

19
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

Facultad de Química

UTILIDAD DE LAS SALES DE TETRAZOLIUM
PARA ESTUDIAR LA PROLIFERACION DE LIN-
FOCITOS EN RATONES DESGASTADOS



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

Laura Cecilia Bonifaz Alfonso

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

INDICE

CAPITULOS	PAGINA
1. INTRODUCCION.	1
2. ANTECEDENTES.	5
2.1. Enfermedades desgastantes.	5
2.2. Inmunidad del animal desgastado.	9
2.3. Inmunidad celular.	12
2.3.1. Proliferación de células T <i>in vitro</i> .	15
2.3.2. Factores que modulan la proliferación de las células T.	17
2.3.3. Proliferación de linfocitos T y enfermedad.	22
2.4. Reducción del MTT.	27
3. OBJETIVOS E HIPOTESIS.	31
4. DISEÑO DEL EXPERIMENTO.	33
4.1. Estandarización de la prueba del MTT.	33
4.2. Comparación entre las pruebas de la reducción del MTT y la incorporación nuclear de [³ H]-timidina.	34
4.3. Inducción de la inmunodeficiencia.	34
4.4. Estudio de la respuesta inmunitaria celular en los ratones inmunodeficientes.	35
5. MATERIAL Y METODOS.	36
5.1. Animales.	36
5.2. Staphylococcus aureus.	36
5.3. Inducción de la inmunodeficiencia.	36
5.4. Células y medio de cultivo.	37
5.5. Cultivo de células y estimulación con el mitógeno.	38
5.6. Reducción del MTT.	40
5.7. Incorporación nuclear de [³ H]-timidina.	40
5.8. Estandarización de la técnica del MTT.	40
5.9. Correlación entre la técnica del MTT y la incorporación de [³ H]-timidina.	41
5.10. Estudio de la proliferación celular en los diferentes grupos de ratones.	41
5.11. Análisis estadístico.	42

6. RESULTADOS.	43
6.1. Estandarización de la técnica de reducción del MTT.	43
6.2. Correlación entre MTT y timidina tritiada.	50
6.3. Enfermedad desgastante de los ratones.	53
6.4. Absorbancia delta y respuesta linfoproliferativa.	54
6.5. Reducción del MTT en condiciones basales.	58
6.6. Evolución de la absorbancia delta.	63
6.7. Evolución de la absorbancia basal.	67
6.8. Reducción del MTT por los animales control.	70
7. DISCUSION.	73
8. CONCLUSIONES.	92
9. RESUMEN.	95
10. APENDICE I.	97
12. BIBLIOGRAFIA.	101

TABLA DE ABREVIATURAS

PHA	Fitoheماغلوتینینا.
Con-A	Concanavalina A.
PWM	Pokeweed mitogen o fitolaca americana.
CMI	Inmunidad Celular.
cpm	Cuentas por minuto.
GvH	Injerto contra huésped.
DTH	Hipersensibilidad de tipo retardado.
SIDA	Síndrome de la inmunodeficiencia adquirida.
IP	Intraperitoneal.
ECA	Antígeno común de las enterobacterias.
TNF	Factor necrosante de tumores.
MTT	Dimetil Tiazol Tretazolium.
T _h	Linfocito T colaborador.
T _s	Linfocito T supresor.
DNA	Acido desoxiribonucleico.
RNA	Acido ribonucleico.
RNAM	Acido ribonucleico mensajero.
IL-1	Interleucina 1.
IL-2	Interleucina 2.
PGE	Prostaglandina E.
TCGF	Factor de crecimiento de las células T.
CFS	Factor estimulador de colonias.
LPS	Lipopolisacáridos.
HIV	Virus de la inmunodeficiencia humana.
ELISA	Ensayo inmuno enzimático.
BSS	Solución salina balanceada.
SSI	Solución salina isotónica.
PBS	Solución balanceada de fosfatos.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
POP	2,5 Difenil oxazol.
POPOP	[P.bis (2-5-fenil oxazol)]-benceno.
PAF	Factor activador de plaquetas.
CS	Quinto componente del sistema complemento.

CAPITULO 1. INTRODUCCION.

El progreso científico y tecnológico de las últimas décadas ha contribuido decisivamente al desarrollo de la inmunología. Hoy en día, esta disciplina ya es independiente de la especialidad que le dió origen, la microbiología, y ha establecido nuevas interacciones con otras áreas importantes como la genética, la bioquímica y la medicina.

Dos hechos caracterizan el desarrollo acelerado de la inmunología. El primero consiste en un aumento considerable del conocimiento sobre las bases moleculares que tiene la especificidad de la respuesta del sistema inmunitario. El segundo son las aplicaciones de estos nuevos conocimientos, ya que han resultado sumamente útiles para resolver diversos problemas de salud y para mejorar la calidad de la vida de numerosos pacientes. Se pueden mencionar, por ejemplo, la prevención de enfermedades infecciosas mediante vacunas y la disminución de los rechazos de los órganos transplantados con la ayuda de los tratamientos inmunosupresores.

No obstante, actualmente existe una gran cantidad de enfermedades que no tienen un tratamiento específico y efectivo. Todavía existen enfermedades que se pueden denominar incurables. En algunos de estos casos los enfermos tienen, al menos, la

posibilidad de recibir tratamientos que, al estimular o suprimir la respuesta del sistema inmunitario, pueden reducir significativamente la incidencia de una larga serie de complicaciones y, además, aumentar las expectativas de vida a pesar de que la enfermedad primaria no puede ser eliminada.

Sin embargo, al aumentar los años de sobrevivencia de las personas con enfermedades incurables se ha observado que entre ellos ha aumentado la frecuencia de infecciones causadas por microorganismos oportunistas y, paralelamente, la instalación de un deterioro físico progresivo que conduce a la caquexia y que ha sido denominado "desgaste". En todos estos casos se combinan una serie de trastornos del metabolismo, que no permiten la utilización adecuada de la energía de los alimentos, con diversos grados de alguna deficiencia del sistema inmunitario y con las consiguientes infecciones recurrentes asociadas.

Las inmunodeficiencias adquiridas y la caquexia son dos problemas de salud actuales que frecuentemente se encuentran asociados y que han generado una gran cantidad de trabajos de investigación. Una parte importante de ellos está dirigida al estudio de los mecanismos inmunológicos dañados y al ensayo de diversos procedimientos profilácticos o terapéuticos.

En el Laboratorio de Inmunobiología del Departamento de Biología de la Facultad de Química, UNAM, se ha desarrollado el

modelo experimental de una enfermedad desgastante de evolución transitoria. Esta enfermedad experimental se puede inducir en ratones de un mes de edad cuando, durante sus cuatro primeras semanas de vida, se les inyectan bacterias muertas por vía intraperitoneal. A causa de su curso transitorio y por la edad de los animales utilizados, la inmunodeficiencia inducida no resulta comparable a la que se observa en los pacientes con enfermedades incurables. Más bien, después de las inyecciones con bacterias muertas, los trastornos inmunológicos de los ratones y sus elevadas tasas de mortalidad parecen reproducir las complicaciones inmunológicas y el deterioro físico secundario a las infecciones graves, particularmente las que se observan en los niños, recién nacidos y lactantes. Esta situación le añade una importancia particular al modelo animal, ya que la mortalidad infantil más elevada se observa durante la edad perinatal o la lactancia y resulta una consecuencia de infecciones, agudas o recurrentes.

En la literatura consultada respecto a esta enfermedad desgastante experimental, solo se han encontrado muy pocas referencias sobre el estado de la inmunidad celular de los animales. Además, en las pocas observaciones que existen publicadas, llama la atención la aparente paradoja de los animales que tienen un timo atrófico y que, sin embargo, conservan una buena respuesta de los linfocitos T para rechazar aloinjertos o inducir una reacción injerto contra huesped.

La primera parte del presente trabajo trata sobre la estandarización de una técnica colorimétrica para medir la respuesta inmunitaria que depende de los linfocitos T. En su segunda parte, esa técnica se aplica para el estudio de la inmunidad celular en animales recién nacidos que han sido desgastados mediante la inyección intraperitoneal de bacterias muertas.

CAPITULO 2. ANTECEDENTES.

2.1. ENFERMEDADES DESGASTANTES.

El término "desgaste" comenzó a utilizarse aproximadamente a mediados del presente siglo para referirse a enfermedades crónicas y/o degenerativas caracterizadas por una pérdida de peso progresiva que terminaba en caquexia (1). Una buena parte de estos casos aparecieron como una consecuencia del descubrimiento de los antibióticos, ya que el tratamiento de las infecciones recurrentes contribuyó a prolongar la vida de numerosos pacientes con enfermedades incurables. De este modo, el control de las infecciones permitió que algunas personas sobrevivieran hasta alcanzar etapas muy avanzadas de enfermedades que por lo general terminaban con un deterioro físico muy acentuado. En el pasado, los procesos "desgastantes" más conocidos estaban representados por algunas enfermedades degenerativas. Actualmente, el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) constituye el principal ejemplo de un "desgaste" físico e inmunológico (2).

Las primeras observaciones que relacionaron el desgaste corporal con alguna deficiencia inmunológica fueron algunos trabajos experimentales realizados sobre animales de laboratorio, al final de la década de los años 50 y al comienzo de la década de

los 60. En esa época se describieron los primeros síndromes de "encanijamiento" en ratones recién nacidos a los cuales se les provocaba una reacción injerto contra huésped (GVH) mediante el trasplante intraperitoneal de linfocitos isólogos (3). Mas adelante, Miller (4) observó las mismas manifestaciones del desgaste después de la extirpación del timo en ratones recién nacidos.

Algunos autores (5) encontraron similitudes entre el cuadro clínico de los ratones recién nacidos que habían sido timectomizados o que desarrollaban una reacción GVH después del injerto intraperitoneal (IP) de linfocitos. En los dos casos los animales estaban desnutridos e inmunodeficientes.

Inicialmente, en 1962, Simonsen (6) propuso que se debería denominar encanijamiento (runting) al deterioro físico e inmunológico de los animales recién nacidos, cuando eran timectomizados o cuando se les provocaba una reacción GVH. Este encanijamiento implicaba un retardo en el crecimiento, un deterioro inmunológico que no pudo ser caracterizado en aquellos años y una emaciación progresiva de los animales jóvenes. Según Simonsen (6), el término desgaste (wasting) se debía reservar para otras situaciones en las cuales los animales, adultos, presentaban una pérdida de peso sin retrasar su crecimiento.

En aquellos años se propusieron diferentes hipótesis para explicar los mecanismos involucrados en el daño tisular de los

animales encanijados o desgastados. Las teorías más discutidas fueron las que relacionaban la aparición del síndrome con las infecciones adquiridas durante los procedimientos de inducción (timectomía y la inyección IP de linfocitos). Otros autores (7) opinaron que las infecciones estaban causadas por microorganismos oportunistas y que el desgaste era una consecuencia de la susceptibilidad del animal a las endotoxinas de las bacterias Gram negativas del tubo digestivo.

Varios años mas tarde se informó que otro síndrome, similar al encanijamiento, podía ser provocado en ratones recién nacidos cuando se les inyectaba con bacterias muertas o con endotoxinas (8). Una vez más, al discutir la etiopatogenia de este nuevo síndrome se propuso (9) que las infecciones por microorganismos oportunistas eran las responsable del deterioro físico e inmunológico de los animales. Este punto de vista estuvo apoyado por las observaciones en favor de que el tratamiento con antibióticos (10) o la ausencia de microorganismos en el tubo digestivo (11) impedían la aparición de las enfermedades desgastantes experimentales. Observaciones más recientes (12) nos han revelado que, en los animales desgastados mediante inyecciones de estafilococos muertos, las bacterias Gram-negativas del intestino se translocalizan hasta los ganglios linfáticos mesentéricos.

En el Laboratorio de Inmunobiología de la Facultad de Química, el mismo síndrome ha podido ser reproducido en ratones

recién nacidos inyectados IP con un hapteno relativamente inocuo que se encuentra presente en casi todas las bacterias Gram negativas (13). Otros autores informan que ellos han provocado la aparición del desgaste en ratones a los cuales se les extirpan algunas glándulas de secreción interna (14).

En los últimos años se ha desarrollado un considerable interés por la caquexia y el desgaste que aparece en las etapas terminales de las enfermedades crónicas (15). Algunos experimentos han demostrado que la deficiencia de zinc en la dieta de ratones les provoca un estado de inanición similar al desgaste (16). Otros trabajos han comprobado que la inyección de la citocina conocida como caquectina o factor necrosante de tumores (TNF) también puede inducir el desgaste de los animales (17). Finalmente, varios trabajos más han encontrado que, al menos en el caso de los ratones cancerosos, estos animales producen una serie de factores lipolíticos cuya concentración en el suero se correlaciona con su pérdida de peso progresiva (15).

No obstante los objetivos de los trabajos anteriores, el desgaste físico no resulta exclusivo de personas y animales adultos con cáncer y otras enfermedades crónicas. Los niños también se desgastan y, mientras menor sea su edad, lo hacen mucho más rápidamente que los adultos. En muchas ocasiones, una simple infección grave (sarampión o septicemia, por ejemplo) puede provocar un considerable deterioro físico e inmunológico, así como un retraso significativo en el desarrollo corporal. La imagen

del timo hipoplásico resulta un común denominador para todos los niños que mueren en estas condiciones. La susceptibilidad a las infecciones y su presentación sucesiva en una forma recurrente, así como la pérdida de peso que progresivamente puede llegar al desgaste (18), son complicaciones temibles porque tienen cifras de mortalidad muy altas.

2.2. INMUNIDAD DEL ANIMAL DESGASTADO.

El estudio inmunológico del síndrome del desgaste generalmente significa enfrentarse a una serie de problemas. Uno de ellos consiste en que, inicialmente, las enfermedades experimentales desgastantes nunca llegaron a ser caracterizadas completamente desde un punto de vista molecular. Por otra parte, como el desgaste podía ser inducido mediante la aplicación de varios procedimientos (3, 4, 8, 13, 14, 16 y 17), quedó la impresión de que cada modelo podía tener algunas alteraciones inmunológicas particulares y otras comunes. Así por ejemplo, los animales recién nacidos que habían sido timectomizados (4), que presentaban una reacción GVH (3) o que tenían el síndrome del desgaste inducido por vacunas estériles (8), se encontraban inmunocomprometidos en una forma diferente, aunque todos ellos manifestaran los mismos signos y síntomas generales de la enfermedad.

Otro problema que aumentaba la variabilidad de las alteraciones inmunológicas del animal desgastado era el sinergismo que generalmente se establecía entre el desgaste físico de un organismo y la competencia inmunológica del mismo. Todos los animales desgastados estaban anoréxicos y gravemente desnutridos, alcanzando un peso corporal que era aproximadamente un 40% del de los animales sanos. Fue evidente entonces que, así como el desgaste o la caquexia podían repercutir sobre la inmunocompetencia de un organismo, así mismo algunas deficiencias inmunológicas y las infecciones recurrentes asociadas también podían conducir al deterioro físico del cuerpo. La pérdida de peso, la inmunodeficiencia y la translocalización de enterobacterias aparecían como las causas, pero también como las consecuencias, del desgaste inmunológico progresivo que se observaba en personas enfermas y en algunos animales de laboratorio sometidos a diferentes condiciones experimentales.

Era y continúa siendo evidente que no se puede obtener un perfil inmunológico característico que sea común para todas las diferentes enfermedades o condiciones experimentales desgastantes.

El modelo que se estudió en la presente tesis es el desgaste de ratones recién nacidos que son inyectados intraperitonealmente con estafilococos muertos, según una modificación (19) al procedimiento propuesto inicialmente (8). En estos animales se presenta una serie de alteraciones macroscópicas en los órganos linfoides primarios y secundarios (atrofia del timo, de la médula ósea y de los ganglios linfáticos, así como esplenomegalia) que se

acompañan de una profunda depresión en la producción de anticuerpos (19) y una franca disminución de la tolerancia hacia los antígenos administrados por vía oral (20), sin que se modifique la reactividad de los linfocitos para rechazar transplantes (8) o inducir una reacción injerto-contra-huésped (21).

A pesar de que en este modelo experimental se presenta constantemente una atrofia del timo y de que ésta ha sido considerada un aspecto fundamental del desgaste (14), los estudios realizados hasta ahora no demuestran ninguna alteración en la respuesta dependiente de los linfocitos T (8, 21). Esta es la principal razón por la cual estamos interesados en conocer la capacidad que tienen los linfocitos T de los animales desgastados para desarrollar una respuesta proliferativa cuando son estimulados con mitógenos.

La otra razón proviene del significado biológico de la función de los linfocitos T. La respuesta de estas células está íntimamente involucrada con la actividad de "mecanismo defensivo" que tiene la respuesta inmunitaria. Generalmente, una disfunción o una depresión de la función de células T se relaciona con un aumento en la susceptibilidad a ciertas infecciones por microorganismos oportunistas. Y, como ya se ha mencionado en párrafos anteriores, las infecciones recurrentes son una de las principales características de los animales desgastados y han sido relacionadas directamente con la etiología del

deterioro físico e inmunológico de los mismos (12). Otra razón para justificar el estudio de los linfocitos T se encuentra en algunos resultados obtenidos recientemente (22), los cuales demuestran la utilidad del zinc para atenuar el daño inmunológico del desgaste. Este elemento traza que puede actuar como un inmunoestimulante es también un cofactor indispensable para la proliferación de los linfocitos T en el timo y para la expresión de la actividad biológica de la hormona timulina.

2.3. INMUNIDAD CELULAR.

La inmunidad mediada por células (CMI) es un término utilizado para describir varias reacciones focalizadas, generalmente dirigidas contra microorganismos patógenos de localización intracelular, que dependen de linfocitos T, de macrófagos y de varios productos solubles liberados por estas dos poblaciones de células, en ausencia de anticuerpos (23). La clasificación de inmunidad humoral y celular resulta un poco artificial porque la respuesta del sistema inmunitario contra cualquier antígeno involucra simultáneamente los linfocitos T y B. Por otra parte, cualesquiera de las dos respuestas, T o B, tiene un componente celular y otro humoral formado por las moléculas solubles que se liberan de las dos poblaciones de células linfoides o de varias células accesorias. En los animales de laboratorio, la timectomía neonatal detiene la formación de linfocitos T y provoca la aparición de una deficiencia de la inmunidad celular que tiene características inmunológicas propias

y que no compromete la síntesis de los anticuerpos. En las aves, la bursectomía neonatal provoca la aparición de otra inmunodeficiencia diferente, de los linfocitos B y compromete la producción de anticuerpos sin afectar la inmunidad celular.

Para evaluar la inmunidad celular generalmente se estudian algunas funciones que dependen de los linfocitos T. Existen diferentes procedimientos de laboratorio que permiten medir distintas respuestas de los linfocitos T cultivados *in vitro*. Por otra parte, la inyección intradérmica de algunos antígenos permite obtener reacciones de hipersensibilidad cutánea de aparición retardada (DTH) que también resultan útiles para evaluar la competencia de los linfocitos derivados del timo (24). Otra forma de estudiar la CMI, en animales de laboratorio, consiste en la inyección de linfocitos T en animales receptores inmunosuprimidos, inmaduros o inmunoincompetentes, de tal modo que aparecen las manifestaciones de una reacción injerto-contra-huésped (GVH). La medida de estas reacciones (índice esplénico o índice poplíteo) también resulta un buen reflejo de la competencia de los linfocitos T injertados.

Entre las pruebas realizadas *in vitro* para la evaluación de la CMI se encuentran los análisis de la proliferación de los linfocitos estimulados con antígenos o mitógenos (25), los análisis de la producción de citocinas (26) y los análisis de la citotoxicidad mediada por linfocitos T (27).

Existen varias diferencias entre los resultados obtenidos de las pruebas realizadas in vivo e in vitro. La principal diferencia entre el análisis de la proliferación celular in vitro y la respuesta de hipersensibilidad tardía intradérmica (DTH) o la reacción GvH radica en que dependen de diferentes subpoblaciones de linfocitos T. En las reacciones in vivo DTH y GvH, solamente un subtipo de células T, denominado T_{H1} es el responsable de la respuesta (24). En cambio, en las pruebas que estimulan la proliferación celular in vitro, todas las células T con capacidad de unirse al antígeno o al mitógeno son capaces de aumentar su metabolismo y su tasa de multiplicaciones cuando se encuentran en las condiciones propicias para hacerlo (28).

Actualmente, con el desarrollo de la inmunología molecular se han propuesto nuevos métodos para la evaluación de la CMI por medio del estudio de la proliferación in vitro de subpoblaciones de linfocitos T estimuladas específicamente. Los métodos más utilizados incluyen el uso de anticuerpos monoclonales específicos para una clona determinada de células T y la utilización de antígenos altamente purificados, dirigidos contra una clona con receptores específicos (29, 30). Sin embargo, el uso de lectinas, como mitógenos inespecíficos para la evaluación de la proliferación de los linfocitos T, sigue siendo un método que proporciona información importante sobre la CMI en diferentes modelos experimentales y en humanos (25, 31).

2.3.2. PROLIFERACION DE CELULAS T IN VITRO.

En los animales vertebrados, la respuesta de los linfocitos T estimulados por antígenos se caracteriza por un ciclo de crecimiento y división celular conocido como transformación linfocítica o linfoproliferación. Este fenómeno también puede ser observado *in vitro*, en un cultivo de linfocitos T, mediante la adición al medio de antígenos específicos o sustancias con actividad mitogénica (28).

Algunas proteínas llamadas lectinas, que son extraídas de diversas plantas, tienen la capacidad de unirse específicamente a varios carbohidratos que se encuentran en la superficie de la membrana externa de diferentes células. Al unirse a los carbohidratos de la membrana celular, algunas lectinas son capaces de aglutinar eritrocitos y varios otros tipos de células. Existen lectinas que, cuando son añadidas a cultivos de linfocitos, estimulan el crecimiento, la diferenciación y la proliferación de estas células, es decir actúan como estimulantes de la mitosis y, por esta razón, han sido denominadas "mitógenos" (28, 32).

El efecto mitogénico de estas lectinas puede ser medido por conteo de los linfocitos que aumentan de tamaño, que se transforman en blastos o que se encuentran en alguna de las fases mitóticas en las cuales es posible observar los cromosomas (28). Otros procedimientos consisten en determinar el incremento en la incorporación de timimidina o uridina marcada en el DNA o en el

RNA respectivamente (33) y, también, en medir la tasa de incorporación del aminoácido leucina, marcado radiactivamente, en las proteínas que la célula sintetiza. Mosman (34) fue el primero en introducir el uso de un método colorimétrico, la reducción de sales de tetrazolium (MTT), para medir el efecto de la estimulación mitogénica en células cultivadas.

Los linfocitos cultivados que son estimulados con mitógenos manifiestan las mismas características funcionales que los linfocitos estimulados con antígenos (32). La diferencia entre estas dos situaciones radica en el número y la especificidad de los receptores en las clonas de linfocitos activados. Mientras un antígeno activa solo aquellas clonas de células que llevan el receptor que puede reconocer sus epitopes, las lectinas, en cambio, activan muchas clonas que tienen diferentes receptores con distintas especificidad hacia varios antígenos. Por esta razón los mitógenos se denominan activadores policlonales. Sin embargo, los diferentes mitógenos no activan la totalidad de las poblaciones de linfocitos que se encuentran en el medio de cultivo. Algunos mitógenos solo activan ciertas subpoblaciones de linfocitos T o B y, en general, se puede decir que solamente estimulan una tercera parte de las poblaciones celulares sobre las cuales actúan.

Los tres mitógenos más frecuentemente usados en los laboratorios de inmunología son la Concanavalina A (Con-A), la Fitoheماغلутinina (PHA) y la Fitolaca americana (PWM). La

Con-A, la lectina utilizada en este trabajo, es un mitógeno específico para los linfocitos T.

2.3.3. FACTORES QUE MODULAN LA PROLIFERACION DE CELULAS T.

Para que una respuesta inmunitaria sea efectiva se requiere la fagocitosis y digestión enzimática del material antigénico, su presentación sobre la membrana de la célula que lo ha procesado, su reconocimiento por los receptores de los linfocitos y, finalmente, una serie de eventos bien integrados que involucran la participación de diversas interleucinas que son indispensables para la proliferación y la diferenciación de los linfocitos efectores.

Por lo tanto, se puede afirmar que la linfoproliferación es un evento que requiere interacciones entre distintas subpoblaciones de células, así como la liberación de varios mediadores solubles sintetizados principalmente por linfocitos y macrófagos. Para que ocurran la activación y la proliferación de los linfocitos T es necesaria su interacción con los macrófagos activos y con los factores solubles liberados por éstos (35).

Diferentes trabajos han demostrado *in vitro* que los linfocitos T no responden a los mitógenos convencionales en ausencia de macrófagos (36). La evidencia experimental más clara es que los macrófagos producen un factor soluble que estimula

células T, ha sido obtenida mediante el empleo de cámaras de tipo Boyden, en donde las dos poblaciones de células quedan separadas por medio de una membrana que solo es permeable a factores solubles. La linfoproliferación solo se presenta si ocurre el paso transmembranal de los factores solubles liberados por los macrófagos. El factor soluble liberado por los macrófagos se denomina interleucina-1 (IL-1). Esta molécula tiene una función inmunorreguladora muy importante en la activación de células T, ya que induce una contrasupresión, posiblemente a través de un balance entre los linfocitos T colaboradores (T_H) y los linfocitos T supresores (T_S). La IL-1 promueve la generación de células T_H e inhibe la generación de células T_S. La IL-1 también promueve la liberación de prostaglandinas E (PGE), las cuales tienen un efecto antagónico al de la IL-1 y, además, inhiben la liberación de IL-2. De este modo, la PGE₂ es un modulador negativo en la proliferación de las células T (37).

La proliferación de los linfocitos T también se encuentra modulada por la IL-2, conocida como Factor del Crecimiento de la Células T (TCGF), que fue descubierta por Morgan y colaboradores (38) en 1976. Estos autores demostraron que la IL-2 era un factor necesario para el crecimiento de células T, ya que éstas solo se podían mantener en los medios de cultivo cuando se les añadían los sobrenadantes de un cultivo de células T estimuladas con PHA. Actualmente se conoce que la IL-2 es producida por las células T activadas, en presencia de la IL-1 producida por los macrófagos. Esto quiere decir que, en un medio de cultivo, la

producción de IL-2 se puede impedir si se eliminan los linfocitos T con anticuerpos anti-Tw-1 más complemento. De las varias subpoblaciones de células T que han sido caracterizadas en los ratones, solo las células T con el marcador Lyt 1⁺ son responsables de su producción (39). De la misma manera, si en el medio de cultivo se eliminan los macrófagos también se impide la formación de IL-2. Estos experimentos demostraron que las interrelaciones entre linfocitos T, macrófagos y factores solubles eran indispensables para la proliferación de los linfocitos estimulados. Así mismo, se ha observado que no es suficiente la presencia de las células, sino que también hace falta el funcionamiento correcto de todas ellas y de los mediadores que producen. Solo así se obtienen las señales de activación adecuadas para la proliferación y la diferenciación de los linfocitos T.

Algunos autores (40) han observado que la inducción de la proliferación de los linfocitos T, utilizando antígenos o mitógenos, parece estar mediada por la unión de IL-2 a receptores de alta afinidad que solo son expresados en la membrana de células T activadas.

La activación de los linfocitos T requiere dos señales. La primera de ellas la recibe la célula cuando el antígeno se une al receptor del linfocito T o cuando el mitógeno se une a ciertos Carbohidratos de la membrana. La otra señal es la IL-1 liberada por la célula presentadora del antígeno. En ambos casos, el

paso del estado de reposo G₀ a la fase G₁ es regulado por la degradación del fosfatidil inositol, lo cual ocasiona la movilización de calcio intracelular y la activación de la enzima proteína cinasa, con la consiguiente síntesis de RNAs y proteínas, entre ellas la IL-2. Una deficiencia en la transducción de señales al interior de la célula puede alterar el proceso de la proliferación celular (40, 41).

La IL-2 solo es un estimulante de la proliferación de los linfocitos T cuando éstos se exponen, simultáneamente, a un mitógeno o un antígeno contra el cual han sido previamente sensibilizados. Esta respuesta representa una retroalimentación positiva de la proliferación, en donde, mientras que el antígeno o el mitógeno estén presentes, se generan células adicionales que son capaces de responder y sintetizar más IL-2 (37).

Las células T activadas liberan otras linfocinas, como el factor estimulador de colonias (CSF), que aumenta la producción de IL-1. Esta es una forma de modular o amplificar la respuesta de las células T hacia el antígeno o el mitógeno, ya sea en forma de ayuda (linfocitos T_H) para los linfocitos B o bien en forma de una inducción de la aparición de células T citotóxicas (42).

El factor de necrosis tumoral (TNF) o caquectina es otra citocina, liberada por los macrófagos activados, que tiene una actividad facilitadora de la respuesta proliferativa de linfocitos T (42, 43). Algunos trabajos (42) han demostrado que, en las

células T humanas, la inducción de la expresión de receptores para TNF es capaz de influir en el incremento de la CMI. Los mismos autores han demostrado que los linfocitos T en reposo no expresan receptores para TNF.

Otros trabajos (43) han demostrado que tanto la IL-1 como el TNF son importantes en la formación de colonias por linfocitos T humanos. El crecimiento in vitro de las colonias de linfocitos T depende del número de los diferentes tipos de células, de la naturaleza de los productos liberados y de las interrelaciones que existan entre éstos. En algunos trabajos se ha demostrado que la adición de algunas toxinas de origen bacteriano al medio de cultivo también estimula el crecimiento de colonias de linfocitos T (44).

En algunos casos, estas interacciones entre los microorganismos o sus productos y el sistema inmunitario se expresan como una estimulación policlonal de varias actividades defensivas de naturaleza inmunológica. Sin embargo, en otros casos sucede todo lo contrario y la respuesta del sistema inmunitario resulta suprimida o se manifiesta en una forma deficiente.

Así por ejemplo, la interacción del sistema inmunitario con los LPS (endotoxinas) de origen bacteriano provoca una serie de reacciones inmunológicas de naturaleza defensiva. Como una consecuencia de esa interacción se alteran algunos mecanismos que modulan la proliferación de los linfocitos T. Se ha demostrado

que la interacción de los macrófagos con los LPS o endotoxinas provenientes de bacterias Gram negativas, así como con varias otras sustancias que proceden de diferentes especies de microorganismos, puede provocar una hiperestimulación de las células fagocíticas. Según las dosis de endotoxinas administradas al animal vivo y/o añadidas al medio de cultivo, los productos liberados por los macrófagos pueden provocar una estimulación o una supresión de la inmunidad (45). En este contexto, algunas exotoxinas de los estafilococos han probado ser estimulantes de linfocitos Ts (46), no obstante que también pueden ser las responsables de la aparición de un shock endotóxico (44). Se ha comprobado que, al interactuar con diferentes productos obtenidos de bacterias y parásitos, los animales vertebrados pueden alterar significativamente la producción de varias citocinas que modulan la proliferación de los linfocitos T (47, 29, 51, 52, 53).

2.3.4. PROLIFERACION DE LINFOCITOS T Y ENFERMEDAD.

Cuando se produce una falla o un desequilibrio en la producción de los factores que modulan la proliferación de los linfocitos T, los resultados se manifiestan como una deficiencia selectiva en la respuesta de las células T. De acuerdo a su intensidad y su tiempo de duración, las deficiencias de la respuesta de los linfocitos T se caracterizan por un aumento en la susceptibilidad para presentar diversas enfermedades, sobre todo

de tipo infeccioso. Las inmunodeficiencias de la CMI, caracterizadas por la ausencia o la disfunción de los linfocitos T, pueden ser de congénitas o adquiridas. Las inmunodeficiencias congénitas son poco frecuentes y, entre ellas, el síndrome de Di George representa el caso extremo (agenesia del timo) de un defecto de la inmunidad celular. En el caso de las inmunodeficiencias secundarias de los linfocitos T, la respuesta de estas células se encuentra comprometida a causa de varias enfermedades primarias, las cuales generalmente han tenido una evolución prolongada.

Se ha publicado un gran número de trabajos que han comprobado la disminución de la respuesta linfoproliferativa en personas y animales que se encuentran en ciertas condiciones fisiológicas o que tienen enfermedades primarias que comprometen las funciones de los linfocitos T (28). Así por ejemplo, la respuesta proliferativa de los linfocitos T estimulados con mitógenos se encuentra disminuida fisiológicamente en personas de edad avanzada (40, 48), en el curso del embarazo y en niños recién nacidos y/o prematuros.

Algunos han sugerido que la disminución de la respuesta de los linfocitos estimulados se debe a una reducción en la producción de IL-2 (80) y/o a la expresión deficiente de los receptores para IL-2 (51). Otros autores han propuesto que, in vitro, la respuesta deficiente de los linfocitos T se debe a un defecto asociado a los mecanismos de transducción de señales intracelulares para la activación adecuada de las células (40, 41). De acuerdo a varios trabajos más, la disminución de la

respuesta proliferativa de los linfocitos de los ancianos está causada por un cambio del fenotipo en las subpoblaciones de células T a causa de la edad (48). También se ha considerado que, en los ancianos, el déficit de la respuesta a mitógenos puede ser el reflejo de una deficiencia de un solo subtipo de linfocitos T para proliferar cuando son estimulados con mitógenos. Cuando la CMI se estudia por medio de pruebas cutáneas, algunos autores han señalado que la disminución de la respuesta DTH en los ancianos se debe a cambios inmunológicos en la piel que están asociados a la edad avanzada (50). En el curso del embarazo y, lo mismo, al medir la respuesta de los linfocitos de niños recién nacidos, diferentes factores hormonales o inmunosupresores endógenos (α -fetoproteína, por ejemplo) pueden modificar la reactividad in vitro después de la estimulación con mitógenos.

Las alteraciones en la respuesta proliferativa de células T también pueden ser encontradas en diversos estados clínicos, como las enfermedades parasitarias por tricomonas (51), clamidias (52) y leishmanias (53). En el caso de la leishmaniasis se ha demostrado que las subpoblaciones de células T presentan un cambio de su fenotipo después de ser coincubados in vitro con Leishmania donovani. Este cambio en el fenotipo ha sido considerado la causa de la disminución de la respuesta linfoproliferativa después de una estimulación con PHA (53). En el caso de experimentos realizados con tricomonas (51), la disminución de la respuesta linfoproliferativa se ha atribuido a que las células infectadas con el parásito tienen disminuida su producción de IL-2.

La respuesta proliferativa de las células T también se encuentra disminuida en algunas enfermedades de origen bacteriano como la lepra (54). Las endotoxinas (LPS) de las bacterias Gram negativas pueden tener un efecto similar en otras infecciones bacterianas graves, pero de evolución aguda. La misma reducción de la respuesta linfoproliferativa ha sido observada en diversas infecciones virales, como las causadas por el virus responsable del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (49), por virus del herpes simplex (55), por el virus del sarampión, por los citomegalovirus, etc. Se pueden mencionar varias circunstancias más que provocan diferentes grados de alteración en la respuesta de los linfocitos T. Entre ellas son importantes las inmunodeficiencias secundarias que resultan de la administración de medicamentos los cuales, no obstante sus propiedades terapéuticas, también pueden tener graves efectos inmunosupresores colaterales. Algunos autores refieren que han demostrado la presencia en el suero de factores solubles que son liberados por los tumores malignos y que, como un mecanismo de evasión de la neoplasia, los pacientes con cáncer tienen deprimida la respuesta de los linfocitos T.

La desnutrición es otra enfermedad que deteriora el sistema inmunitario y deprime significativamente la respuesta de los linfocitos T (68). La disminución de proteínas o calorías en la dieta habitual, así como de la de ciertas vitaminas y minerales, conduce a diferentes cuadros clínicos de desnutrición que, invariablemente, se encuentran asociados a diferentes deficiencias inmunológicas. La desnutrición compromete particularmente las

funciones de los linfocitos T y deprime la capacidad de estas células para responder a los antígenos o los mitógenos. Las deficiencias inmunológicas del desnutrido se traducen en infecciones recurrentes que, por lo general, agravan la pérdida de peso y tienen tasas de mortalidad elevadas (69). La desnutrición es la causa de una inmunodeficiencia secundaria que es necesario tomar en cuenta en el momento de estudiar la inmunidad del individuo desgastado. A pesar de la anorexia y la pérdida de peso que provocan los síndromes desgastantes inducidos mediante inyecciones de estafilococos, los trastornos inmunológicos del animal desgastado difieren significativamente de los que han sido observados en animales desnutridos (70). Es probable que, aunque expresen el mismo grado de pérdida de peso, la inmunidad de los animales desgastados por inyecciones de estafilococos y la de los desnutridos por una dieta deficiente en proteínas se encuentren comprometidas a través de mecanismos diferentes (71).

La existencia de una alteración en cualesquiera de los mecanismos que regulan la respuesta proliferativa de células T, generalmente se traduce por una deficiencia de la inmunidad celular. Como se puede apreciar por el resumen presentado en los párrafos anteriores, son numerosas las condiciones clínicas en el curso de las cuales se pueden encontrar alteraciones secundarias de la inmunidad celular. En algunos de estos casos, el diagnóstico de la inmunodeficiencia o el control de la evolución de la enfermedad primaria requieren la aplicación de pruebas que midan la respuesta proliferativa de los linfocitos T (72).

2.4. REDUCCION DEL MTT.

La ruptura del anillo de la sal de tetrazolium MTT [bromuro de 3-(4,5 dimetil tiazol- 2 il)- 2,5 difeniltetrazolium] provoca la formación de un producto colorido denominado "formazán". Statar y col. (56) utilizaron esta sal de tetrazolium para medir la actividad de la enzima succinato-deshidrogenasa y observaron que la conversión a formazán solo ocurría en células vivas. Además, ellos también encontraron que la cantidad de formazán producida era proporcional al número de células presentes. Más adelante, Mosman (34) aplicó el mismo procedimiento como un método colorimétrico cuantitativo para medir la proliferación celular in vitro y también la lisis mediada por el complemento.

La reducción del terazolium a formazán está acompañada de un cambio de coloración que va de amarillo a azul. En las células vivas y metabólicamente activas, la reducción del MTT ocurre a causa de la actividad enzimática en las mitocondrias (34).

El análisis espectrofotométrico de las soluciones ha revelado que la solución amarilla del MTT tiene un pico de absorbancia máxima a 400 nm. Cuando la sal es reducida a cristales de formazán y éstos se disuelven, la solución resultante tiene una coloración azul cuyo pico de absorbancia máxima se encuentra entre 570 y 590 nm. De este modo, la intensidad de la reacción se puede cuantificar colorimétricamente.

El método de la reducción del MTT ha sido utilizado en numerosos estudios, tales como viabilidad celular, citotoxicidad, viabilidad de parásitos, resistencia o sensibilidad de células cancerosas a ciertos fármacos, etc. (57, 58, 59). Sin embargo, han sido pocos los estudios enfocados a la medición de la proliferación y el crecimiento celular. En 1985, Heeg y col. (60), utilizaron la reducción del MTT para detectar la presencia de los factores que influían en el crecimiento de los linfocitos T.

A partir de los trabajos de Mosman (34), quién aplicó el método en estudios de crecimiento y supervivencia celular, algunos otros autores han tratado de introducir modificaciones a la técnica inicial, con el fin de lograr una mayor sensibilidad y poder usarla como un método alternativo al de la incorporación de timidina tritiada en estudios de proliferación celular. Varios trabajos han aplicado la técnica de la reducción del MTT para analizar los efectos de algunas citocinas sobre la tasa de multiplicación de los linfocitos.

En 1986, Francois Denizot (61) modificó la técnica original para evitar precipitación de proteínas con el uso del disolvente. En el mismo año, Hiroko Tada (62) también modificó el método de Mosman, para poder medir la concentración de la IL-2, reduciendo el tiempo de incubación e introduciendo un nuevo disolvente. Gerlier y Thonasset (63) propusieron nuevas modificaciones para aplicar la técnica de la reducción del MTT a estudios de

activación celular. Ellos mismos establecieron que la ruptura del MTT por células viables seguía una cinética de primer orden y que la reacción podía ser utilizada para comparar la actividad mitocondrial de células que se encontraban en diferentes estadios de activación. En 1987, otros autores, aplicaron este mismo método colorimétrico en estudios de estimulación celular con mitógenos y para la evaluación de las señales de maduración de los linfocitos B (64). En 1990, Nix y colaboradores (65) lo aplicaron para la cuantificación de la respuesta proliferativa y supresiva de linfocitos estimulados por la Concanavalina A (Con-A).

El método colorimétrico de la reducción del MTT tiene numerosas ventajas las cuales han sido citadas por diversos autores (34, 61, 62, 63, 64). Entre las principales se puede mencionar la rapidez de la reacción, ya que una gran cantidad de muestras pueden ser procesadas en corto tiempo con alto grado de precisión, utilizando un lector de ensayos inmunoenzimáticos (ELISA). Los resultados del análisis pueden ser leídos sin necesidad de llevar a cabo un lavado de las células o la transferencia de las mismas, lo cual también aumenta la rapidez del ensayo y evita variaciones en las lecturas. El método puede ser cualitativo ya que el cambio de coloración a simple vista es indicativo del grado de activación o de la cantidad de factores de crecimiento producidos. Sin embargo, otra de sus ventajas consiste en que también puede ser cuantitativo, por que la diferencia de absorbancias entre el sustrato inicial y el producto final puede leerse en un lector para placas de ELISA a la longitud de onda adecuada (570 nm).

Por estas razones se ha propuesto que la reducción del MTT resulta un método sencillo, rápido, preciso y confiable que ofrece una gran cantidad de aplicaciones en el laboratorio clínico y de investigación.

Sin embargo, a pesar de todas estas ventajas, hasta la fecha la prueba de la reducción del MTT es un método que generalmente se aplica en estudios de citotoxicidad (57), determinación de actividad enzimática (66), viabilidad de células cancerosas después de diversos tratamientos (59), quimiosensibilidad, etc.. Existe poca literatura sobre su utilización en estudios inmunológicos que tratan de medir la proliferación de linfocitos.

Uno de los propósitos de este trabajo es destacar las ventajas que presenta este método colorimétrico y demostrar que puede ser un ensayo alternativo que, en algunos casos, puede sustituir a la incorporación nuclear de la timidina tritiada.

CAPITULO 3. OBJETIVOS E HIPOTESIS

Este trabajo tiene dos objetivos. El primero es implementar una prueba no isotópica que tenga la suficiente sensibilidad para medir colorimétricamente la respuesta de linfocitos estimulados *in vitro* con antígenos y/o mitógenos. El segundo es utilizar la nueva prueba no isotópica para conocer si la inducción del síndrome del desgaste en ratones recién nacidos provoca o no cambios en la respuesta de los linfocitos esplénicos cuando son cultivados y estimulados con un mitógeno.

Antes de iniciar la parte experimental de la presente Tesis se propusieron las siguientes hipótesis.

1) Cuando los linfocitos son estimulados *in vitro* con la Con-A, los resultados de la reducción del colorante MTT se correlacionan con los resultados de la incorporación de la [³H]-timidina.

2) La sensibilidad de la prueba con el colorante MTT sí permite demostrar cambios entre la respuesta de los linfocitos de animales sanos y de animales inmunocomprometidos.

3) Cuando son estimulados in vitro con un mitógeno, los linfocitos esplénicos de los ratones desgastados tienen deprimida su capacidad de reducir el MTT.

4) La depresión de la respuesta proliferativa a causa del desgaste es un fenómeno transitorio que se recupera cuando el animal mejora sus condiciones físicas.

CAPITULO 4. DISEÑO DEL EXPERIMENTO.

El presente trabajo estuvo dividido en tres partes. En la primera se estandarizó la prueba de la reducción del MTT, tomando en cuenta que ya había sido recomendada por otros autores como una herramienta de laboratorio que permitía medir la activación de los linfocitos cuando éstos eran estimulados in vitro. En la segunda parte, los resultados de la reducción del MTT por los linfocitos estimulados se compararon con los resultados de medir la proliferación de esas mismas células utilizando el método de la incorporación de la [^3H]-timidina al núcleo. En la tercera parte del trabajo, el método de la reducción del MTT se aplicó para estudiar la respuesta de los linfocitos esplénicos estimulados con la Con-A, en ratones que tenían una inmunodeficiencia provocada experimentalmente. La misma prueba también se aplicó para estudiar, durante dos semanas, la evolución de la respuesta in vitro de los linfocitos de los ratones inmunodeficientes.

4.1. Estandarización de la prueba del MTT. Los primeros experimentos estuvieron dirigidos a la selección de las condiciones de trabajo adecuadas. El objetivo fue encontrar las condiciones necesarias para que las células estimuladas pudieran reducir la mayor cantidad del MTT mientras que las células no

estimuladas debían dar las lecturas más bajas que fuera posible. Los experimentos se realizaron con las células esplénicas de ratones Balb/c de cuatro semanas de edad. Los cultivos de las células y la estimulación de las mismas en presencia del MTT estuvieron dirigidos a reconocer la influencia de diversas variables sobre los resultados. Para ello, se trabajó con diferentes cantidades de células y con diferentes concentraciones del mitógeno.

4.2. Comparación entre reducción del MTT e incorporación de timidina tritiada al núcleo. Esta parte del trabajo se realizó con la finalidad de observar si era posible correlacionar los resultados de las dos pruebas. Aunque los resultados revelan la medida de dos actividades diferentes (el incremento del metabolismo que reduce un colorante y la tasa de multiplicaciones de las células), de todos modos se supuso que toda célula estimulada que se multiplica también tenía un aumento paralelo de su metabolismo. Para este experimento se utilizaron 12 ratones Balb/c de cuatro semanas de edad.

4.3. Inducción de la inmunodeficiencia experimental. Aunque existen numerosos procedimientos para provocar una inmunodeficiencia en animales de laboratorio, en este estudio se utilizó la técnica de inyectar bacterias muertas por vía intraperitoneal (IP) en ratones Balb/c recién nacidos. Los animales fueron separados en tres grupos desde el momento de su nacimiento de acuerdo al tratamiento que iban a recibir. Los

ratones de un grupo recibieron las bacterias inactivadas, los del otro grupo solo fueron inyectados con solución salina isotónica y, finalmente, los ratones del grupo control permanecieron sin recibir ningún tratamiento. Para este experimento se utilizaron 120 ratones y se dividieron en tres grupos de 40 animales cada uno.

4.4. Estudio de la respuesta proliferativa de los linfocitos estimulados con el mitógeno Concanavalina-A. En cada uno de los tres grupos experimentales se procedió a separar los ratones de acuerdo a la fecha propuesta para su sacrificio, 1, 5, 10 y 15 días después de terminar el período de las inyecciones intraperitoneales. Los animales fueron divididos en esta forma para estudiar tanto los efectos del tratamiento inmunosupresor (bacterias muertas) sobre la inmunidad celular como la evolución de la respuesta linfoproliferativa durante las dos semanas siguientes, una vez que terminaba el tratamiento de los animales. En los dos casos se utilizó la prueba de la reducción del MTT para medir la intensidad de la estimulación de los linfocitos cultivados en presencia de la Con-A. Cada grupo de 40 animales fue dividido en 4 subgrupos de 10 animales que fueron sacrificados en cuatro fechas diferentes.

CAPITULO 5. MATERIAL Y METODOS

5.1. Animales. Se utilizaron ratones Balb/c, de ambos sexos recién nacidos y de 4 semanas de edad que fueron obtenidos del Bioterio de la Facultad de Química (UNAM), en donde permanecieron durante todo el experimento bajo condiciones convencionales.

5.2. Bacterias. Staphylococcus aureus de la cepa ATCC 6538 fue cultivado en medio BHI a 37 C con agitación constante durante 18 horas. La suspensión de bacterias se lavó tres veces con solución salina isotónica (SSI) estéril y posteriormente se inactivó con calor a 121 C durante 30 minutos. Las bacterias se recolectaron por centrifugación y finalmente se ajustaron nefelométricamente a 5×10^9 bacterias/ml en SSI. Esta suspensión fue conservada a 4 C hasta el momento de su uso bajo condiciones de esterilidad.

5.3. Inducción del síndrome del desgaste. La enfermedad experimental fue provocada por la inyección IP de 0.1 ml de la suspensión de estafilococos inactivados a ratones recién nacidos.

Esta dosis se repitió cada tercer día durante cuatro semanas. El método es una modificación del que fue propuesto inicialmente por Ekstedt (18, 8).

5.4. Células y medio de cultivo. Las células se obtuvieron del bazo de los ratones. Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical e inmediatamente, bajo condiciones de esterilidad, se les abrió la cavidad abdominal y se procedió a extirpar el bazo. Las células de este órgano linfóide fueron disgregadas en 5 ml de solución salina balanceada (BSS) estéril sobre una placa de Petri fría (colocada sobre hielo). La suspensión de células fue lavada dos veces con BSS. Posteriormente fueron suspendidas en una solución hemolizante de NH_4Cl al 80 % y TRIS BASE al 20% en agua desionizada, con el propósito de eliminar los glóbulos rojos.

Una vez eliminados los eritrocitos, las células esplénicas se resuspendieron en 2 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (Hy Clone, Laboratories Inc., USA) suplementado con suero bovino fetal al 10% (Flow Laboratories Inc., USA) que había sido previamente inactivado 30 minutos a 56 C, y al cual se añadió Penicilina-Estreptomicina 100x (Microlab, México) al 1 %, aminoácidos no esenciales 100x (Microlab, México) al 0.5 %, Piruvato 100 mM (Microlab, México) al 0.5 %, L-glutamina 200 mM al 0.5 %, ácido N-2-hidroxietil piperina N-2-Etanosulfónico (HEPES) (Microlab, México) 25 mM y una solución de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) al 2% en agua desionizada. El medio de cultivo

se mantuvo a 4 C y fue suplementado el día de su uso, bajo condiciones de esterilidad. La viabilidad de las células se determinó por exclusión del colorante azul tripano, preparado al 0.4 % en SSI. Solamente se cultivaron aquellas suspensiones de células esplénicas con una viabilidad superior al 90%. El número de células necesario para los experimentos fue determinado mediante un conteo bajo microscopio, con ocular 10 X y objetivo 40 X, utilizando la cuadrícula de una cámara de Neubauer. Una vez contadas las células viables, la suspensión fue ajustada de tal forma que el número de células deseado siempre quedara en un volumen de 50 μ l.

5.5. Cultivo de las células y estimulación con el mitógeno. Bajo condiciones de esterilidad, con campana de flujo laminar, a cada uno de los 96 pozos, de 300 μ l, de una microplaca (Costar, USA) se añadieron 50 μ l de la suspensión de células esplénicas más 100 μ l del medio de cultivo RPMI 1640 recién suplementado. La microplaca fue cerrada y se mantuvo durante 48 horas en una incubadora (Quee, USA) a 37 C en una atmósfera de CO₂ al 5%, con 19.7 % de humedad. La estimulación de las células con mitógeno se realizó agregando, 100 μ l de medio de cultivo con el mitógeno Con A tipo IV (Sigma Chemical Co., USA), preparado a partir de una solución con 4000 μ g/ml en NaCl 6M y diluido en el medio de cultivo hasta tener la concentración deseada.

5.6. Método de la reducción del MTT. El MTT (Sigma Chemical Co., USA) fue disuelto a una concentración de 5 mg/ml en

solución balanceada de fosfatos (PBS) pH 7.4. La solución de MTT fue esterilizada por filtración utilizando membranas Millipore con poros de 0.2 micras. Una vez filtrada, la solución fue conservada a 4 C, en un envase protegido de la luz. Cada preparación se descartaba después de cuatro semanas.

Al terminar las 48 horas de incubación de las células, a cada pozo se añadió un volumen de 20 μ l de la solución de MTT e, inmediatamente, cada microplaca se incubó durante 4 horas en las mismas condiciones de atmósfera y temperatura que ya fueron mencionadas, de acuerdo a lo que había sido establecido previamente por otros autores (34, 62). Durante este tiempo, la sal de MTT es reducida y se forman los cristales de formazán. Una vez terminada la incubación de 4 horas, a cada pozo se añadieron 100 μ l de una solución de dodecyl sulfato de sodio (SDS) al 10% en HCl 0.01 N, con la finalidad de disolver los cristales y obtener una solución homogénea y sin células viables. Después de adicionar la solución de SDS, las microplacas se incubaron a 37 C con humedad al 19.7 % durante toda la noche, para obtener una buena solución de los cristales y evitar pérdidas de volumen por evaporación. La absorbancia del sobrenadante de cada pozo fue medida al día siguiente utilizando un lector para placas de ELISA (Dynatech Lab. INC MR 650, USA) a una longitud de onda de 570 nm.

5.7. Método de la incorporación al núcleo de la [³H]-timidina. Después de 48 horas de cultivo, se añadió 1 μ Ci de [³H]-Timidina (New England Nuclear, USA) en cada pozo, en 20 μ l de

medio de cultivo y con una actividad específica de 6.7 Ci/mmol. Posteriormente la microplaca se incubó toda la noche a 37 C, bajo las mismas condiciones de atmósfera y humedad que ya han sido mencionadas. Al día siguiente las células se procesaron en un cosechador (modelo 24 v.Brandel, USA) que depositó el contenido insoluble de cada pozo sobre papel fibra de vidrio (Whatman, USA) con poros de 0.4 μ . Las tiras de papel se dejaron secar a temperatura ambiente y, posteriormente, las muestras de cada pozo fueron separadas e introducidas en viales (Wheaton, USA) de 20 ml que contenían 5 ml de líquido de centelleo compuesto por PPO(2,5 difenil oxazol) y POPOP (P,[bis (2- (5-fenil oxazol)] benceno). Estas dos sustancias se disuelven en tolueno y la solución se mantiene a 4C . La radiactividad de cada muestra fue medida en un contador de centelleo (TRI-CARB 300, Packard, USA). Las lecturas fueron registradas como cuentas por minuto (cpm).

5.8. Estandarización de la técnica del MTT. Con el propósito de estandarizar la prueba, se cultivaron diferentes cantidades de células esplénicas, por triplicado. Las células viables fueron ajustadas a cuatro concentraciones diferentes (200, 300, 400 y 500 x 10³/50 μ l de medio de cultivo). El medio de cultivo se preparó con o sin el mitógeno Con-A. Cuando el medio se preparó con el mitógeno, éste fue diluido para obtener tres concentraciones diferentes (1, 2 y 5 μ g/ml) en 100 μ l de medio de cultivo. La elección del número de células y la concentración de Con-A adecuados se determinó con la ayuda del análisis estadístico de los valores de absorbancia que se obtenían cuando se utilizaba cada una de las diferentes variables.

5.9. Correlación entre la técnica del MTT y la incorporación de la [³H]-timidina. Para estudiar si existía o no una correlación entre los resultados de las dos pruebas, se cultivaron 300×10^3 células / 50 μ l de medio RPMI 1640, a las cuales se les añadieron 100 μ l de medio de cultivo o 100 μ l de una solución de medio con el mitógeno Con A a una concentración de 2 μ g / ml. Los cultivos se incubaron bajo las condiciones que ya han sido señaladas. El experimento se realizó por duplicado, ya que se sembraron dos series, por triplicado, de células sin estimular y dos series, también por triplicado, de células estimuladas con el mitógeno. En una serie de cultivos por triplicado, se evaluó la respuesta proliferativa por el método de la reducción del MTT, mientras que en la otra serie de cultivos la evaluación de la respuesta se llevó a cabo midiendo la incorporación de [³H]-timidina. Una vez obtenidos los resultados, en valores de absorbancia y cuentas por minuto (cpm), se hizo el análisis estadístico correspondiente para comprobar si existía o no una correlación entre ambos métodos.

5.10. Estudio de la proliferación celular en los diferentes grupos de ratones. Las células esplénicas viables de los animales de todos los grupos fueron obtenidas inmediatamente después de sacrificarlos. La concentración de cada suspensión fue ajustada bajo condiciones de esterilidad y todos los cultivos se realizaron por triplicado. La suspensión de células seleccionada (300×10^3 /50 μ l de medio RPMI) fue mezclada con 100 μ l de medio de cultivo, al cual se le había añadido o no (solución

problema y su correspondiente control) el mitógeno Con-A diluido a una concentración de 2 $\mu\text{g/ml}$. Las células fueron cultivadas durante 48 horas, bajo las condiciones señaladas y la evaluación de la proliferación celular se llevó a cabo mediante la técnica del MTT. Una vez leída la absorbancia, los valores delta fueron obtenidos al restar el valor de la absorbancia del sobrenadante de los cultivos de células sin estimular (basal) a los valores de la absorbancia en los sobrenadantes de los cultivos de células estimuladas con el mitógeno (problema).

5.11. Análisis estadístico. Las diferencias entre las medias de los valores obtenidos en los grupos estudiados fueron calculadas según un análisis de varianza.

6.1. ESTANDARIZACION DE LA PRUEBA COLORIMETRICA.

Las dos variables independientes que se utilizaron (diferentes cantidades de células y diferentes concentraciones de Con-A) se correlacionaron con los resultados de la reducción del MTT. Estos últimos se expresaron como los valores de la absorbancia del sobrenadante del medio de cultivo.

Al aumentar la cantidad de Con-A añadida a cada pozo se obtuvo un aumento proporcional tanto de la absorbancia del sobrenadante de los cultivos estimulados ($r = 0.760$) como de la absorbancia delta ($r = 0.816$). Este aumento de la absorbancia fue evidente con 200, 300, 400 y 500 x 10³ células/pozo. La absorbancia delta se calculó restando la absorbancia basal al valor obtenido en el sobrenadante de las células estimuladas. Los resultados se puede observar en las gráficas de las Figuras 1 y 2.

Al aumentar las cantidades de células añadidas a cada pozo se obtuvieron distintas correlaciones según el medio de cultivo contuviera o no el mitógeno Con-A. Cuando los cultivos no fueron estimulados (condiciones basales), los valores de la

absorbancia se correlacionaron significativamente ($p < 0.001$) con las diferentes cantidades de células añadidas a cada pozo ($r = 0.999$). Los resultados se puede observar en la Figura 3. Sin embargo, cuando a los cultivos se les añadieron diferentes cantidades de Con-A se pudo observar que el incremento de la absorbancia solo fué proporcional desde 200 a 400×10^3 células/pozo. Al utilizar una mayor cantidad de células (500×10^3) ocurría una disminución de la reducción del MTT (Figura 4).

CELULAS x 1000	CON-A $\mu\text{g/ml}$	ABSORBANCIA FONDO	ABSORBANCIA PROBLEMA	ABSORBANCIA DELTA
200	0	0.733	0.733	0.000
200	1	0.733	0.844	0.111
200	2	0.733	0.993	0.260
200	5	0.733	1.023	0.290
300	0	0.777	0.777	0.000
300	1	0.777	0.955	0.178
300	2	0.777	1.206	0.429
300	5	0.777	1.287	0.510
400	0	0.819	0.819	0.000
400	1	0.819	1.044	0.226
400	2	0.819	1.326	0.507
400	5	0.819	1.386	0.567
500	0	0.857	0.857	0.000
500	1	0.857	1.056	0.199
500	2	0.857	1.256	0.399
500	5	0.857	1.322	0.465

Tabla 1. Valores promedio, obtenidos por triplicado, de las absorbancias (delta, del fondo y de las células estimuladas), en los sobrenadantes del medio de cultivo, cuando la reducción del MTT se llevó a cabo utilizando diferentes cantidades de células y del mitógeno Con-A.

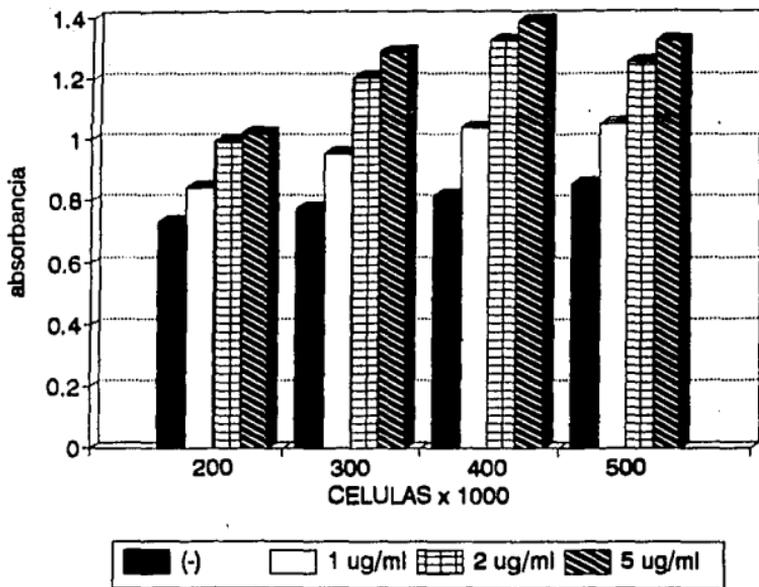


Figura 1. Valores de absorbancia total del sobrenadante de los medios de cultivo que contenían diferentes cantidades de células (200, 300, 400, 500 x 10³). Para cada población de células se utilizaron diferentes concentraciones de Con A con el fin de estimular los linfocitos y aumentar la reducción de una cantidad constante de MTT.

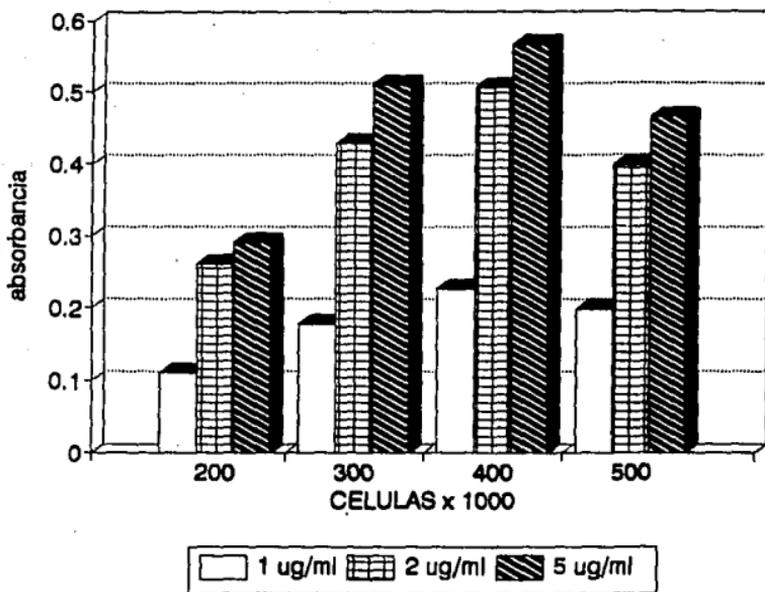


Figura 2. Valores de absorbancia delta al variar las cantidades de células contenidas en cada pozo (200, 300, 400 y 500 x 10³). Para cada población de células se utilizaron diferentes cantidades de Con-A con el fin de estimular los linfocitos y aumentar la reducción de una cantidad constante de NTT.

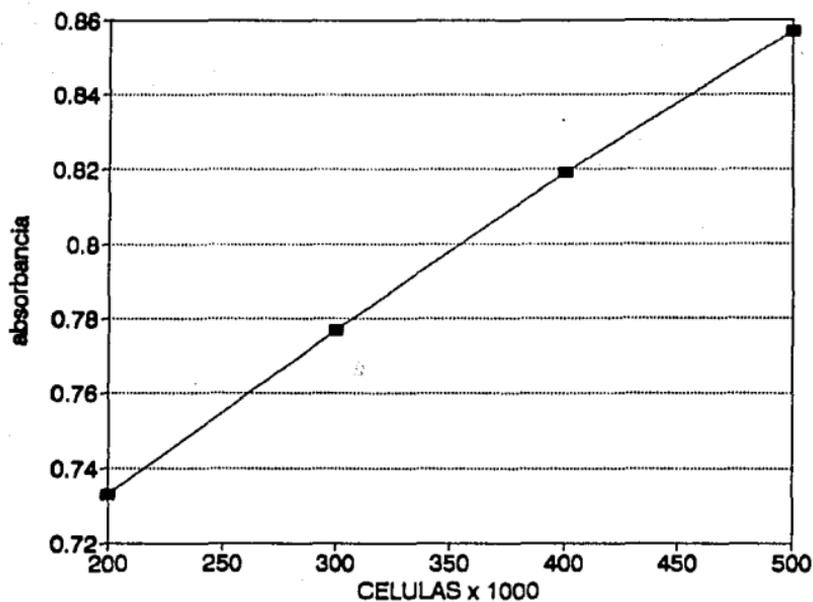


Figura 3. Correlación entre los valores de la absorbancia basal del sobrenadante y las cantidades de células incubadas en cada pozo, cuando al medio de cultivo no se le añadió la Con A.

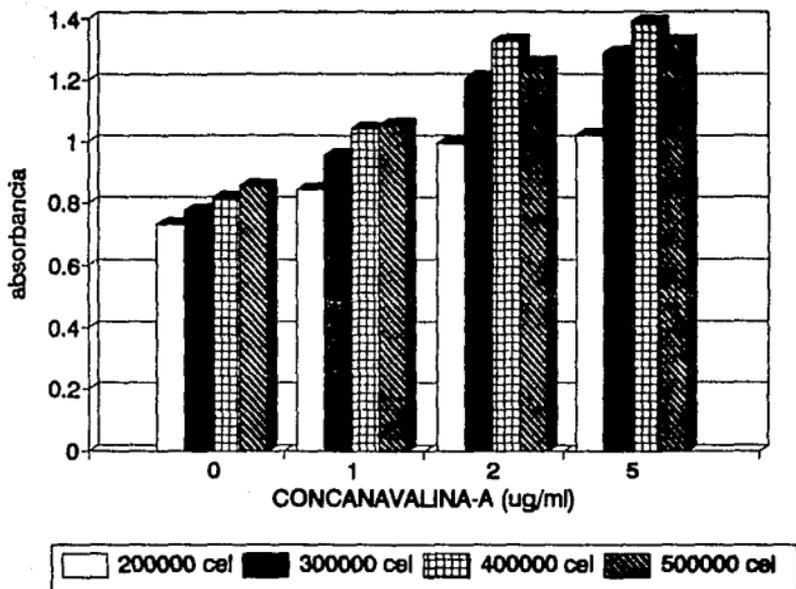


Figura 4. Valores de absorbancia en el sobrenadante de los cultivos de células esplénicas que fueron estimuladas con el mitógeno Con-A. Cada barra representa las diferentes cantidades de células ($200, 300, 400$ y 500×10^3) que fueron estimuladas con distintas concentraciones del mitógeno. Se puede apreciar que, al variar la concentración del mitógeno, la absorbancia aumenta linealmente mientras las cantidades de células no sean superiores a 400×10^3 . En cambio, cuando se cultivan mayores cantidades de células, ocurre una disminución de la absorbancia al provocar la estimulación con 2 y 5 ug/ml de Con-A.

Una vez que se obtuvieron todos los resultados de la reducción del MTT, expresados como las lecturas de las absorbancias, se aplicó una prueba de regresión lineal para calcular los coeficientes de regresión correspondientes a las dos variables (β_1 = células y β_2 = Concanavalina-A). Cuando los valores de la absorbancia del sobrenadante (en los pozos con células estimuladas) y los de la absorbancia delta (calculados mediante una resta) fueron asignados a la escala Y, los dos coeficientes de regresión β_2 tuvieron un valor estadístico significativo a los niveles indicados. En cambio, el valor del coeficiente de regresión β_1 solo fue significativo ($P < 0.05$) cuando la absorbancia de las células estimuladas fue tomado como valor de Y.

Para calcular la línea de regresión se utilizó la siguiente ecuación :

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + e_1 + e_2$$

donde, Y = variable dependiente (absorbancia),
 β_0 = valor constante (promedio),
 β_1 = coeficiente de regresión (células),
 β_2 = coeficiente de regresión (Con-A),
 X_1 = variable independiente (células),
 X_2 = variable independiente (Con-A),
 e_1 y e_2 = errores asociados a cada observación.

Los resultados incluyeron, además, el valor de S (desviación estandar sobre la línea de regresión) y el valor de r^2_{aj} (coeficiente de determinación ajustado).

ABSORBANCIA	TOTAL (Con-A)	DELTA
β_0	0.618	0.034
β_1	0.415	0.198
p	< 0.05	> 0.2
β_2	0.760	0.816
p	< 0.001	< 0.001
r^2	74.2%	70.6%
r^2_{aj}	70.2%	66.1%
S	0.118	0.117

Tabla 2. Regresión lineal. Para Y = absorbancia total, los dos coeficientes de regresión β_1 y β_2 resultaron estadísticamente significativos, mientras que cuando Y = absorbancia delta, solamente β_2 resultó con $p < 0.001$. El análisis de varianza, con la suma de los cuadrados y los cuadrados medios, demostró la reproducibilidad de las correlaciones con las dos variables independientes mencionadas (células y Con-A) cuando se compararon con la absorbancia total ($F = 18.69$, con $p < 0.001$) y con la absorbancia delta ($F = 15.59$, con $p < 0.001$).

De acuerdo a los resultados mencionados, se consideró que los cambios en la concentración de la Con-A influían de un modo más significativo sobre la absorbancia que los cambios en las cantidades de células añadidas a cada pozo. En presencia de cualesquiera de las cantidades de Con-A utilizadas, al añadir más de 400×10^3 células por pozo resultaba una disminución de las cantidades de MTT reducidas y, consiguientemente, del valor de la absorbancia en el sobrenadante del cultivo. Considerando los resultados anteriores, se decidió que las condiciones óptimas para la reducción del MTT se encontraban en el modelo de linfoproliferación que utilizaba 300×10^3 células/pozo estimuladas con 2 ug de Con-A.

6.2 CORRELACION ENTRE REDUCCION DEL MTT E INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA.

Una vez estandarizada la prueba de la reducción del MTT por las células esplénicas estimuladas, se consideró conveniente comparar los valores de las absorbancias con las cantidades de [3 H]-timidina incorporadas al núcleo de linfocitos que estaban en el mismo medio de cultivo y en presencia de las mismas cantidades de Con-A.

Con este propósito fueron sacrificados 12 ratones Balb/c de la misma edad y sexo. Sus linfocitos esplénicos fueron

suspendidos en el medio de cultivo suplementado en la forma que ya se mencionó y, en seguida se procedió a colocarlos, por triplicado, en los pozos de dos microplacas, a una de las cuales se le añadió [³H]-timidina mientras que las células de la otra solo recibieron los mismos volúmenes de la solución de MTT. En los dos casos, las células fueron ajustadas a $300 \times 10^3/50\mu\text{l}$ para cada pozo y todos los cultivos recibieron 2 μg de Con-A. Los resultados (cpm y absorbancias) se presentan en el apéndice I. La correlación observada ($r = 0.877$) aparece en la Figura 5.

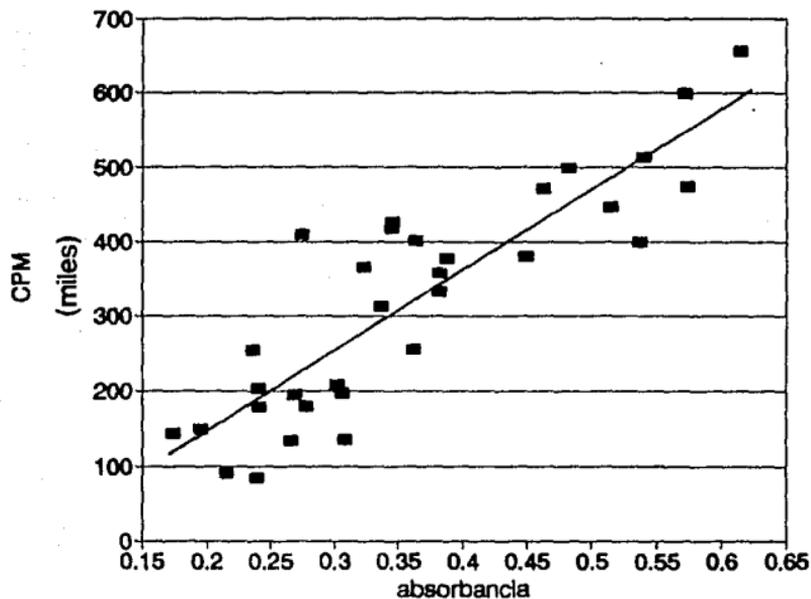


Figura 5. La gráfica corresponde al experimento mediante el cual, utilizando células esplénicas estimuladas con el mitógeno Con-A, se estudió la correlación entre las lecturas colorimétricas (absorbancia después de la reducción del MTT) y las medidas de la radiactividad (cpm después de la incorporación de la ^3H -timidina al núcleo).

6.3. INDUCCION DE LA ENFERMEDAD DESGASTANTE.

Los animales que fueron inyectados IP con la suspensión de estafilococos muertos presentaron un considerable retraso en su desarrollo corporal y, cuando tenían cuatro semanas de edad, llegaron a pesar 40% menos que los ratones sanos de los grupo control. Los ratones desgastados estaban anoréxicos, débiles, irritables, con el pelo ralo y presentaban evacuaciones diarias frecuentes. Una vez que terminaron las inyecciones IP, los animales fueron recuperando progresivamente su apetito, mejoraron sus condiciones físicas y, al cabo de cuatro semanas, tenían el mismo peso y aspecto general de los animales control.

6.4. MEDIDA DE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA EN LOS CULTIVOS DE LINFOCITOS DE LOS RATONES DESGASTADOS.

Un día después de terminar las inyecciones IP de estafilococos muertos, los linfocitos esplénicos de los ratones desgastados tenían disminuida su capacidad para reducir el MTT cuando eran estimulados in vitro con el mitógeno Con-A. La disminución del valor promedio de la absorbancia delta fue interpretado como sugestivo de que las inyecciones intraperitoneales de estafilococos habían deprimido la respuesta proliferativa de los linfocitos estimulados con el mitógeno. Al comparar los resultados obtenidos en los tres grupos de animales se pudo comprobar que no existían diferencias estadísticamente significativas entre los animales sanos y los del grupo control que habían sido inyectados con SSI. Sin embargo, la absorbancia

delta si fue significativamente inferior ($P < 0.05$) en los animales desgastados en comparación con la de los otros dos grupos de ratones. Los valores promedio de la absorbancia delta se presentan en la Tabla 3. Las lecturas individuales con los sobrenadantes de cada cultivo se encuentran en el Apéndice I.

CONDICION EXPERIMENTAL DE LOS RATONES	ABSORBANCIA DELTA \bar{x}	DESVIACION ESTANDARD	
DESGASTADOS (1)	0.292	0.083	P < 0.01
CONTROLES (2)	0.452	0.179	P < 0.05
SANOS (3)	0.386	0.102	
P < 0.05			

Tabla 3. Los valores de absorbancia delta se obtuvieron al restar la absorbancia del sobrenadante del cultivo de linfocitos no estimulados (fondo) de la absorbancia obtenida con los sobrenadantes de linfocitos estimulados por la Concanavalina-A. Los linfocitos de cada ratón fueron cultivados por triplicado cuando se incubaron en medios con y sin Concanavalina-A. De cada sobrenadante se realizaron tres lecturas colorimétricas para obtener un promedio. Cada grupo experimental estuvo formado por 10 animales. Los ratones desgastados (1) eran los animales que habían recibido las inyecciones IP de estafilococos muertos. Los ratones del grupo control (2) solo recibieron inyecciones IP de solución salina isotónica, mientras los animales sanos (3) no fueron inyectados. Ver además la Figura 6.

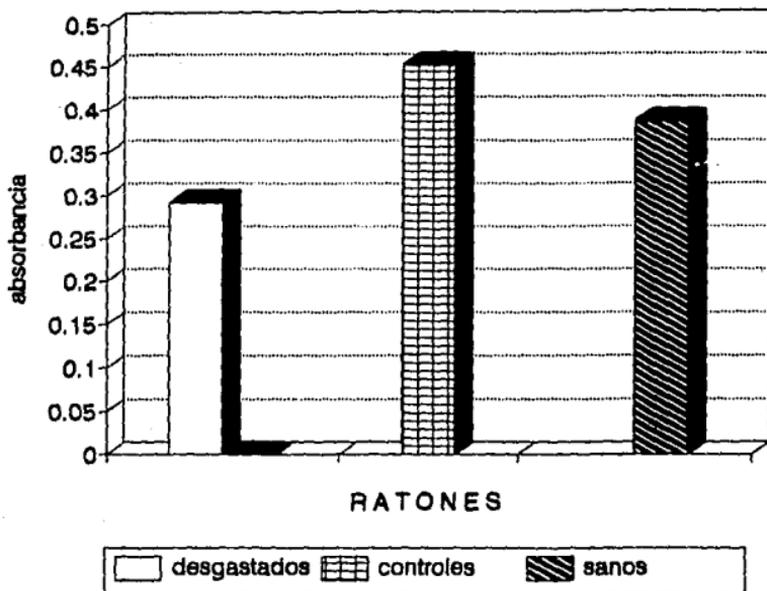


Figura 6. Valores de la absorbancia delta en el sobrenadante de los cultivos de células esplénicas, obtenidas de los ratones incluidos en los tres grupos experimentales. Las barras corresponden a los promedios que fueron obtenidos en los animales sacrificados 1 día después de terminar las inyecciones intraperitoneales.

6.5. REDUCCION DEL MTT POR LINFOCITOS CULTIVADOS EN CONDICIONES BASALES.

Al estudiar los resultados anteriores (absorbancia delta), se presentaron algunas dudas respecto a las causas de la reducción de los valores promedio. Fue evidente que los linfocitos de los ratones desgastados tenían significativamente aumentada su capacidad de reducir el MTT cuando eran cultivados en condiciones basales, es decir sin añadirles Con-A al medio (Tabla 4). Mientras que, cuando estaban en presencia del mitógeno, las lecturas de la absorbancia no diferían entre los tres grupos experimentales (Tabla 5). De este modo se pudo comprobar que, en líneas generales, una disminución en la absorbancia delta se correlacionaba con un aumento proporcional en la absorbancia basal. Después del análisis estadístico, se observó que el aumento en la absorbancia basal resultaba mucho más significativo ($P < 0.001$) que la disminución en la absorbancia delta ($P < 0.05$).

Las diferencias encontradas influyeron para modificar el punto de vista expresado en el párrafo anterior. Al tomar en cuenta las lecturas de la absorbancia basal fue difícil continuar afirmando que los linfocitos de los animales inyectados con estafilococos tenían deprimida su capacidad para responder al estímulo de la Con-A, como lo sugerían los resultados de la absorbancia delta. Las lecturas basales estaban a favor de que los tratamientos IP con estafilococos muertos más bien provocaban una estimulación metabólica de alguna o varias subpoblaciones de

células esplénicas de los ratones. Por esta razón, cuando las células del bazo de los ratones desgastados se cultivaban in vitro, se pudo observar que tenían aumentada su capacidad para reducir el MTT sin necesidad de añadir al medio un mitógeno que estimulara a los linfocitos.

En las dos tablas siguientes se presentan los valores promedio de la reducción del MTT por las células esplénicas, con y sin Con-A en el medio de cultivo. Los resultados de las lecturas individuales, por triplicado, aparecen en el Apéndice I. En la Figura 7 se presenta una gráfica que ilustra la afirmación anterior.

CONDICION EXPERIMENTAL DE LOS RATONES	N	ABSORBANCIA (Fondo) \bar{x}	DESVIACION ESTANDARD	
DESGASTADOS		0.942	0.120	< 0.05
CONTROLES		0.740	0.053	> 0.3
SANOS		0.736	0.109	
< 0.001				

Tabla 4. Valores promedio de las absorbancias obtenidas con los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos que fueron incubados en condiciones basales, es decir sin Concanavalina-A. Se presentan los resultados de los ratones incluidos en los tres grupos experimentales. Se puede observar que los valores de las absorbancias se elevan significativamente en el grupo de los ratones que fueron inoculados con estafilococos ($P < 0.001$). En cambio, no hubo diferencias entre las absorbancias de los sobrenadantes de los cultivos con linfocitos de los ratones inyectados con SSI y no inyectados.

CONDICION EXPERIMENTAL DE LOS RATONES	N	ABSORBANCIA (Con-A) \bar{x}	DESVIACION ESTANDARD	
DESGASTADOS		1.234	0.146	> 0.1
CONTROLES		1.192	0.218	> 0.3
SANOS		1.122	0.137	
				> 0.3

Tabla 5. Valores promedio de la absorbancia del sobrenadante del medio de cultivo cuando los linfocitos esplénicos fueron incubados en presencia del mitógeno Con-A. Se presentan los resultados obtenidos en los tres grupos de ratones que se encontraban en diferentes condiciones experimentales. Se puede observar que los tres valores promedio no difieren significativamente entre si ($p < 0.3$).

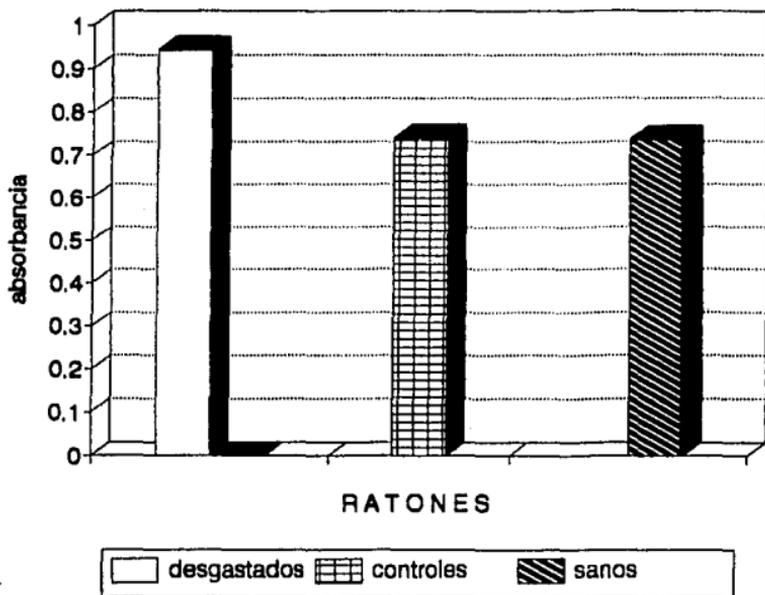


Figura 7. Valores de la absorbancia basal en el sobrenadante del medio de cultivo cuando las células esplénicas, incubadas sin el mitógeno Con-A. Las barras muestran los valores promedio obtenidos, en los tres grupos experimentales, en los animales que fueron sacrificados 1 día después de terminar las inyecciones intraperitoneales.

6.6. EVOLUCION DE LA DISMINUCION DE LA RESPUESTA PROLIFERATIVA (VALORES DELTA) DE LOS LINFOCITOS ESTIMULADOS, EN EL GRUPO DE RATONES DESGASTADOS.

Una vez demostrado que los valores de la absorbancia delta de la respuesta proliferativa de los linfocitos estimulados con la Con-A se encontraban disminuidos en el grupo de ratones desgastados, el paso siguiente fue estudiar la evolución de este descenso durante las dos semanas que siguieron al término del tratamiento IP con estafilococos.

Con este propósito se realizó otro experimento en donde los ratones desgastados, con sus correspondientes controles sanos, fueron sacrificados 1, 5, 10 y 15 días después del tratamiento con las bacterias muertas. Todos los animales fueron utilizados para cultivar in vitro sus linfocitos esplénicos y estudiar la respuesta de los mismos después del estímulo con la Con-A. Los resultados revelaron que la disminución inicial de los valores de la absorbancia delta se acentuaba cinco días más tarde ($P < 0.001$) en el grupo de ratones tratados con estafilococos. Posteriormente, estos animales presentaban una tendencia a recuperar los valores delta de los ratones normales. La evolución de la respuesta se puede apreciar en la Figura 8. Los resultados se presentan en la Tabla 6.

Al comparar los resultados de la absorbancia delta después de estimular los linfocitos con el mitógeno, se observaron dos fenómenos diferentes. . Primero, tanto en los animales desgastados como en sus controles sanos los valores obtenidos con los ratones sacrificados en las dos primeras fechas (1 y 5 días postratamiento) fueron significativamente inferiores a los resultados de las dos últimas (10 y 15 días postratamiento). Sin embargo, los valores delta obtenidos con los linfocitos de los ratones desgastados siempre fueron inferiores a los de los ratones normales, particularmente 1 y 5 días postratamiento, donde las diferencias resultaron estadísticamente significativas. Ver la Figura 8.

CONDICION EXPERIMENTAL DE LOS RATONES	DIAS POSTRATAMIENTO IP				
	1	5	10	15	
DESGASTADOS	0.292	0.176	0.417	0.544	F = 12.07
	0.083	0.106	0.122	0.334	P < 0.001
SANOS	0.386	0.374	0.507	0.568	F = 3.25
	0.102	0.049	0.194	0.286	P < 0.05

Tabla 6. Valores promedio de la absorbancia delta obtenidos con los sobrenadante de los cultivos, 1, 5, 10 y 15 días después del tratamiento IP, utilizando linfocitos esplénicos de los ratones desgastados y de sus correspondientes controles sanos. Los resultados revelan que la evolución de la respuesta linfoproliferativa fue similar en los dos grupos, aunque los valores delta obtenidos en el grupo de los ratones desgastados fueron significativamente inferiores a los del grupo de ratones normales. Los valores que aparecen en los renglones superiores corresponden a los promedios de la absorbancia, mientras que los de los renglones inferiores representan la desviación estandar correspondiente. Los resultados individuales se presentan en el Apéndice I.

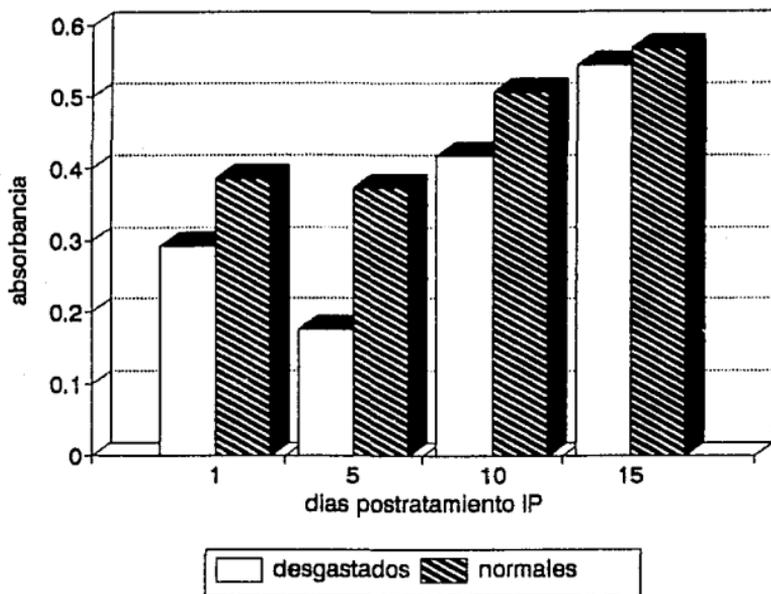


Figura 8. Representación gráfica, con barras, de las similitudes y las diferencias que se encontraron al comparar la evolución de los valores promedio de la absorbancia delta. La reducción del MTT se llevó a cabo con los linfocitos de los ratones desgastados y los de sus correspondientes controles normales, 1, 5, 10 y 15 días después de terminar el tratamiento IP.

6.7. EVOLUCION DEL AUMENTO EN LA ABSORBANCIA BASAL DEL SOBRENADANTE, EN LOS CULTIVOS DE LINFOCITOS NO ESTIMULADOS, DE LOS RATONES DESGASTADOS.

Dos diferencias importantes fueron observadas al comparar la evolución de la capacidad para reducir el MTT en dos poblaciones de linfocitos, obtenidas de animales desgastados y de sus controles sanos, cuando fueron cultivados en un medio que no contenía el mitógeno Con-A.

Por una parte, en el grupo de los ratones sanos la absorbancia basal se mantuvo sin grandes variaciones ($p > 0.7$) desde el día 1 al día 15 postratamiento. En cambio, en el otro grupo de ratones, desgastados por las inyecciones con estafilococos, los valores de la absorbancia basal elevada en el primer día contrastaron significativamente ($P < 0.001$) con una tendencia a la normalización durante los días siguientes.

La otra diferencia, que puede observarse en la Tabla 7, se obtuvo al comparar los promedios de la absorbancia basal del sobrenadante en los cultivos de linfocitos de los dos grupos de ratones. Nuevamente fue evidente que las diferencias estadísticamente significativas observadas el primer día se fueron atenuando paulatinamente hasta llegar a desaparecer al final del experimento, dos semanas después de terminado el tratamiento IP.

Estos resultados indican que, una vez concluido el período

de inyecciones IP con estafilococos e iniciado el otro período de recuperación física e inmunológica, el estado de hiperactividad metabólica de las células esplénicas de los ratones desgastados fue disminuyendo paulatinamente hasta llegar a la normalidad 15 días más tarde. Los valores promedio de estos fenómenos se presentan en la Tabla siguiente y los correspondientes valores individuales aparecen en el Apéndice I.

CONDICION EXPERIMENTAL DE LOS RATONES	DIAS POSTRATAMIENTO				
	1	5	10	15	
DESGASTADOS	0.942	0.756	0.891	0.728	F = 11.41
	0.120	0.092	0.076	0.094	P < 0.001
SANOS	0.736	0.746	0.712	0.714	F = 0.45
	0.109	0.062	0.115	0.179	P > 0.7

Tabla 7. Valores promedio de la absorbancia basal, con linfocitos esplénicos no estimulados que habían sido obtenidos de ratones desgastados y de sus correspondientes controles sanos. Se puede observar que, en el caso de los animales desgastados, la capacidad para reducir el MTT disminuye paulatinamente durante las dos semanas siguientes al tratamiento con estafilococos por vía IP y, como una consecuencia, se encuentran diferencias significativas entre las determinaciones realizadas en las cuatro fechas señaladas. En cambio, en el caso de los ratones normales, los valores de la absorbancia se mantienen sin cambios durante esas dos semanas y no existen diferencias significativas entre ellos.

6.8. REDUCCION DEL MTT POR LOS LINFOCITOS DE LOS RATONES CONTROL INYECTADOS CON SOLUCION SALINA IP.

Cuando fueron cultivadas *in vitro*, con y sin Concanavalina-A, las células esplénicas de los ratones inyectados IP con SSI redujeron el colorante MTT en una forma similar a las células esplénicas de los ratones normales. Cuando las células se obtuvieron de ratones que habían sido sacrificados un día después de terminar las inyecciones IP de SSI, los valores de la absorbancia en el sobrenadante del medio de cultivo no mostraron el aumento basal y la disminución delta que habían sido encontrados en los cultivos de células de ratones desgastados. Estos resultados ya fueron incluidos en las Tablas 3, 4 y 5. Por otra parte, los valores de la absorbancia se mantuvieron sin grandes variaciones cuando los ratones inyectados con SSI fueron sacrificados 5, 10 y 15 días más tarde. Estos últimos resultados se presentan en la Tabla 8 y se pueden apreciar gráficamente en la Figura 9.

CONDICION EXPERIMENTAL DE LOS RATONES	DIAS POSTRATAMIENTO IP				
	1	5	10	15	
CONTROLES (1)	1.192	1.256	1.252	1.278	F = 0.7
	0.218	0.084	0.079	0.108	P < 0.5
SANOS (2)	1.122	1.120	1.170	1.121	F = 2.2
	0.137	0.076	0.142	0.188	P < 0.1

Tabla 8. Valores promedio de la absorbancia (y sus correspondientes desviaciones estandar) en el sobrenadante de los cultivos de células esplénicas más Con-A. Los resultados corresponden a las células de los ratones que fueron inyectados IP con SSI durante 1 mes (1) y a las células de los animales sanos que no recibieron ningún tratamiento (2), obtenidas de animales sacrificados 1, 5, 10 y 15 días después de terminar el tratamiento IP.

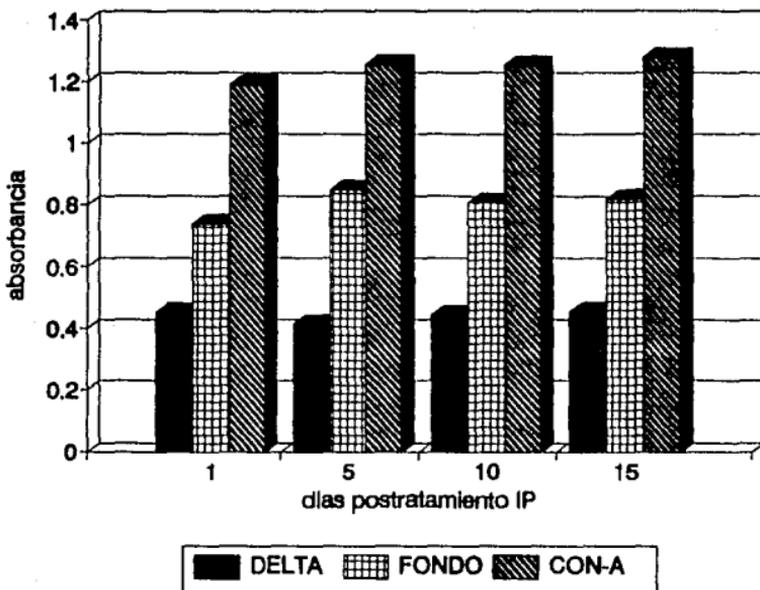


Figura 9. Comparación de los valores promedio de la absorbancia obtenidos en el sobrenadante de cultivos de células esplénicas de ratones Balb/c que fueron inyectados durante 1 mes con SSI vía IP y sacrificados 1, 5, 10 y 15 días después. Las barras corresponden a los promedios obtenidos con los valores delta, basales y de las células estimuladas con el mitógeno Con-A.

Los resultados del trabajo revelaron que los ratones desgastados mediante inyecciones IP de estafilococos tienen varias alteraciones en la respuesta proliferativa de los linfocitos T. Algunas de esas alteraciones no habían sido descritas hasta ahora en la bibliografía que fue consultada. Este hecho aumenta la importancia de las observaciones realizadas y permite sugerir algunas hipótesis que le pueden dar continuidad a la presente línea de investigación.

La primera parte del trabajo, que trata sobre la estandarización de la técnica colorimétrica, permitió seleccionar la dosis del mitógeno y la cantidad de células que, al reducir el dimetil tiazol tetrazolium (MTT), provocaban los incrementos más significativos en las lecturas de la absorbancia.

Una vez estandarizada la prueba de la reducción del MTT, fue evidente que el metabolismo basal de las células no estimuladas era el responsable de aproximadamente $3/4$ partes de los cambios de color que ocurrían en el sobrenadante del medio de cultivo. Esto se puede apreciar en la Tabla 1. Cuando la proliferación de linfocitos fue estimulada por el mitógeno, los incrementos delta de la absorbancia, solo representaban $1/4$ parte del total

del MTT reducido. Este resultado indicó que cada lectura tenía un "fondo" sumamente elevado, aproximadamente tres veces superior a los incrementos de la absorbancia provocados por el estímulo de la Con-A. Por lo tanto, fue necesario discutir si este hecho representaba o no una limitación en el momento de interpretar los resultados de la prueba.

La prueba de la reducción del MTT mide una función celular diferente a la que revelan otras pruebas aplicadas al mismo estudio de la respuesta proliferativa de los linfocitos estimulados con una sustancia específica. En realidad, la técnica de la reducción del MTT no ha sido propuesta para sustituir las pruebas convencionales, sino como una alternativa que puede simplificar el estudio de la inmunidad celular (63). Lo mismo que en los resultados obtenidos por otros autores (34, 60, 62), en el presente trabajo se encontró que los incrementos en la reducción del colorante, con el consiguiente aumento de la absorbancia del sobrenadante, se correlacionaban perfectamente con la tasa de multiplicaciones celulares que revelaba la incorporación de la [³H]-timidina al núcleo.

Sin embargo, es conveniente tener en cuenta que, cuando se cultivan poblaciones heterogéneas de células, la existencia de un valor de absorbancia basal elevado (causado por la actividad metabólica de las células no estimuladas) debe ser considerado como un factor que puede influir sobre los resultados de la absorbancia delta y que, por lo tanto, debe ser evaluado independientemente. Existe la posibilidad de que, en el caso

de personas o animales con algunas infecciones o sometidos a diversos estímulos, aumente el metabolismo de las células en reposo o disminuya la proporción de los linfocitos que pueden ser estimulados por mitógenos. En estos casos, se puede obtener una reducción significativa de los valores de la absorbancia delta en el sobrenadante de las células estimuladas y esta disminución puede resultar estadísticamente significativa en el momento de comparar la absorbancia obtenida en una población control con la absorbancia del sobrenadante de las células de los animales problema. Esta dificultad podría ser atenuada si la prueba de la reducción del MTT se aplicara a subpoblaciones purificadas de linfocitos o si la estimulación no se realizara con mitógenos sino con anticuerpos monoclonales específicos para ciertas subpoblaciones. En el caso de utilizar los mitógenos convencionales, sería recomendable seleccionar el que tuviera mayor actividad mitogénica. Las lectinas que provocan las estimulaciones más débiles o las que actúan sobre una menor cantidad de células también pueden influir para que los resultados se expresen como incrementos delta muy pequeños, lo cual puede reducir las posibilidades de encontrar diferencias entre las respuestas de linfocitos obtenidos de individuos que se encuentran en diferentes condiciones clínicas.

Estas dificultades para interpretar los resultados de la técnica colorimétrica fueron tomados en cuenta en el momento de estandarizar la prueba. Así por ejemplo, se observó que la reducción del MTT podía revelar resultados diferentes según la forma de informar las lecturas de la absorbancia. La mayor

parte de los trabajos publicados que se consultaron respecto a la reducción del colorante (34, 63) refieren los resultados como valores delta o como el índice obtenido después de dividir la absorbancia del sobrenadante en los cultivos de células estimuladas entre la absorbancia del sobrenadante en los cultivos de células que estaban en condiciones basales. De acuerdo a nuestro punto de vista, esta forma de procesar y presentar los resultados puede proporcionar una información que no refleja fielmente los cambios en el metabolismo de las diferentes células esplénicas.

De acuerdo a los resultados de los experimentos para estandarizar la prueba de la reducción del MTT, se recomienda que tanto los valores de la absorbancia delta, de la absorbancia basal y de la absorbancia del sobrenadante de las células estimuladas deben ser analizados en una forma independiente, porque cada uno de ellos revela diferentes aspectos de la condición metabólica de las células cultivadas.

La capacidad de los linfocitos T esplénicos para reducir el colorante MTT después de recibir la estimulación de un mitógeno, debe ser interpretada después de estudiar la absorbancia en condiciones basales y de comparar estos resultados con los obtenidos en el sobrenadante de las células estimuladas. Los valores delta o los índices de reducción representan una información adicional que puede ser aceptada siempre y cuando las lecturas de la absorbancia basal no revelen diferencias entre los grupos experimentales.

La segunda parte del trabajo trata sobre la posibilidad de que, cuando se estudia la proliferación de los linfocitos cultivados y estimulados, el procedimiento de la incorporación nuclear de la timidina tritiada puede ser substituido por la técnica de la reducción de las sales de MTT. Al comparar los resultados de las dos pruebas, realizadas sobre varias poblaciones de linfocitos esplénicos de ratones normales, se obtuvo una correlación aceptable que aparece en la Figura 4. No obstante, las dos pruebas tienen una sensibilidad diferente. El método isotópico tiene una sensibilidad superior a la del colorimétrico (61).

De acuerdo a los resultados de la estandarización, en cada pozo de la microplaca fueron colocadas 300×10^3 células de ratones normales y 2 ug/ml de Con-A. En estas condiciones los resultados de la lectura de la absorbancia en el sobrenadante se correlacionaron perfectamente con la incorporación de la [3 H]-timidina. Esto fue interpretado en favor de que la prueba colorimétrica representaba una alternativa de utilidad y podía medir, en una forma significativamente reproducible, la respuesta proliferativa de los linfocitos T de los ratones normales, cuando las células eran cultivadas in vitro y estimuladas con el mitógeno mencionado.

Sin embargo, en otras condiciones, utilizando un mitógeno menos potente o administrando un tratamiento inmunosupresor a los animales, es posible que la prueba de la reducción del MTT no alcance a tener la suficiente sensibilidad para permitir apreciar algunas diferencias entre la respuesta proliferativa de los linfocitos T de animales que tienen diferente grado de competencia inmunológica. En estos casos, la técnica de la incorporación de la [³H]-timidina ofrece mayor sensibilidad que la prueba colorimétrica, como ya ha sido informado por otros autores (61).

De todos modos, la técnica de la reducción del MTT tiene varias ventajas que la convierten en una alternativa recomendable cuando la prueba de la incorporación nuclear de la [³H]-timidina no es accesible. La prueba colorimétrica tiene menor costo, resulta relativamente fácil de estandarizar, permite medir fielmente la respuesta proliferativa de los linfocitos T de los animales normales y tiene un alto grado de reproducibilidad. Además, consume menos tiempo y representa menos riesgos para la salud del personal de laboratorio que la prueba isotópica. Estas ventajas podrían ser magnificadas si, en el momento de interpretar los resultados, se toma en cuenta la condición inmunológica de la persona o el animal del cual proceden los linfocitos. Conviene recordar que la prueba del MTT mide la actividad metabólica de las células. Nosotros podemos encontrar con suficiente exactitud que esta actividad se encuentra aumentada cuando los linfocitos normales se dividen después de la estimulación con un mitógeno. Sin embargo, es conveniente no olvidar que la condición clínica en

la cual se encuentra el paciente o el animal de laboratorio también pueden modificar los valores de la absorbancia en una forma independiente a la tasa de multiplicaciones de los linfocitos.

Como la prueba del MTT resulta una medida "indirecta" de la proliferación celular, tiene todos los riesgos e inconvenientes de los procedimientos que no miden un evento primario sino el secundario o el terciario. Por estas razones, su aplicación exige diversos controles y, algunas veces, para la aceptación de los resultados es necesario conocer la condición clínica e inmunológica del individuo donador de las células.

La tercera parte del trabajo estudió si, después de un tratamiento IP con estafilococos, los ratones desgastados tenían modificada o no la respuesta de los linfocitos T estimulados con la Con-A. Los resultados revelaron varios aspectos interesantes de la inmunidad celular del animal desgastado. El uso de la prueba de la reducción del MTT permitió obtener una información del estado de la CMI del animal desgastado que, probablemente, no hubiera sido detectada con la técnica de la incorporación de la [³H]-timidina.

En los cultivos que se realizaron con las células esplénicas de ratones sacrificados un día después de haber terminado las inyecciones IP de estafilococos, se obtuvieron tres resultados diferentes que parecían contradictorios.

Primero, los valores de la absorbancia delta resultaron significativamente inferiores en el grupo de ratones desgastados en relación a los otros dos grupos de animales ($P < 0.05$). Segundo, en el mismo grupo de animales desgastados y en contraste con el resultado anterior, los valores de la absorbancia basal fueron significativamente superiores a los obtenidos en los cultivos de células de los controles ($P < 0.001$). Tercero, en cambio, en los cultivos de células a las cuales se añadía Con-A, la absorbancia del sobrenadante resultó similar en los tres grupos de animales, desgastados y no desgastados ($P > 0.3$). Quince días más tarde, los valores promedio de la absorbancia (basal, delta y de las células estimuladas), en los sobrenadantes de los cultivos, no revelaron diferencias entre la capacidad de las células de los tres grupos de ratones para reducir el MTT.

Para los propósitos de nuestro trabajo, estos tres resultados de la reducción del MTT por las células esplénicas de los animales desgastados deben ser analizados en una forma independiente, porque pueden revelar la existencia de dos fenómenos distintos. Uno de estos fenómenos, en el cual es necesario pensar si se toman en cuenta los valores de la absorbancia delta, puede ser que los animales desgastados tienen disminuida su capacidad para responder a la Con-A. Sin embargo, también puede ocurrir que las condiciones experimentales de estos animales modifican el contenido de linfocitos T en el bazo. Esto último puede suceder a causa de que el órgano es

infiltrado por células mononucleares procedentes de otros tejidos o de la cavidad peritoneal o, también, porque los linfocitos T abandonan el bazo o porque mueren a causa del tratamiento que reciben los animales. A la inversa, un aumento en los valores de la absorbancia basal a causa de una mayor cristalización de las sales del MTT puede indicar una mayor actividad metabólica o proliferativa de los linfocitos T que son estimulados por el TNF o alguna otra citocina liberada por los macrófagos. Sin embargo, el mismo aumento de la absorbancia basal puede estar relacionado con un incremento en la proporción de las otras subpoblaciones de células que, espontáneamente o no, tienen aumentada su actividad metabólica a causa de las condiciones del experimento que, en este caso, serían las inyecciones IP de estafilococos muertos.

Si se toman en cuenta únicamente los valores de la absorbancia basal o de la absorbancia del sobrenadante en los cultivos de las células estimuladas, los resultados coinciden con los de otros experimentos que habían sido realizados previamente. Así por ejemplo, los linfocitos T de los ratones desgastados no tenían disminuida su capacidad para inducir una reacción local GvH (21) ni tampoco perdían su capacidad para rechazar aloinjertos de piel (8). Todos estos resultados pueden ser considerados como reacciones paradójicas o contradictorias, ya que los ratones desgastados mediante inyecciones IP de estafilococos tienen un timo reducido de tamaño (que ha sido calificado "atrófico"), una linfopenia acentuada y ganglios linfáticos de menor tamaño que los de los animales control (8). A todo esto se puede añadir que la

literatura consultada reúne una larga serie de observaciones en favor de que las personas y los animales de laboratorio que se encuentran sujetos a condiciones desgastantes y que tienen linfopenia y timo hipoplásico, generalmente presenta un compromiso importante de la CMI. Como ejemplos se pueden citar los casos de las personas infectadas con el HIV (49) o el de los niños con una desnutrición proteico-calórica grave (68).

Si suponemos que la totalidad de las células esplénicas son linfocitos y si solamente se toman en cuenta los valores de la absorbancia basal, los resultados de nuestro trabajo podrían ser interpretados como una paradoja mucho mayor.

Las células mononucleares, no estimuladas, de los ratones desgastados mostraron un aumento significativo de su capacidad para reducir el MTT ($P < 0.001$) cuando los ratones eran sacrificados 1 día después de terminar las inyecciones IP de estafilococos. Sin embargo, cinco días más tarde, las células esplénicas no estimuladas de los ratones desgastados recuperaron su metabolismo normal y redujeron las mismas cantidades de MTT que las células esplénicas de los animales control.

Todos los comentarios anteriores muestran las dificultades y las contradicciones que aparecen en el momento de expresar los resultados de la reducción del MTT como un promedio único, bien sea este absorbancia delta o absorbancia basal. En un caso la

prueba revelaría que la actividad metabólica de los linfocitos se encontraba disminuida y en el otro caso la misma prueba mostraría un resultado completamente opuesto. Las dos interpretaciones corresponderían a los cultivos realizados con las células de los ratones desgastados que fueron sacrificados inmediatamente después de terminar los ciclos de inyecciones IP con estafilococos muertos.

Nosotros creemos que en los días siguientes a la inducción del desgaste, el aumento en la absorbancia basal y la disminución en la absorbancia delta revelan que, posiblemente, sobre nuestros resultados influyeron dos fenómenos distintos muy importantes. El primero de ellos podría ser un aumento significativo en la proporción de macrófagos y/o monocitos contenidos en la suspensión de células esplénicas de los animales desgastados. El segundo consistiría en el estado de hiperestimulación en el cual se encontrarían esas células fagocíticas después del curso de inyecciones IP utilizando la suspensión de estafilococos muertos. Las dos proposiciones deben ser tomadas en cuenta en el momento de discutir la condición inmunológica del animal desgastado.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, se propone la hipótesis de que las células esplénicas del ratón desgastado se encuentran sobreestimuladas. Además, se considera que las principales manifestaciones clínicas del síndrome y la depresión observada en la síntesis de anticuerpos son una consecuencia indirecta del exceso de estimulaciones IP con

estafilococos y no de la desnutrición asociada. Para fundamentar la proposición anterior se van a utilizar los resultados de la reducción del MTT obtenidos uno y cinco días después de terminar el tratamiento IP con estafilococos.

Cuando las células de los ratones desgastados no fueron estimuladas in vitro con la Con-A, el exceso de sales de formazán en el medio de cultivo indica un aumento del metabolismo celular en condiciones basales. Nuestro experimento no estuvo diseñado para aclarar cuáles células podrían ser las responsables de este aumento en la absorbancia basal. Por eso no tenemos resultados en favor de una u otra población. Sin embargo, creemos que solo puede existir una alternativa : los linfocitos T o los macrófagos. Cualquiera de las dos poblaciones de células esplénicas pudo tener elevada su actividad metabólica a causa de las condiciones experimentales a las cuales estuvieron sometidos los ratones desgastados. Si las células estimuladas fueran los macrófagos, los responsables de su activación in vivo serían los estafilococos muertos que fueron inyectados durante un mes por vía IP. En el caso de los linfocitos, los responsables de su activación y/o proliferación in vivo serían las citocinas liberadas por los macrófagos activados. En el caso de los ratones sacrificados uno o dos días después de terminar las inyecciones de estafilococos muertos, estas dos poblaciones de células, estimuladas metabólicamente, continuarían activadas después de sacrificar los ratones y durante el cultivo en condiciones basales, es decir sin Con-A. Ellas podrían ser las responsables del incremento en la absorbancia basal.

Existen varios trabajos publicados recientemente por otros autores que confirman nuestro punto de vista. La inyección endovenosa de estafilococos muertos a conejos (73) provoca anomalías fisiológicas similares a las observadas cuando se inyectan endotoxinas o bacterias Gram-negativas. La activación del complemento, necrosis de tejidos, trombocitopenia, agregación de leucocitos polimorfonucleares, hipotensión y el estado de shock de los conejos ya habían sido provocados experimentalmente mediante la inyección de TNF (74). En el caso de los conejos inyectados con estafilococos muertos (73), la concentración de estas citocinas en el suero fue encontrada aumentada significativamente. La interleucina-1 también puede provocar un estado de shock similar cuando se inyecta a los conejos (75). Los mismos aumentos de la producción de TNF han sido provocados por Pneumocystis carinii (76), Toxoplasma gondii (77) y el HIV-1 (78), así como después de la interacción in vitro de los macrófagos con Candida albicans, Plasmodium vivax o tripanosomas.

Sin embargo, no se debe tratar de comparar el deterioro de la CMI en personas o animales parasitados o infectados en una forma crónica con la respuesta estimulada, en condiciones basales, de los ratones de nuestro experimento. Los animales inyectados con estafilococos muertos no estaban infectados ni parasitados, las dosis de bacterias muertas solo fueron aplicadas cada tercer día y el ciclo de inyecciones IP solo se prolongó 28 días.

Estas diferencias conducen a dos preguntas importantes. Con cuáles otras enfermedades desgastantes, humanas o inducidas experimentalmente en animales, se podría comparar la condición clínica e inmunológica del ratón inyectado con estafilococos muertos ?. Los cambios observados en la respuesta de las células esplénicas cultivadas, con o sin Con-A, representan un fenómeno exclusivo del ratón desgastado con estafilococos o son reacciones compartidas por cualquier organismo vertebrado que es estimulado con productos bacterianos durante cierto tiempo ?.

La sobrestimulación de los macrófagos peritoneales con productos bacterianos, por vía IP y durante 1 mes, provocó la aparición de manifestaciones diferentes a las del shock tóxico que ha sido inducido por otros autores (73) al inyectar conejos con estafilococos muertos por vía endovenosa. En estos casos, los síntomas similares al shock se relacionan con un aumento en la producción de TNF. En los animales de este experimento (73) las bacterias muertas fueron inyectadas por vía endovenosa y esta puede haber sido la diferencia que provocó resultados diferentes a los que nosotros presentamos en este trabajo. No obstante, creemos que en las dos situaciones se provocó una estimulación de los macrófagos y la liberación de cantidades diferentes de TNF.

Por otra parte, el desgaste físico e inmunológico de los pacientes con algunas parasitosis crónicas, paludismo por ejemplo, también ha sido atribuido a la liberación de TNF. Sin embargo, en estos pacientes se ha encontrado una disminución en la

respuesta proliferativa de los linfocitos T (51, 52, 53). Todas estas observaciones sugieren que el TNF y varias otras citocinas inmunomoduladoras pueden estimular y/o deprimir la CMI. Estos efectos diferentes dependen de la magnitud y del tiempo de estimulación. Aparentemente, la depresión de la CMI se observa cuando personas o animales de laboratorio producen grandes cantidades de TNF durante cierto tiempo. Esta situación generalmente está asociada con el paso a la sangre o la inyección endovenosa de los parásitos o las bacterias. Conviene tener en cuenta que tanto las manifestaciones del shock como las lesiones tisulares de esos animales no han sido atribuidas directamente a la acción del TNF. Aparentemente, el factor activador de las plaquetas (PAF) y el quinto componente del sistema complemento (C5) son los mediadores de los efectos provocados por el TNF (81).

En el caso de los animales desgastados de nuestro modelo, la sobreestimulación con estafilococos muertos provocó una serie de trastornos en la respuesta de los linfocitos después de la estimulación in vitro con el mitógeno Con-A. La respuesta basal aumentada después de la estimulación, es un resultado diferente a los que hemos mencionado en los párrafos anteriores. Esta diferencia probablemente depende de la cantidad de bacterias inyectadas. El deterioro físico e inmunológico de los ratones desgastados no se puede comparar con el de los pacientes con enfermedades crónicas. Más bien, el desgaste observado en el presente trabajo resulta comparable al de los pacientes que tienen infecciones agudas graves.

Un aspecto importante de esta discusión consiste en distinguir que la sobreestimulación de los macrófagos es un fenómeno diferente al de sobrestimulación de los linfocitos. No tenemos actualmente resultados que nos permitan proponer si los animales desgastados se encuentran en alguna de estas dos condiciones. Sin embargo, no parece probable que la disminución de la absorbancia delta haya sido un fenómeno comparable al observado por Suzuki y colaboradores (67), quienes encontraron una disminución de la respuesta proliferativa de linfocitos sobreestimulados. Ellos utilizaron diferentes clonas de células T, las cuales fueron estimuladas con altas concentraciones de antígenos específicos. Sus resultados indican que, en esas condiciones, los linfocitos tenían una falla para dividirse. Es probable que los cultivos de células de los animales desgastados contuvieran una mayor proporción de macrófagos sobrestimulados *in vivo* y que la actividad metabólica de ellos haya influido en los resultados de la reducción del MTT.

En el caso de nuestros resultados, la absorbancia delta puede disminuir, en una forma secundaria, cuando la absorbancia basal se encuentra elevada. Un día después de terminar las inyecciones de estafilococos, el incremento de la absorbancia basal resultó más significativo que la disminución de la absorbancia delta.

En defensa de la hipótesis que se propone, estamos de

acuerdo con los trabajos publicados por otros autores en favor de que el TNF liberado por los macrófagos puede actuar como un inductor o estimulante de la CMI (42). En este sentido, la molécula de TNF se comporta de una manera similar a la IL-2 (43). Por otra parte, algunos trabajos experimentales realizados con animales sanos han mostrado que el TNF estimula las funciones de los linfocitos T en la misma forma que deprime las funciones de los linfocitos B (79). La liberación prolongada de TNF por los macrófagos peritoneales puede ser considerada como responsable de las anormalidades encontradas en la síntesis de anticuerpos por los ratones desgastados. Trabajos publicados por otros autores demuestran que las inyecciones de caquectina/TNF tienen un efecto deletéreo sobre la subpoblación de linfocitos B.

Nosotros discutimos también la posibilidad de que el incremento observado en la absorbancia basal sea indicativo de una mayor tasa de multiplicaciones en los linfocitos que no fueron estimulados por la Con-A. Existe la posibilidad de que el aumento de la absorbancia basal en el sobrenadante de los cultivos de células esplénicas del grupo de ratones desgastados, probablemente refleje una mayor tasa de actividad metabólica o un mayor número de multiplicaciones de los linfocitos T no estimulados. Sin embargo, también se debe considerar la posibilidad de que la población de células esplénicas de los animales inyectados con estafilococos se encuentra infiltrada por macrófagos o monocitos activados y que estas células emigradas pueden ser las responsables del aumento observado en la reducción

del MTT cuando el cultivo se encuentra en condiciones basales.

Al final de esta discusión y tomando en cuenta los resultados obtenidos cinco días después de terminar las inyecciones IP con estafilococos, resulta razonable aceptar la posibilidad de que, además de la probable alteración en la producción de TNF (apoyada en los resultados de varios trabajos realizados por otros autores), varias citocinas más influyeron para modificar la actividad metabólica de las células de los animales desgastados. Probablemente el desgaste se acompaña de trastornos en los mecanismos que modulan la respuesta de células T, como la producción de IL-2, IL-4, interferones o prostaglandinas. Esta última substancia resulta importante porque tiene una actividad moduladora negativa en la respuesta de células T. Las alteraciones inmunológicas de los animales desgastados puedan relacionarse con un deterioro en los mecanismos que modulan la respuesta de células T. Los cambios en la modulación de los linfocitos T pueden ser los responsables de la depresión en la síntesis y formación de anticuerpos que caracteriza el desgaste (20).

El capítulo de la inmunomodulación que llevan a cabo las interleucinas es muy amplio y todavía no se conoce completamente. La mayor parte de los resultados que han sido obtenidos provienen de experimentos realizados in vitro. Los cambios que pueden ocurrir en el curso de infecciones y enfermedades desgastantes graves o crónicas son difíciles de reproducir, completamente, en

un tubo de ensaye o en el pozo de una microplaca. Por otra parte, no son abundantes los trabajos de investigación clínica que ofrezcan información sobre los cambios de la inmunomodulación en el curso de las interacciones del hospedero con productos de los microorganismos o parásitos.

Al final de esta discusión, en el capítulo siguiente, presentamos las conclusiones del presente trabajo. Creemos que los resultados obtenidos han abierto una nueva puerta para comprender la inmunidad del animal desgastado. Los resultados obtenidos van a permitir explorar nuevos aspectos de las interacciones entre el hospedero y los agentes, exógenos y endógenos, que pueden provocar la aparición de enfermedades desgastantes. Es indudable que, al aumentar el conocimiento sobre todas estas interacciones, vamos a quedar mejor preparados para intentar la prevención o el tratamiento de las complicaciones que aparecen en el curso de las enfermedades prolongadas. El resultado solo puede ser mejorar la calidad de la vida de estas personas.

CAPITULO 8. CONCLUSIONES.

la prueba colorimétrica de la reducción del MTT permitió estudiar la inmunidad celular de los ratones y proporcionó resultados comparables a los de la incorporación nuclear de la [³H]-timidina ($r = 0.877$). La relativa sencillez de la prueba colorimétrica y la facilidad con la que pudo ser estandarizada permiten proponerla como una alternativa confiable para el estudio de la inmunidad celular. Así mismo, se recomienda que se estudie la posibilidad de introducirla en el laboratorio clínico de algunos hospitales que no cuentan con recursos para trabajar con isótopos, porque podría ser de utilidad en el momento de estudiar la respuesta proliferativa de linfocitos T de pacientes en los cuales se sospeche un compromiso de la inmunidad celular.

Se confirmó que las inyecciones intraperitoneales con estafilococos provocan la aparición de un síndrome desgastante que se caracteriza por pérdida de peso, infecciones frecuentes y un alto índice de mortalidad.

En condiciones basales, es decir sin recibir el estímulo de la Con-A, los linfocitos de los ratones desgastados tienen

aumentada su capacidad de reducir el colorante MTT cuando los estudios se realizaron un día después de terminar las inyecciones intraperitoneales de estafilococos. Este resultado fue interpretado como un aumento en el metabolismo de los macrófagos esplénicos a causa de su interacción con los productos de las bacterias. Es probable que, además, en las células el bazo se encuentre aumentada la proporción de macrófagos respecto a la de linfocitos.

El aumento en la actividad metabólica de las células esplénicas no estimuladas sugiere la posibilidad de que los macrófagos del animal desgastado tengan aumentada la producción de algunas citocinas, como IL-1 y TNF, las cuales pueden ser las responsables del deterioro físico e inmunológico que caracteriza al desgaste.

Los valores de la absorbancia delta se encontraron disminuidos en los sobrenadantes de los cultivos de células esplénicas de ratones desgastados. Esta disminución significativa de los valores promedio fue evidente cuando las células, obtenidas de animales sacrificados uno y cinco días después de terminar el tratamiento con estafilococos, fueron cultivadas en presencia de Concanavalina A. La disminución de la absorbancia delta fue considerada como la imagen en espejo del aumento obtenido al medir la absorbancia basal. Sin embargo, como los resultados solo se complementan parcialmente, se sugiere la posibilidad de que el desgaste también provoque una disminución del número y/o la competencia de los linfocitos en el bazo de los

animales que recibieron las inyecciones de estafilococos.

La normalización de los resultados, quince días después de terminar el tratamiento IP, confirma el carácter transitorio de la inmunodeficiencia secundaria a la inyección de estafilococos muertos.

Los cambios observados al medir la capacidad de las células esplénicas para reducir el colorante MTT, fueron completamente diferentes a los que habían sido encontrados al medir la respuesta de anticuerpos de animales con el mismo síndrome experimental. Sin embargo, en el trabajo se propone la hipótesis de que todos ellos son la expresión de una excesiva producción de citocinas por parte de macrófagos hiperestimulados con estafilococos.

CAPITULO 9. RESUMEN.

El presente trabajo tuvo como objetivos estandarizar la prueba colorimétrica de la reducción del MTT, comprobar que la reacción resulta de utilidad para medir la proliferación de linfocitos estimulados con un mitógeno convencional y utilizarla para demostrar los cambios que una enfermedad desgastante experimental puede provocar en la respuesta celular de ratones recién nacidos.

Los resultados demostraron que la reducción del MTT es una prueba de bajo costo y de fácil estandarización. Además, se encontró que, después de la estimulación *in vitro* de los linfocitos esplénicos, las lecturas colorimétricas del sobrenadante se correlacionaron en una forma estadísticamente significativa con las lecturas isotópicas de la [³H]-timidina incorporada al núcleo. Por otra parte, cuando la reacción colorimétrica fue aplicada al estudio de la inmunidad celular de ratones desgastados, la prueba del MTT resultó útil para revelar que los linfocitos de los animales inmunocomprometidos presentaban una reducción de los valores de la absorbancia delta y un aumento de los valores de la absorbancia basal.

La respuesta proliferativa de los linfocitos estimulados con el mitógeno Con-A fue evaluada 1, 5, 10 y 15 días después de terminar el tratamiento intraperitoneal con estafilocos. Las lecturas de la absorbancia del sobrenadante mostraron que, un día después de terminar las inyecciones de bacterias muertas, las células esplénicas de los animales desgastados tenían aumentado su metabolismo en condiciones basales. En el mismo grupo de ratones, después de añadir Con-A al cultivo, los valores de la absorbancia delta se encontraron disminuidos hasta cinco días más tarde. Dos semanas después de terminar las inyecciones de estafilococos, los animales que habían estado desgastados recuperaron peso y normalizaron su respuesta linfoproliferativa.

En el trabajo se discuten los mecanismos que probablemente son responsables del deterioro físico e inmunológico de los ratones inyectados con estafilococos y se propone como hipótesis que, en el caso concreto de este desgaste experimental, las manifestaciones clínicas y las alteraciones inmunológicas pueden estar provocadas por un aumento en la producción de la citocina TNF.

APENDICE I.

RESULTADOS DE LA ESTIMULACION DE LOS LINFOCITOS ESPLENICOS CON EL MITOGENO CONCANAVALINA-A. EL GRADO DE ACTIVACION DE LAS CELULAS FUE MEDIDO SIMULTANEAMENTE POR LAS PRUEBAS DE LA REDUCCION DEL MTT Y DE LA INCORPORACION NUCLEAR DE LA TIMIDINA TRITADIADA.

Lectura	Absorb. Con-A	Absorb. Fondo	Absorb. Delta	cpm Con-A	cpm Fondo	cpm delta
1	1.015	0.709	0.306	200473	2897	197576
2	1.016	0.738	0.278	182461	2830	179631
3	0.985	0.744	0.241	180568	2255	178313
4	1.248	0.708	0.540	518483	5025	513458
5	1.280	0.708	0.572	602563	3847	598716
6	1.347	0.732	0.615	661299	4876	656423
7	1.265	0.782	0.483	504046	5843	498203
8	0.933	0.588	0.345	424656	7218	417438
9	1.140	0.776	0.364	407378	6566	400812
10	0.954	0.715	0.239	97203	12900	84303
11	0.730	0.490	0.240	208177	4918	203259
12	0.997	0.761	0.236	258080	3520	254560
13	1.143	0.797	0.346	438348	11593	426755
14	1.239	0.725	0.514	456423	9515	446908
15	1.122	0.740	0.382	338163	4757	333406
16	1.150	0.577	0.573	480528	6628	473900
17	1.234	0.771	0.463	479357	8700	470657
18	1.077	0.769	0.308	144169	9936	134233
19	0.984	0.769	0.215	100000	9779	90221
20	1.030	0.764	0.266	142130	8420	133710
21	1.108	0.833	0.275	414278	5584	408694
22	1.133	0.809	0.324	372513	6528	365985
23	1.200	0.817	0.383	366036	7743	358293
24	0.723	0.528	0.195	164482	14583	149899
25	0.698	0.524	0.174	155090	12429	142661
26	1.088	0.700	0.388	394992	17700	377292
27	1.077	0.628	0.449	396660	16101	380559
28	1.108	0.571	0.537	410050	10734	399316
29	0.861	0.499	0.362	271300	15609	255691
30	0.843	0.574	0.269	210822	15117	195705
31	0.903	0.601	0.302	217304	9147	208157
32	0.893	0.556	0.337	318430	5484	312946

LECTURAS DE LA ABSORBANCIA DEL SOBRENADANTE, DESPUES DE LA REDUCCION DEL MITT, EN LOS CULTIVOS DE LOS LINFOCITOS ESPLENICOS DE RATONES DESGASTADOS QUE FUERON SACRIFICADOS 1, 5, 10 Y 15 DIAS DESPUES DE TERMINAR LAS INYECCIONES IP CON ESTAFILOCOCOS MUERTOS.

Ratón	día	Fondo	Absorbancia (*)	
			Con-A	Delta
1	1	0.940	1.280	0.340
2	1	0.739	0.979	0.240
3	1	0.917	1.262	0.345
4	1	0.944	1.337	0.393
5	1	0.940	1.363	0.423
6	1	0.787	1.055	0.268
7	1	1.021	1.297	0.276
8	1	1.163	1.437	0.274
9	1	1.038	1.247	0.209
10	1	0.933	1.088	0.155
11	5	0.760	0.873	0.113
12	5	0.884	1.000	0.116
13	5	0.740	0.860	0.120
14	5	0.915	1.256	0.341
15	5	0.832	0.945	0.122
16	5	0.740	0.849	0.109
17	5	0.677	0.807	0.130
18	5	0.636	0.846	0.210
19	5	0.670	1.066	0.396
20	5	0.720	0.826	0.106
21	10	0.758	0.966	0.208
22	10	0.876	1.365	0.489
23	10	0.830	1.387	0.557
24	10	0.869	1.449	0.580
25	10	0.802	1.084	0.246
26	10	0.954	1.413	0.459
27	10	0.965	1.380	0.415
28	10	0.961	1.422	0.461
29	10	0.914	1.325	0.411
30	10	0.980	1.324	0.344
31	15	0.689	1.060	0.371
32	15	0.746	1.379	0.633
33	15	0.665	1.217	0.552
34	15	0.666	1.111	0.445
35	15	0.638	1.029	0.391
36	15	0.632	0.890	0.258
37	15	0.681	1.191	0.510
38	15	0.814	1.040	0.226
39	15	0.876	1.405	0.529
40	15	0.871	1.472	0.601

(*) Lecturas promedio obtenidas de los cultivos de linfocitos, por triplicado, de cada animal.

LECTURAS DE LA ABSORBANCIA DEL SOBRENADANTE, DESPUES DE LA REDUCCION DEL MTT, EN LOS CULTIVOS DE LINFOCITOS ESPLENICOS DE RATONES NORMALES QUE SIRVIERON COMO CONTROLES Y QUE FUERON SACRIFICADOS 1, 5, 10 Y 15 DIAS DESPUES DEL TRATAMIENTO IP APLICADO A LOS RATONES DE LOS OTROS DOS GRUPOS.

Ratón	día	Fondo	Absorbancia (*) Con-A	Delta
1	1	0.730	1.015	0.285
2	1	0.708	1.291	0.583
3	1	0.779	1.202	0.423
4	1	0.738	0.978	0.240
5	1	0.761	1.191	0.430
6	1	0.755	1.168	0.413
7	1	0.819	1.147	0.328
8	1	0.599	1.091	0.492
9	1	0.536	0.857	0.321
10	1	0.933	1.280	0.347
11	5	0.883	1.282	0.399
12	5	0.643	1.044	0.401
13	5	0.721	1.138	0.417
14	5	0.718	1.140	0.424
15	5	0.787	1.178	0.391
16	5	0.730	1.038	0.308
17	5	0.737	1.139	0.402
18	5	0.749	1.025	0.276
19	5	0.777	1.116	0.339
20	5	0.720	1.104	0.384
21	10	0.570	1.113	0.543
22	10	0.656	1.062	0.406
23	10	0.578	1.009	0.431
24	10	0.738	1.402	0.663
25	10	0.762	1.197	0.435
26	10	0.600	1.143	0.543
27	10	0.687	1.108	0.421
28	10	0.876	1.345	0.469
29	10	0.896	1.324	0.428
30	10	0.758	1.000	0.242
31	15	0.740	1.243	0.503
32	15	0.623	1.273	0.650
33	15	0.682	1.151	0.469
34	15	0.641	1.111	0.470
35	15	0.845	1.475	0.630
36	15	0.845	1.355	0.510
37	15	0.753	1.048	0.295
38	15	0.888	1.405	0.517
39	15	0.755	1.075	0.320
40	15	0.840	1.369	0.524

(*) Lecturas promedio obtenidas de los cultivos de linfocitos, por triplicado, de cada animal.

LECTURAS DE LA ABSORBANCIA DEL SOBRENADANTE, DESPUES DE LA REDUCCION DEL MTT, EN LOS CULTIVOS DE LINFOCITOS ESPLENICOS DE RATONES CONTROL QUE SOLO FUERON INYECTADOS CON SSI POR VIA IP Y QUE FUERON SACRIFICADOS 1, 5, 10 Y 15 DIAS DESPUES DE TERMINAR ESAS INOCULACIONES INTRAPERITONEALES.

Ratón	día	Fondo	Absorbancia (*)	
			Con-A	Delta
1	1	0.681	1.136	0.455
2	1	0.786	1.214	0.428
3	1	0.728	1.043	0.315
4	1	0.766	1.542	0.776
5	1	0.689	1.027	0.338
6	1	0.743	1.110	0.367
7	1	0.741	1.292	0.551
8	1	0.693	0.906	0.213
9	1	0.715	1.083	0.368
10	1	0.856	1.571	0.715
11	5	0.814	1.215	0.401
12	5	0.779	1.178	0.399
13	5	0.809	1.297	0.488
14	5	0.829	1.198	0.369
15	5	0.827	1.298	0.421
16	5	0.907	1.415	0.508
17	5	0.948	1.268	0.320
18	5	0.872	1.175	0.363
19	5	0.891	1.166	0.379
20	5	0.851	1.351	0.500
21	10	0.888	1.289	0.401
22	10	0.766	1.193	0.427
23	10	0.778	1.160	0.382
24	10	0.899	1.376	0.477
25	10	0.810	1.311	0.501
26	10	0.789	1.201	0.412
27	10	0.855	1.294	0.439
28	10	0.832	1.349	0.517
29	10	0.739	1.168	0.429
30	10	0.740	1.186	0.446
31	15	0.810	1.203	0.393
32	15	0.832	1.361	0.529
33	15	0.855	1.267	0.412
34	15	0.800	1.211	0.411
35	15	0.837	1.318	0.481
36	15	0.762	1.091	0.329
37	15	0.811	1.190	0.378
38	15	0.823	1.311	0.488
39	15	0.861	1.465	0.604
40	15	0.845	1.369	0.524

(*) Lecturas promedio obtenidas de los cultivos de linfocitos, por triplicado, de cada animal.

- 1) SIGERIST, H.E. :
Civilización y enfermedad. Fondo de Cultura Económica S.A. de C.V., México, 1987, pag. 274.
- 2) REDFIELD, R.R.; BURKE, D.S. :
HIV infection : the clinical picture.
Scientific American, 1988, 259 (4) : 70.
- 3) BILLINGHAM, R.E.; BRENT, L.; MEDAWAR, B. :
Actively acquired tolerance of foreign cells.
Nature, 1953, 172 : 603.
- 4) MILLER, J.F.A.P.; HOWARD, J.G. :
Effect of thymectomy on the immunological responsiveness of the mouse.
Proc. R. Soc. London (B), 1962, 156 : 415.
- 5) MILLER, J.F.A.P.; HOWARD, J.G. :
Some similarities between neonatal thymectomy syndrome and GVH disease.
J. Reticuloend. Soc., 1964, 1 : 369.
- 6) SIMONSEN, M. :
The mechanism of runt disease. En : Mechanism of cell and tissue damage produced by immune reactions, editado por Grabar, P. y Miescher, P. Benno Schwabe & Co., Publishers, Basilea, Suiza, 1962, Pag. 233.

- 7) PATERSON, P.Y. :
Discussion on mechanisms of the tissue damage in runtling and homograft rejection. En : Mechanism of cell and tissue damage produced by immune reactions, editado por Grabar, P. y Miescher, P. Benno Schwabe & Co., Publishers, Basilea, Suiza, 1962, Pag. 241.
- 8) EKSTEDT, R.D.; HAYES, L.L. :
Runt disease induced by non-living bacterial antigens.
 J. Immunol., 1967, 98 : 110.
- 9) JUTILA, J.W. :
Etiology of the wasting disease.
 J. Infect. Dis., 1973, 128 (supl.) : s99.
- 10) KEAST, D.; WALTERS, M.N. :
The pathology of murine runtling and its modification by neomycin sulphate gavages.
 Immunology, 1968, 15 : 247.
- 11) WILSON, R.; SJODIN, K.; BEALMAR, M. :
The absence of wasting in thymectomized germfree (axenic) mice.
 Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1964, 117 : 237.
- 12) CASALES-LEON, A. :
Translocalización bacteriana en ratones CD1 con el síndrome del desgaste.
 Tesis para obtener el Título de Q.F.B.
 Facultad de Química, UNAM, México, 1991.
- 13) GRACIA, R. :
Actividad biológica del antígeno común de las enterobacterias en ratones recién nacidos.
 Tesis para obtener el Título de Q.F.B.
 Facultad de Química, UNAM, México, 1991.

- 14) PIERPAOLI, W.; SORKIN, E. :
Hormones, thymus, and lymphocyte functions.
 Experientia, 1972, 28 : 1385.
- 15) TISDALE, M.J. :
Cancer cachexia.
 Brit. J. Cancer, 1991, 63 : 337.
- 16) CHESTERS, J.K.; WILL, M. :
Some factors controlling food intake by zinc-deficient rats.
 Brit. J. Nutr., 1973, 30 : 555.
- 17) TRACEY, K.J.; MORGELLO, S.; KOPLIN, B.; FAHEY, T.J.; FOX, J.;
 ALEDO, A.; MANOGUE, K.R.; CERAMI, A. :
Metabolic effects of cachectin/tumor necrosis factor are
 modified by site of production. Cachectin/tumor necrosis
 factor-secreting tumor in skeletal muscle induces chronic
 cachexia, while implantation in brain induces predominantly
 acute anorexia.
 J. Clin. Invest., 1990, 86 : 2014.
- 18) SCHELP, F.P.; SORNMANI, S.; PONGPAEW, P.; VUDHIVAI, N.;
 EGORMAIPHOL, S.; BOHNING, D. :
Seasonal variation of wasting and stunting in preschool
 children during a three-year community-based nutritional
 intervention study in northeast Thailand.
 Trop. Med. Parasitol., 1990, 41 : 279.
- 19) GARCIA-TAMAYO, F.; FIERRO, L.; LASTRA, M.D. :
Inducción y recuperación del desgaste inmunológico.
 Bol. Méd. Hosp. Inf. Méx., 1991, 48 : 559.
- 20) FIERRO GAXIOLA, L. :
Estudio de la tolerancia inmunológica oral en ratones recién
 nacidos tratados con Staphylococcus aureus.
 Tesis para obtener el Título de Q.F.B.,
 Facultad de Química, UNAM, México, 1990.

- 21) RIVERA GUZMAN, R. :
Efecto de algunos antígenos bacterianos sobre la inmunocompetencia de ratones CD1.
Tesis para obtener el título de Q.F.B.,
Facultad de Química, UNAM, México, 1990.
- 22) GONZALEZ-MACOUZET, E. :
Efecto de la administración de zinc sobre la inmunocompetencia de ratones con el síndrome del desgaste.
Tesis para obtener el Título de Q.F.B.,
Facultad de Química, UNAM, México, 1991.
- 23) ROOK, G. : Cell mediated immune responses. En : Immunology,
editado por Roitt, I.; Brostoff, J. y Male, D. Gower Medical
Publishing. New York. 1989. : 9.1.
- 24) GREENE, M.I.; SACHATTEN, S.; BROMBERG, J.S. :
Delayed hypersensitivity. En : Fundamental Immunology.
Editado por W.E. Paul.
Press Publishing. New York. 1984. : 685
- 25) PRINCE, HE.; JOHN, JK. :
Early activation of marker expression to detect impaired proliferative responses to pokeweed mitogen and tetanus toxoid. Studies in patients with AIDS and related disorders.
Diagn. Immunol., 1986, 4 : 306.
- 26) WELTE, K.; CIOBANU, N.; KRUGER, G.; VENUTA, S.; FELDMAN, S.P.;
STERNBERG, C.; PALLADINO, M.A.; KOZINER, B.; GOLD, J.; SAFAI,
B. :
Impaired interleukin-2 production in response to PHA and OKT3 antibody in male homosexuals with acquired immune deficiency syndrome. In vitro restoration of T-cell proliferation by highly purified interleukin-2.
Friedman-Kien, A.E. y Laubendtein, L.J.
New York, Masson, 1984. : 199.

- 27) NORIN, A.J.; KAMHOLZ, S.L.; PINSKER, K.L.; EMENSON, E.E.; VEITH, F.J. :
Cyclosporine-induced tolerance in experimental organ transplantation. Evidence of diminished donor-specific cytotoxicity relative to donor-specific proliferative response.
 J. Immunol., 1987, 139 : 332.
- 28) BARRET, J.T. :
An introduction to immunochemistry and immunobiology. En : Textbook of Immunology.
 Editado por Samuel E. Harshberger, 1983 : 77.
- 29) HART, M K.; PALKER, T J.; MATTHEWS, T J.; LANGLOIS A J.; LERCHE, N.W.; MARTIN, M E.; SCEARCE R.M.; MCDANAL, C.; BOLOGNESI, D.P.; HAYNES, B.F. :
Synthetic peptides containing T and B cell epitopes from human immunodeficiency virus envelope. gp120 induces anti-HIV proliferative responses and high titres of neutralizing antibodies in rhesus monkeys.
 J. Immunol., 1990, 145 : 2677.
- 30) GOONEWARDENE, R.; CARTER, R.; GAMAGE, C.P.; DEL GIUDICE, G.; DAVID, P.H.; HOMIE, S.; MENDIS, K.N. :
Human T cell proliferative responses to Plasmodium vivax antigens : evidence of immunosuppression following prolonged exposure to endemic malaria.
 Eur. J. Immunol., 1990, 20 : 1387.
- 31) KROWKA, J.; STITES, D.; DEBS, R.; LARSEN, C.; FEDOR, J.; BRUNETTE, E.; DUZGUNES, N. :
Lymphocyte proliferative responses to soluble and liposome-conjugated envelope peptides of HIV-1.
 J. Immunol., 1990, 144 : 2535.

- 32) KLEIN, J. :
Immunology : The science of self and non self discrimination. J. Wiley and Sons, New York, 1982. Pag. 347.
- 33) GILLS, S.; FERM, M.M.; KENDALL, A.S. :
T cell growth factor : Parameter of production and a quantitative microassay for activity.
J. Immunol., 1978, 120 : 2027.
- 34) MOSSMAN, T. :
Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays.
J. Immunol. Meth., 1983, 65 : 55.
- 35) DANIS, V.A.; KULESZ, D.S. :
Cytokine regulation of human monocyte interleukin-1 (IL-1) production in vitro. Enhancement of IL-1 production by interferon (INF) gamma, tumor necrosis factor-alpha, IL-2, and IL-1, and inhibition by IFN-alpha.
Clin. Exp. Immunol., 1990, 80 : 435.
- 36) SCHIDT, J.A.; OPPENHEIM, J.J. :
Interleukin 1: An immunologic perspective.
Ann. Rev. Immunol., 1985, 3 : 263.
- 37) HAYARI, Y.; KUKULANSKY, T.; GLOBERSON, A. :
Regulation of thymocyte proliferative response by macrophage-derived prostaglandin E2 and interleukin 2.
Eur. J. Immunol., 1985, 15 : 43.
- 38) SMIT, K.A. :
Interleukin 2.
Ann. Rev. Immunol., 1984, 2 : 319.

- 39) MOSMAN, T.R.; COFFMAN, R.L. :
Th1 and Th2 cells : different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties.
Ann. Rev.Immunol., 1989, 7 : 145.
- 40) FRESA, K.; HAMEED, M.; COHEN, S. :
Intracellular mechanisms of lymphoid cell activation.
Clin. Imm. Immunopathol., 1989, 50 : 19.
- 41) NORTH, M.E.; WEBSTER, A.D.; FARRANT, J. :
Defects in proliferative response of T cells from patients with common variable immunodeficiency on direct activation of protein kinase C.
Clin. Exp. Immunol., 1991, 85 : 198.
- 42) ZUCALI, J.R.; ELFENBEIN, G.J.; BARTH, H.; DINARELLO C.A. :
Effects of human interleukin-1 and human tumor necrosis factor on human T lymphocyte colony formation.
J. Clin. Invest., 1987, 80 : 772.
- 43) SCHEURICH, P.; THOMA, B.; UCER, U.; PFIZENMAIER, K. :
Immunoregulatory activity of recombinant human tumor necrosis factor. (TNF) α induction of TNF receptors on human T cells and TNF- α mediated enhancement of T cell response.
J. Immunol., 1987, 136 : 1786.
- 44) UCHIYAMA, T.; KAMAGATA, Y.; KOHONO, M.; YOSHIOKA, M.; FUJIKAWA, H.; IGARASHI, H.; OKUBO, M.; AWANO, F.; SAITO-TAKI, T. :
Study of the biological activities of toxic shock syndrome toxin-1. II. Induction of the proliferative response and the interleukin production by T cells from human peripheral blood mononuclear cells stimulated with the toxin.
Clin. Exp. Immunol., 1987, 68 : 638.

- 45) LANDY, M.; SANDERSON, R.P.; BERSTEIN, M.T.; LERNER, E.M. :
Involvement of thymus in response of rabbits to somatic polysaccharides of gram negative bacteria.
Science, 1965, 147 : 1591.
- 46) HOLLY, M.; LIN, Y.S; ROGERS, T.J. :
Induction of suppressor cells by staphylococcal enterotoxin B. Identification of a suppressor cell circuit in the generation of suppressor-effector cells.
Immunology, 1988, 64 : 643
- 47) GARCIA-TAMAYO, F.; AGUILAR, A.E.; RIVERA, R.; DE LEON, S.; PASTELIN, R.; LASTRA, MD. :
Consecuencias de la interacción de productos bacterianos con el sistema inmunológico de ratones recién nacidos.
Bol. Méd. Hosp. Inf. Méx., 1990, 47 : 173.
- 48) MATOUR, D.; MELNICOF, M.; KAYE, D.; MURASKO, D. :
The role of T cell phenotypes in decreased lymphoproliferation of the elderly.
Clin. Immunol. Immunopathol., 1989, 50 : 82.
- 49) PRINCE, H.E.; KIEINMAN, S.H.; MAINO, V.C.; JACKSON A.L. :
In vitro activation of T lymphocytes from human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive blood donors.
J. Clin. Immunol., 1988, 8 : 114.
- 50) CASTLE, S.C.; NORMAN, D.C.; PERLS, T.T.; CHANG, M.P.; YOSHIKAWA, T.T.; MAKINODAN, T. :
Analysis of cutaneous delayed-type hypersensitivity reaction and T cell proliferative response in elderly nursing home patients : an approach to identifying immunodeficient patients.
Gerontology, 1990, 36 : 217.

- 51) MANSON, P.R.; GWANZURA, L. :
Reduced lymphocyte response to mitogens in natural and experimental trichomoniasis.
Infect. Immun., 1990, 58 : 3553.
- 52) GUACLIARDI, L.E.; BYRNE, G.I.; PAULNOCK, D.M. :
Differential modulation of lymphocyte proliferative response and lymphokine secretion in mice during development of immunity to *Chlamydia psittaci*.
Infect. Immun., 1989, 57 : 1561.
- 53) HULLD, L.; SORENSEN, A.L.; KHARAZMI, A.; THEANDER, T.G. :
Functional and phenotypic changes in human lymphocytes after coinubation with *Leishmania donovani* in vitro.
Infect. Immun., 1990, 58 : 3163.
- 54) EZQUENAZI, D.A.; SAMPAIO, E.D.; MOREIRA, A.L.; GALLO, M.E.; ALMEIDA, S.M.; SARNO, E.D. :
Effect of treatment on immunoresponsiveness in lepromatous leprosy patients.
Lepr. Rev., 1990, 61 : 251.
- 55) MARTIN, S.; SILVERLEIN, S.J.; COURTENAY, R.J.; ROUSE, B.T. :
Murine cytotoxic of T lymphocytes specific for herpes simplex virus type 1.
J. Virol., 1990, 71 : 2391.
- 56) SLATER, T.F.; SAWYER, B. :
Activity of various dehydrogenase enzymes.
Biochim. Biophys., 1963, 71 : 383.
- 57) COMPLEY, J.C.; REES, M.J.; TURNER, C.H.; JENKINS, D.C. :
Colorimetric quantitation of filarial viability.
J. Parasitol., 1989, 19 : 77.

- 58) PAGE, M.; BEJAOU, N.; LEMIEUX, P. :
Optimization of tetrazolium-based colorimetric assay for the measurement of cell number and cytotoxicity.
J. Immunopharmacol., 1988, 10 : 785.
- 59) PRINCE, P.; McMILLAN, T.J. :
Use of tetrazolium assay in measuring the response of human tumor cells to ionizing radiation.
Cancer Res., 1990, 50 : 1392.
- 60) HEEG, K.; REIMANN, J.; KABELITZ, D.; HARDT, C.; WAGNER, H. :
A rapid colorimetric assay for the determination of IL-2 producing helper T cell frequencies.
J. Immunol. Methods, 1985, 77 : 237.
- 61) DENIZOT, F.; HANG, R. :
Rapid colorimetric assay for cell growth and survival : modifications to tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability.
J. Immunol. Methods, 1986, 89 : 271.
- 62) TADA, H.; SHIHO, O.; KUROSHIMA, K.; KOYAMA, M.; TSUKAMOTO, K. :
An improved colorimetric assay for Interleukin 2.
J. Immunol. Methods, 1986, 93 : 157.
- 63) GERLIER, D.; THONASSET, N. :
Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation.
J. Immunol. Methods, 1986, 94 : 57.
- 64) GALLAGHER, G.; TAYLOR, N.; WILLDRIDGE, J. :
Maturation signals for human B cells. Use of the MTT assay and EBV-transformed cell lines to define signals which promote cell growth or immunoglobulin secretion.
J. Immunol. Methods, 1987, 105 : 229.

- 65) NIKS, M.; OTTO, M.; DUSOVA, B.; STEFANOVIC, J. :
Quantification of proliferative and suppressive response of human T lymphocytes following Con-A stimulation.
 J. Immunol. Methods, 1990, 126 : 263.
- 66) SCOTT, D.A.; GOWARD, C.R.; SCAWEN, M.D.; ATKINSON, T.; PRINCE, C.P. :
Colorimetric glucose assay using thermostable glucoquinase.
 Ann. Clin. Biochem., 1990, 27 : 33.
- 67) SUZUKI, G.; KAWASE, Y.; KOYASU, S.; YAHARA, I.; KOBAYASHI, Y.; SCHWARTZ, RH. :
Antigen-induced suppression of the proliferative response of T cell clones.
 J. Immunol., 1988, 140 : 1359.
- 68) SUSKIND, R.M. :
Malnutrition and the immune response.
 Raven Press Publishers, New York, 1977.
- 69) GARCIA TAMAYO, F. :
Desnutrición, infecciones y subdesarrollo.
 Bioquímica, 1991, 16 : 14.
- 70) GARCIA TAMAYO, F.; AGUILAR, A.E.; GRACIA, R.; FIERRO, L.; LASTRA, M.D. :
La inmunodeficiencia experimental del animal desgastado y/o desnutrido.
 Acta Ped. Mex., 1990, 11 : 239.
- 71) GARCIA TAMAYO, F.; TERRAZAS, L.I. :
La diseminación de las bacterias comensales.
 Ciencia y Desarrollo, 1992, 18 (en prensa).

- 72) GARCIA TAMAYO, F.; FAURE, M.A. :
La búsqueda de una causa primaria para las infecciones recurrentes.
Infectologia (Mex), 1990, 10 : 267.
- 73) WAKABAYASHI, G.; GELFAND, J.A.; JUNG, W.K.; CONNOLLY, R.J.; BURKE, J.F.; DINARELLO, C.A. :
Staphylococcus epidermidis induces complement activation, tumor necrosis factor and interleukin-1, a shock-like state and tissue injury in rabbits without endotoxemia.
J. Clin. Invest., 1991, 87 : 1925.
- 74) TRACY, K.I.; BEUTLER, B.; LOWRY, S.F.; MERRYWEATHER, J.; WOLPE, S.; MILSARK, I.W.; HARIRI, R.J.; FAHEY, T.J.; ZENTELLA, A.; ALBERT, J.D.; et al. :
Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin.
Science, 1986, 234 : 470.
- 75) OKUSAWA, S.; GELFAND, J.A.; IKEJIMA, T.; CONNOLLY, J.A.; DINARELLO, C.A. :
Interleukin-1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition.
J. Clin. Invest., 1988, 81 : 1162.
- 76) KRISHNAN, V.L.; MEAGER, A.; MITCHELL, D.M.; PINCHING, A.J. :
Alveolar macrophages in AIDS patients : increased spontaneous tumor necrosis factor-alpha production in Pneumocystis carinii pneumonia.
Clin. Exp. Immunol., 1990, 80 : 156.
- 77) CHANG, H.R.; GRAU, G.E.; PECHERE, J.C. :
Role of TNF and IL-1 in infections with Toxoplasma gondii.
Immunology, 1990, 69 : 33.

- 78) ROUX-LOMBARD, P.; MODOUX, C.; CRUCHAUD, A.; DAYER, J.M. :
Purified blood monocytes from HIV-1-infected patients produce high levels of TNF- α and IL-1.
Clin. Immunol. Immunopathol., 1989, 50 : 374.
- 79) KASHIWA, H.; WRIGHT, S.C.; BONAVIDA, B. :
Regulation of B cell maturation and differentiation. I. Suppression of pokeweed mitogen-induced B cell differentiation by tumor necrosis factor (TNF).
J. Immunol., 1987, 138 : 1383.
- 80) ZIPRIS, D.; LAZARUS, A.H.; CROW, A.R.; HADZIJA, M.; DELOVITCH, T.L. :
Defective thymic T cell activation by concanavalin A and anti-CD3 in autoimmune nonobese diabetic mice. Evidence for thymic T cell anergy that correlates with the onset of insulinitis.
J. Immunol., 1991, 146 : 3763.
- 81) SUN, X.; HSUEH, W. :
Platelet-activating factor produces shock, in vivo complement activation, and tissue injury in mice.
J. Immunol., 1991, 147 : 509.