos del parto prematuro. Rev Obstet Ginecol Venez,1995;55:p71-76
8. Behrman R, Kliegman R. Tratado de pediatría. 15 ed. Editorial McGraw-Hill interamericana.México,1997;1:p.1,3,27,541,553-570,573-579,583,599,600,608.
9. Page G. Dworkin P. The Role of Parents in the Detection of developmental and Behavioral problems. Pediatrics,1995, 5;p829-836.
10. Flores H. Follow-up Care of High Risk Infants. Pediatrics,2004;114:p1377-97
11. Ramírez N. Josue D. Sistema Inmunológico. Ipales, Colombia,2008:p1-6
12. Garavito E. Apoptosis: Autoinmunidad y enfermedad autoinmune. Rev Colomb Reumatol, 2005;13;p171-178.
13. Gutierrez J, Breve descripción de los mecanismos moleculares involucrados en la regeneración hepática. Med Int Mex 2007;23(5):p436-440
14. Lluís Vives Joan, Lluís Aguilar Josep. Manual de Técnicas del laboratorio en Hematología. 2ª Ed .Editorial Masson, 2001. Pag:1,18,42,78,82.
15. Rodrigo V, Escalona JR, Ciclo Celular. Dep Embr UNAM, Fac Med.2002.p2-9
16. Albert B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Robert K, Walter P. Molecular Biology of the Cell. 4ª Ed. Garland Science, NY:2002:p1464-80

17. Ellis RE, Yuan J, Horvitz HR. Mechanisms and functions of cell death. *Annu Rev Cell Biol*,1991;7:p663-698
18. Lodish H. *Biología Celular y molecular*. Med Pana. Ed Madrid;2006.p513-634
19. Paniagua R, Nistal M, Sesma P, Alvarez M, Fraile B, Anadón R, Sáez FJ, Paz M.*Biología Celular*, McGraw- Hill, Ed Interamericana, España;1999 p309-314.
20. Krammer PH, Behrman I, Daniel P, Dhein J.Regulación of apoptosis in the immune system. *Curr opin. Immunol* 1994;6: p279-86.
21. Murray AW, Hunt T. *The cell cycle: an introduction*. Oxford University Press, NY; 1993:p1-65
22. Donjerkovic D, Scout DW. Regulation of G1 phase of the mammalian cell cycle. *Cell Reseach*,2000;10(1):p1-16
23. El-Deiry WS, Harper JW, OConnor PM; Velculescu VE, Canman CE, Jackman JA, Pietenpol JA, Burrell M, Hill DE, Wang Y, Wiman KG, Mercer WE, Kastan MB, Kohn KW, Elledge SJ, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1/CIP1 Is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res*,1994;54:p1169-1174
24. Goodrich DW, Wang N, Qian Y, Lee E, Lee W. The retinoblastoma gene product regulates progression through the G1 phase of the cell cycle.*Cell*,1991;67(2):p 293-302
25. Bortner CD, Cidlowski JA. Cellular mechanisms for the repression of apoptosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*,2002;42:p259-281
26. Gómez EO, Zentella A. Apoptosis y muerte celular programada. *Dep Bio, Inst Fisiol Cel, UNAM México*;7(3):p105-114
27. Ramírez R, Carracedo J, Moreno C, Guerra F. Apoptosis y enfermedad. *Alergol Inmunol Clin* 1999;14(6):p367-374
28. Dubin M, Stoppani AOM. Muerte celular programada y apoptosis. *Medi* 2000;60: p375-386
29. Danial NN, Korsmeyer SJ.Cell death: critical control points. *Cell* 2004;116(2):p 205-19
30. Buja LM, Eigenbrodt ML, Eingenbrodt EH. Apoptosis and Necrosis Basic types and Mechanisms of Cell Death. *Arch Pathol Lab Med* 1993;117:p1208-14

31. Amarante GP, Green DR. The regulation of Apoptotic Cell Death. *Braz J Med Biol Res.*1999;32:p1053-1061
32. Jordón J. Apoptosis: Muerte Celular Programada. *Offarm* 2003; 22 (6): p 100-110
33. Strasser A, O'Connor L. Apoptosis signaling. *Annu Rev Biochem*2000;69:p217-45
34. Leyton L, Quest AF. Supramolecular complex formation in cell signaling and disease: an update on a recurrent theme in cell life and death. *Biol Res* 2004; 37(1):p29-43
35. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell* 2004; 116(2):p205-19.
36. Vies DJ, Sorenson CM, Shutter JR, Korsmeyer SJ. BCL-2 deficient mice demonstrate fulminant lymphoid apoptosis, polycystic kidneys, and hypopigmented hair *Cell. Dep Med Patho*1993; 75: p229-240.
37. Vander MG, Thompson CB. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis?. *Nat Cell Biol* 1999;1(8):p209-216.
38. Tanuja T, Cols. Expresion of Bcl-2 and Bax In. Chewing Tobacco-Induced Oral Cancers and Oral. *Path Oncol Res* 2002;8(2): p109-14
39. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature* 2000;407(6805):p 770-6
40. Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS, Copeled NG, Jenkins NA, Garber J. The human mutator gene homolog MSH2 and its asociacion whit hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993;75:p1027-1038
41. Sherr CJ. Mammalian G1 cyclins. *Cell* 1993;73: p1059-1065.
42. Hisao O, Yoshihiko M, Shinji O, Yoshihisa S, Yuji Y, Keizo S. Growth pattern and p53 overexpression in patients with early gastric cáncer. *Cáncer* 1995;75:p1454-59
43. Gareia V. Gonzalez MA, Bascones A. Bases moleculares del Cancer oral. *Av Odontoestomatol* 2005; 21-6:p287-295
44. Manfredi II, p53 and apoptosis: it's not just in the nucleus anymore. *Molecular Cell* 2003;11:p552-554
45. Vera FJ. Navarro M. Sobreexpresión del gen supresor p53 en el cáncer oral. *Med Oral* 1997;2:p283-96.



46. Tolbert D, Lu X, Yin C, Tantama M, Van T. P19(ARF) is dispensable for oncogenic stress-induced p53- mediated apoptosis and tumor suppression in vivo. *Mol Cell Biol*. 2000;22:p370-7
47. Vaux DL. Caspases and apoptosis-biology and terminology. *Cell Death Differentiation* 1999;6:p593-494
48. Salvesen S. Caspases opening the boxes and interpreting the arrows. *Cell Death and Differentiation* 2002;13:p1017-1026
49. Leist M, Jaattela M. Four deaths and fancial: from caspases to alternative mechanisms .*Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:p589-598
50. Li H, Bergeron L, Cryns V, Pasternack M, Zhu H, Shi L, Greenberg A, Yuan J. Activation of Caspase-2 in Apoptosis. *J Bio Chem* 1997;272: p21010-21017.
51. Cohen GM. Caspases: The executioners of apoptosis. Ed. *Biochem J* 1997;326: p1-16.
52. Srinivasula S, Ahmad M, MacFarlene M, Luo Z, Huang Z, Fernandes T, Alnemri E. Generation of Constitutively Active Recombinant Caspases-3 and -6 by Rearrangement of their subunitis. *J Bio Chem* 1998;273:p10107-10111
53. Apo red: Red Española De apoptosis. Disponible en : <http://apored.bq.uam.es/divulgacion/divulgacion05.html>
54. Separacion de leucocitos. Disponible en: [http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General\\_Information/1/insert\\_es\\_1119.Par.0001.File.tmp/insert\\_es\\_1119.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/General_Information/1/insert_es_1119.Par.0001.File.tmp/insert_es_1119.pdf)
55. Westerm Blot. Disponible en: <http://www.ub.es/biocel/wbc/tecnicas/westernblot.htm>
56. Montoya Y, León C, Nolasco O, Talledo M, Padilla C, Velarde M. Guía de Práctica del Curso Teórico-Práctico: Western Blot y ELISA. *INS* 2003;16: p1-59
57. Freifelder D. Técnicas de Bioquímica y Biología Molecular. Ed Reverte. Barcelona,1991;9 p234-260
58. Skoog D, West D, Holler F. Química Analítica, 6ª ed. Ed. Mc Graw Hill, Interamericana Mexico.1995.p773-778
59. Stryer L. Bioquímica, 4ª ed. Ed Reverté. Barcelona.1995.p46-48,121

60. Mathews CK, Van KE. Bioquímica. 2<sup>a</sup> ed. Ed McGraw- Hill, Interamericana Mexico,1998.p56-9,230-231
61. Menter P. Acrylamide polymerization-a practical approach. US/EG Rev E Bulletin, Bio-Rad Lab2000;1156:p1-9
62. Electrophoresis lecture notes. Disponible en:  
<http://www.tulane.edu/~wiser/methods/handouts/elect.PDF>.
63. Polyacrilamide gel electrophoresis. Disponible en:  
[http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mm/page.html#sds\\_bact](http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mm/page.html#sds_bact)
64. Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Biología molecular de la célula. 3<sup>a</sup> ed. Ed Omega, Argentina.1996.p179-84,317-8.
65. Alberts B, Bray D, Johnson S, Lewis J, Raff M,Roberts K, Watson, JD. Introducción a la Biología celular, 4<sup>a</sup> ed. Ed Omega, Argentina. 1999. p.165,320
66. Caspasa. Disponible en:  
[https://calbiochem.com/is-bin/INTERSHOP.enfinity/WFS/Merck-US-Site/en\\_CA/-/USD/ViewProductDetail-UserProtocolAttributes?ProductUUID=B\\_Ob.s1O9RcAAAEi5NRCeVDS&PortalCatalogUUID=ywGb.s1LAyMAAAEWzdUfVhTI&SelectedDocumentType=UserProtocolAttributes](https://calbiochem.com/is-bin/INTERSHOP.enfinity/WFS/Merck-US-Site/en_CA/-/USD/ViewProductDetail-UserProtocolAttributes?ProductUUID=B_Ob.s1O9RcAAAEi5NRCeVDS&PortalCatalogUUID=ywGb.s1LAyMAAAEWzdUfVhTI&SelectedDocumentType=UserProtocolAttributes)
67. Caspasa. Disponible en :<http://www.slideshare.net/utplcbcm1/implementacin-de-dos-biomarcadores-para-la-determinacin-de-actividad-apoptica-en-el-cbcm-2003259>
68. Andrews AT. Electrophoresis of nucleic acids. In: Essential Molecular Biology. A Practical Approach 1991;1:p89-124
69. Sambrook J. Fritsch EF, Maniatis T. Gel electrophoresis DNA and molecular cloning. In: Molecular cloning a laboratory manual. 2<sup>a</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press NY1989.p309-316
70. DNA Electrophoresis. Disponible en:  
[http://www.protocol-online.net/molbio/DNA/dna\\_electrophoresis.htm](http://www.protocol-online.net/molbio/DNA/dna_electrophoresis.htm).
71. Berg G, Garfin D. Protein and nucleic acid blotting and inmunobiochemical detection. Biotechniques 1985;3:p276
72. Carson DA, Rebeiro JM. Apoptosis and disease. Lancet 1993; 341:1251-1254

73. Kaminker P, Armando R. Síndrome de Down. Estudios genéticos y función del pediatra. Arch. Argent.pediatr, 2008;106(4):p334-340.
74. Crombet Ramos O, Svarch Guerchicoff E. Alteraciones Hematológicas en el síndrome de Down. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter 1998; 14(2):p80-86.
75. Rubial Ares B, Belmonte L, Baré P, Bracco M. Apoptosis e infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). Medicina Buenos Aires 2000;60(2):p17-20.
76. Valverde D. Enfermedad trofoblástica: clasificación histopatológica y características inmunohistoquímicas con los marcadores p53, b-hCG, PLAP y vimentina. Patología 2009; 47(2):p96-102.
77. Cunningham G, MacDonald P. Enfermedades y anomalías de la placenta. Obstetrician Williams. Ed Masson, USA 1996.
78. Betancourt M, Ortiz R. Efectos de la desnutrición severa en el nivel citogenético. Ciencia 1991; 42: p 367-373.
79. Cuervo Escobar S, Umaña A, Vargas C, Mejía W, Sánchez M. La desnutrición proteica y la infección regulan la expresión de quimioquina CXCR4 en subpoblaciones linfoides de ratón. Bioquímica 2009; 33(128):p 313-322.
80. Tarazona A, Oliviera M, Lenis Y. Rol de la mitocondria y el estrés oxidativo en el bloqueo del desarrollo de embriones bovinos producidos in vitro. Arch Med Vet 2010; 42:p125-133.