

47
201



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

PERMEABILIDAD INTESTINAL EN RATONES
CON EL SINDROME DE DESGASTE



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

NURIA ESTURAU ESCOFET



MEXICO, D. F.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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

CAPITULO 1.	INTRODUCCION.	1
CAPITULO 2.	ANTECEDENTES	
2.1.	Imunodeficiencias	3
2.2.	El Síndrome del desgaste	4
2.3.	Inmunopatología del síndrome del desgaste	9
2.4.	Estudio de la permeabilidad intestinal	11
CAPITULO 3.	PARTE EXPERIMENTAL	
3.1.	Diseño del experimento	14
3.2.	Métodos	
3.2.1.	Preparación de la cepa bacteriana	15
3.2.2.	Inducción del síndrome del desgaste	15
3.2.3.	Administración del PEG-400	16
3.2.4.	Obtención de la muestra de sangre	16
3.2.5.	Desproteinización de las muestras de suero	17
3.2.6.	Extracción en Fase Sólida	17
3.2.7.	Adición del estándar interno	17
3.2.8.	Procedimiento de silanización	18
3.2.9.	Análisis cromatográfico	19
3.2.10.	Curva de calibración	20
3.2.11.	Cinética de absorción-eliminación de PEG	20
3.2.12.	Cálculos estadísticos	21

CAPITULO 4.	RESULTADOS	
4.1.	Manifestaciones del síndrome del desgaste	22
4.2.	Desarrollo Metodológico	
4.2.1.	Silanización del PEG-400	25
4.2.2.	Selección del estándar interno	26
4.2.3	Extracción en Fase Sólida	28
4.2.4.	Linealidad, reproducibilidad y % de recuperación	30
4.3.	Influencia del desgaste sobre la permeabilidad intestinal al PEG-400	33
CAPITULO 5.	DISCUSION	
5.1.	Manifestaciones del síndrome del desgaste	41
5.2.	Estudio de PEG en suero	43
5.3.	Método analítico	44
5.4.	Influencia del desgaste sobre la cinética de absorción de PEG-400	45
CAPITULO 6	CONCLUSIONES	48
	BIBLIOGRAFIA	49

CAPITULO I. INTRODUCCIÓN

Algunas enfermedades crónicas y/o incurables se caracterizan por un deterioro progresivo del sistema inmune y del estado físico del enfermo, que los hace susceptibles a diversas infecciones por microorganismos oportunistas. Hoy en día, la utilización de antibióticos permite, hasta cierto punto, el tratamiento de estas complicaciones infecciosas, con lo que se prolonga la vida del paciente. Sin embargo, cuando la enfermedad primaria no se cura, el deterioro progresivo físico e inmunológico de los pacientes continúa, por lo que algunos pueden llegar a tener un considerable grado de caquexia en las etapas terminales de la enfermedad. A esta condición clínica se llama **desgaste** y las enfermedades que lo provocan se llaman **enfermedades desgastantes**.

En personas o animales desgastados los microorganismos comensales del tubo digestivo pueden diseminarse fuera del intestino a ganglios mesentéricos, hígado y otros órganos de la cavidad abdominal. Este fenómeno se denomina **traslocación bacteriana**, y se ha relacionado con el deterioro de la barrera inmunológica de la mucosa intestinal y con un aumento en la permeabilidad intestinal.

Desde hace años, las alteraciones de la permeabilidad intestinal se estudian en diferentes enfermedades y por diversas razones. Así por ejemplo, en los ancianos se ha encontrado un aumento en la absorción intestinal de PEG-400. Algunos han propuesto que, por esta razón, la

edad avanzada implica el riesgo de absorber una mayor cantidad de productos químicos cancerígenos que contiene la dieta. La permeabilidad intestinal también está alterada en las personas desnutridas que tienen, además, una frecuencia elevada de endotoxemias. El estrés causado por los traumas físicos y químicos puede aumentar tanto la permeabilidad intestinal como la traslocación de bacterias.

Actualmente se pueden hacer dos preguntas: primero, si la enfermedad primaria no se cura (cáncer por ejemplo), entonces cuando se solucionan algunas de sus complicaciones infecciosas y reacciones inflamatorias recurrentes, ¿se podría evitar la aparición terminal del desgaste?; segundo, si se lograra evitar la aparición terminal del desgaste y se reconstituyera la competencia inmunológica de estos pacientes, ¿se podría modificar la evolución de la enfermedad primaria?.

Ante esta situación, en el laboratorio se han realizado experimentos con diferentes modelos de animales desgastados (principalmente ratones) para conocer los mecanismos por los cuales los animales se desgastan y posteriormente, ensayar diversos procedimientos terapéuticos que limiten la expresión de sus manifestaciones más graves. El presente trabajo es parte de esta línea de investigación y tiene por objetivo demostrar que la permeabilidad intestinal está aumentada en ratones a los cuales se les induce la aparición del síndrome desgastante mediante la inyección intraperitoneal de bacterias inactivadas.

CAPITULO 2. ANTECEDENTES.

2.1. Inmunodeficiencias.

Las inmunodeficiencias son trastornos del sistema inmunitario que pueden ser originados por diversas causas (1,2). Se caracterizan por un defecto parcial o total en la respuesta inmune, humoral o celular, lo cual generalmente da como resultado un aumento en la susceptibilidad a las infecciones. Las personas o los animales inmunodeficientes tienen infecciones recurrentes, un retraso en el desarrollo corporal (según la edad) y una incidencia elevada de neoplasias malignas. Además, tienen episodios alérgicos y enfermedades autoinmunitarias con mayor frecuencia que las personas normales. Las inmunodeficiencias se pueden clasificar en primarias o congénitas y secundarias o adquiridas (2).

Las inmunodeficiencias primarias se originan principalmente a causa de desórdenes genéticos, como son los defectos en la diferenciación celular, las deficiencias enzimáticas, la síntesis defectuosa de alguna proteína o anomalías cromosómicas. Las inmunodeficiencias primarias han sido clasificadas según comprometan la producción de anticuerpos o la inmunidad celular (en una forma separada o combinada), así como las funciones de los fagocitos o las actividades del sistema complemento.

Las inmunodeficiencias secundarias son las que aparecen a causa de una enfermedad primaria, como las infecciones (virales, bacterianas o parasitarias), las neoplasias malignas, algunas enfermedades hereditarias y metabólicas, la desnutrición grave, quemaduras, cirrosis alcohólica, envejecimiento, tratamientos con fármacos inmunosupresores, anestesia, etc. Son más comunes que las inmunodeficiencias primarias y con mayor frecuencia se expresan como alteraciones en la inmunidad celular más que en la inmunidad humoral. Pueden ser transitorias porque desaparecen con el tratamiento adecuado de la enfermedad primaria (por ejemplo, la desnutrición) o de carácter permanente como es el caso de los pacientes infectados con el VIH.

2.2. El síndrome del desgaste.

Las personas con inmunodeficiencias secundarias tienen infecciones recurrentes que generalmente están causadas por microorganismos comensales, los cuales se convierten en oportunistas y se diseminan cuando disminuyen las defensas en el nivel de la piel y de las mucosas del aparato respiratorio o del tubo digestivo.

Si los episodios infecciosos no pueden ser prevenidos y se repiten con relativa frecuencia, las personas inmunodeficientes presentan una pérdida progresiva de peso que, en los casos extremos, puede llegar hasta la caquexia. En esta evolución influyen tanto la cronicidad de la

enfermedad primaria como la gravedad del defecto inmunológico asociado.

Cuando las inmunodeficiencias provocan un deterioro físico progresivo generalmente terminan con manifestaciones de un desorden metabólico sumamente heterogéneo que ha sido denominado síndrome del desgaste o del desmedro. Esta condición clínica también representa la etapa terminal de varias enfermedades infecciosas crónicas (como el SIDA, el paludismo o la tuberculosis) y de las neoplasias malignas. En los niños con inmunodeficiencias secundarias, las manifestaciones anteriores suelen estar acompañadas de un retardo en el desarrollo corporal. Las formas marasmáticas de la desnutrición infantil tienen una evolución similar.

El síndrome del desgaste puede ser reproducido en una forma experimental, en animales de laboratorio, utilizando diferentes procedimientos. Las formas de desgaste experimental más conocidas son secundarias a la extirpación neonatal del timo (3), las reacciones injerto-contra-huésped que provocan los trasplantes de linfocitos alogénicos (4), la administración de hormonas como el acetato de cortisol (5) o el estradiol (6), la eliminación del zinc de la dieta (66) y las inyecciones intraperitoneales de múltiples productos bacterianos como los lipopolisacáridos (LPS) o de suspensiones de bacterias muertas como los estafilococos del grupo A, (7,8). Todos estos procedimientos se caracterizan por causar una pérdida progresiva de peso, irritabilidad de

los animales, alteraciones en el pelo, infecciones en la piel y las mucosas, diarrea recurrente, anorexia y finalmente muerte (7).

Según la técnica utilizada para su inducción, el desgaste experimental puede ser de carácter transitorio o definitivo y, así mismo, puede variar la frecuencia con la que se presentan los síntomas y la incidencia de las principales alteraciones patológicas (9). Sin embargo, los animales desgastados siempre tienen dos manifestaciones principales: están gravemente desnutridos y tienen una inmunodeficiencia variable que los hace susceptibles a diversas infecciones por microorganismos oportunistas.

En el presente trabajo el procedimiento que se utilizó para inducir el desgaste fue descrito en 1964 por Ekstedt et al (10), el cual consiste en la inyección intraperitoneal de productos bacterianos (estafilococos inactivados por calor) en ratones recién nacidos.

El síndrome del desgaste inducido por la inyección intraperitoneal de productos bacterianos a ratones recién nacidos se caracteriza por un retardo en el crecimiento asociado a una pérdida de peso y a una atrofia o hipoplasia de varios órganos linfoides primarios y secundarios, lo cual se traduce en una respuesta inmunitaria deficiente. Además, los animales desgastados presentan alteraciones en la función de varias glándulas del sistema endócrino (9).

Los animales desgastados tienen deprimida su producción de anticuerpos contra antígenos timo-dependientes (11), no desarrollan una tolerancia oral contra los antígenos administrados por vía oral (12), tienen deprimida la respuesta proliferativa de los linfocitos esplénicos que son estimulados con los mitógenos convencionales (13), presentan una translocación de bacterias Gram-negativas del intestino hacia los ganglios linfáticos mesentéricos (14), tienen aumentada la síntesis de factor necrosante de tumores (TNF) por los macrófagos peritoneales (16), una mayor concentración de zinc en el timo que contrasta con una reducción del contenido del mismo elemento traza en la sangre y otros tejidos (15) y una depresión de las reacciones intradérmicas de hipersensibilidad tardía (DTH) (17).

Sin embargo, dos semanas después de terminadas las inyecciones intraperitoneales, desaparecen casi todas estas manifestaciones de un grave desorden inmunológico, se detiene la pérdida de peso, los animales recuperan la imagen histológica y el peso normal del timo (18), tienen una producción de anticuerpos superior a la de los animales sanos (19) y, aparentemente, continúan su vida en forma indistinguible a la de los ratones normales. Por esta razón se ha considerado que la inmunodeficiencia provocada mediante la inyección intraperitoneal de estafilococos muertos tiene un carácter transitorio. En este sentido, la inmunodeficiencia no resulta completamente comparable al desgaste terminal de los enfermos cancerosos o con SIDA sino, más bien, al cuadro clínico de niños con infecciones a repetición y una desnutrición marasmática.

Se han propuesto diferentes mecanismos de lesión para explicar las deficiencias inmunológicas de los animales desgastados en una forma experimental. Una de las hipótesis sugiere que, después de la inoculación de los productos bacterianos en el peritoneo, se produce una estimulación de las células fagocíticas (macrófagos o monocitos) que liberan una gran cantidad de ciertas citocinas (TNF, por ejemplo), cuyo exceso en la circulación resulta perjudicial para las células inmunocompetentes. La depresión de la respuesta inmunitaria probablemente es la causa de la traslocación de las enterobacterias (20,21) que se diseminan del intestino hacia diferentes órganos de la cavidad abdominal (22,23) y cuyas endotoxinas o lipopolisacáridos (LPS) contribuyen a incrementar más aún la producción de citocinas por los macrófagos (24,25). Estos mediadores (TNF / caquectina), que son reconocidos como los responsables del estado "tóxico" del individuo infectado (26), pueden ser también los causantes del deterioro físico que resulta la principal característica del animal desgastado, porque interfieren en el metabolismo de los lípidos y provocan una pérdida de peso (27). Una vez terminada la inoculación intraperitoneal de productos bacterianos, el animal se recupera en una forma similar a como lo haría después de una infección grave. La única diferencia consiste en que, en el modelo experimental, el animal se desgasta como si estuviera infectado cuando en realidad sólo ha sido inyectado con una suspensión estéril de bacterias muertas.

2.3. Inmunopatología del síndrome del desgaste.

Algunos trabajos publicados recientemente han demostrado que, cuando el síndrome del desgaste se provoca mediante la inducción de una reacción injerto-contra-huésped sistémica (GvH), aumenta la producción del factor caquetizante denominado TNF (28). Este factor ha sido considerado responsable de una parte de las lesiones tisulares que caracterizan el desgaste. Así, después de las inyecciones de endotoxinas que estimulan los macrófagos o cuando los animales reciben varias dosis de TNF por vía endovenosa, administrada experimentalmente, pueden presentar zonas de necrosis en las paredes del intestino delgado (29,30,31). Esta observación apoya la idea de que el animal desgastado puede tener alteradas las principales funciones del intestino y los mecanismos inmunológicos que controlan la flora de bacterias comensales del tubo digestivo (32).

En una cepa mutante de ratones *wast/wast* homocigotos se ha observado la aparición espontánea de un síndrome desgastante similar al que puede ser inducido mediante la inoculación de productos bacterianos en ratones recién nacidos. Poco tiempo después del nacimiento, estos animales desarrollan espontáneamente la mayoría de los síntomas que caracterizan al desgaste (33). En estos ratones se ha encontrado una disminución significativa en la producción de anticuerpos Ig A de secreción, varias alteraciones microscópicas en la mucosa intestinal y un deterioro progresivo del sistema nervioso central que se traduce en ataxia (34).

En los ratones *wast/wast* homocigotos genéticamente desgastados también se ha encontrado una alteración importante de la flora comensal del intestino, los microorganismos Gram-negativos comensales y sus antígenos pueden pasar libremente a través de la mucosa y, de este modo, los animales pueden desarrollar fácilmente bacteremias por gérmenes oportunistas.

En la literatura se han descrito varias complicaciones gastrointestinales de las inmunodeficiencias (35). Entre las más comunes están la giardiasis, la hiperplasia nodular linfoide, el aplastamiento de las vellosidades intestinales, el sobrecrecimiento bacteriano, la mala absorción intestinal y la deficiencia de disacaridasa o de varias otras enzimas. Los inmunodeficientes que tienen comprometida su producción de anticuerpos generalmente presentan diarreas crónicas que, con cierta frecuencia, pueden estar causadas por enterobacterias como *Salmonella*, *Shigella* o *Escherichia coli* enteropatógena. Mientras que las infecciones por *Candida albicans* o *Pneumocystis carinii* son más frecuentes en los inmunodeficientes que tienen comprometidas las funciones de los linfocitos T.

Teóricamente, las personas desgastadas o los animales de laboratorio con el síndrome inducido experimentalmente, deben tener lesiones de la mucosa intestinal y un compromiso importante del tejido linfoide asociado al tubo digestivo (GALT). Es razonable suponer que todo ello provoca trastornos de la permeabilidad intestinal que se pueden traducir en una asimilación deficiente de los nutrientes de la dieta.

Sin embargo, la literatura consultada sobre el desgaste solo refiere el hallazgo de lesiones provocadas por el TNF o por las infecciones recurrentes, sin mencionar estudios sobre el estado de la permeabilidad intestinal. Las únicas referencias encontradas que contienen información relacionada con la permeabilidad intestinal en niños con desnutrición primaria, son publicaciones antiguas como la de Chandra, que trata sobre el aumento de la absorción de los antígenos de los alimentos (36).

2.4. Estudio de la permeabilidad intestinal.

Para estudiar la permeabilidad de la mucosa intestinal, en condiciones fisiológicas o patológicas, se han utilizado diferentes series de moléculas. Algunas son material exógeno como xilosa (37), lactulosa (38,39,40), eritritol (41,42), manitol (39,41,42), inulina (43,44) y fructosa (43). Otras, en cambio, son productos de excreción endógena como urea (41,43,45,46), ácido úrico (46), creatina (43,46) vitamina B12 (43) y cianocobalamina (46). En estos estudios cada uno de los compuestos de la serie debe ser analizado en forma independiente, por procedimientos que, la mayoría de las veces, son tediosos y tardios. Además, una parte de esos compuestos son degradables por bacterias intestinales, lo que los hace inapropiados para el estudio en etapas de padecimientos donde la concentración bacteriana en el intestino se encuentra incrementada.

En 1977, Chadwick et al (47) demostraron que el polietilenglicol 400 (PEG-400) es una sustancia ideal para definir las características de la permeabilidad pasiva de la mucosa intestinal.

El polietilenglicol (PEG) es una mezcla de polímeros de etilenglicol $[\text{HO}-(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-H}]$. El PEG-400 contiene nueve diferentes homólogos de etilenoóxidos que van desde $n=5$ a $n=13$ y que tienen pesos moleculares de 242 a 594 daltons. Los nueve homólogos presentan una distribución gaussiana, con un peso molecular promedio de 400 daltons.

Todos los homólogos del PEG son moléculas inertes, solubles en agua, cuyo transporte a través de la mucosa intestinal decrece a medida que aumenta el peso molecular del polímero. El transporte de todas estas moléculas sigue una cinética de primer orden. Las principales ventajas que presenta sobre otras moléculas son: que el PEG-400 no es tóxico, no es degradado por las bacterias intestinales, no se metaboliza después de su absorción y, después de su apropiada extracción, su concentración puede ser medida en varios líquidos biológicos utilizando procedimientos sumamente sensibles, precisos, exactos y relativamente fáciles de llevar a cabo.

En 1986, Irving et al. (48) modificaron el método de extracción del PEG de la orina, eliminando con esto varias interferencias. Además, formaron el derivado silanizado de PEG antes de inyectarlo al cromatógrafo de gases, con lo que obtuvieron una mejor reproducibilidad en su cuantificación.

En la literatura consultada existen publicadas una gran cantidad de referencias que informan el estudio de la permeabilidad intestinal en hombres y/o animales que se encuentran bajo los efectos de diferentes drogas (49), que están infectados (50), que están distribuidos en diferentes grupos etarios (51) o cuyo metabolismo está modificado por otras variables (52,53,54). En todos estos casos el PEG se administra por vía oral y, posteriormente, se mide su concentración en muestras de orina. También ha sido posible medir su concentración en el líquido de perfusión intestinal y en las evacuaciones líquidas (47). En la literatura consultada sólo se encontró un trabajo que informa los resultados del análisis del PEG en muestras de suero (55). Sin embargo, en este último caso, el procedimiento de extracción con cloruro de metileno no es satisfactorio, ya que el PEG-400 presenta baja solubilidad en líquidos poco polares (56). En el presente estudio se desarrolló una metodología para la extracción de PEG-400 del suero.

El PEG-400 puede cuantificarse por cromatografía de gases como lo hacen los autores de los artículos antes mencionados, por cromatografía de líquidos (HPLC) (56,57,58) y también utilizando marcadores radiactivos (56,58). En el presente trabajo el PEG-400 se analizó por cromatografía de gases, la cual tiene la ventaja de ser una técnica eficiente y rápida que utiliza un detector con mayor sensibilidad que los equipos para HPLC. Por otra parte es un procedimiento más económico e involucra menos riesgos que los métodos radiactivos.

CAPITULO 3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Diseño del experimento.

Se trabajó con 120 ratones recién nacidos de la cepa Balb/c, que fueron proporcionados por el Bioterio de la Facultad de Química. Se utilizaron como animales control 50 de estos ratones, que recibieron inyecciones intraperitoneales de solución salina isotónica (SSI) estéril. Para la inducción del síndrome del desgaste fueron utilizados 60 ratones, los cuales recibieron inyecciones intraperitoneales de estafilococos inactivados. Los 10 ratones restantes se utilizaron para obtener un "pool" de suero.

Para el estudio de la cinética de absorción-eliminación del PEG-400, los animales recibieron una dosis de PEG-400 por vía intragástrica. Debido a las dificultades observadas para tomar una muestra de orina de los ratones y, al desconocimiento del grado de alteración en la función renal de los animales desgastados, se desarrolló una metodología nueva para el estudio del PEG-400 en muestras de suero. De este modo, después de la administración de PEG-400 se tomaron muestras de sangre a tiempos diferentes. Se separó y desproteinizó 100 μ l de suero y el PEG-400 se extrajo en fase sólida utilizando cartuchos de sílice, posteriormente, se silanizó y su concentración se cuantificó por Cromatografía de gases capilar.

3.2. Metodos.

3.2.1. Preparación de la cepa bacteriana.

La cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, proporcionada por el cepario del Depto de Biología de la Facultad de Química, se cultivó en medio BHI a 37°C, con agitación durante 18 horas. Las células se lavaron dos veces con solución salina isotónica (SSI) estéril y posteriormente se inactivaron por calor, en autoclave, a 121°C durante 15 minutos. Las bacterias se recolectaron por centrifugación y se ajustaron nefelométricamente a 5×10^{10} bacterias / ml en SSI utilizando la técnica del estándar de sulfato de bario desarrollada por Mc Farland (59). Se realizaron pruebas de esterilidad utilizando los medios BHI, caldo tioglicolato y S110. Dando en los tres cultivos negativo. La suspensión se conservó a 4 °C hasta el momento de inyectarla.

3.2.2. Inducción del síndrome del desgaste.

El síndrome del desgaste se indujo siguiendo el esquema de inyecciones intraperitoneales de estafilococos inactivados que fue propuesto inicialmente por Ekstedt et al (10). Los ratones recibieron la primera inyección, de 0.1 ml de la suspensión de bacterias inactivadas, antes de cumplir las dos horas de nacidos y las siguientes dosis fueron administradas por la misma vía cada tercer día durante cuatro semanas.

Los animales del grupo control también se inyectaron a las dos horas de nacidos y cada tercer día durante cuatro semanas, pero con 0.1 ml de SSI estéril.

3.2.3. Administración de PEG 400.

Al cumplir 30 días de edad los animales fueron colocados en ayuno durante cuatro horas y posteriormente recibieron 40 μ l (0.41 g/kg de peso del cuerpo) (47) de una solución al 10% en agua (380 mosm) (53) de PEG-400 (Sigma Chemical Co.) por vía intragástrica, utilizando una sonda de polietileno conectada a una jeringa Hamilton de 50 μ l. Antes de pasar la sonda, los animales recibieron una anestesia ligera con éter. Después de administrar la dosis correspondiente a cada ratón, se registró el tiempo, y cada animal fue colocado en reposo, sin ingerir agua ni alimentos, hasta el momento de su sacrificio. Se descartaron todos los ratones que no recibieron la dosis completa o aquellos otros en los cuales hubo evidencia de que la sonda no estuvo bien colocada.

3.2.4. Obtención de la muestra de sangre.

La sangre se obtuvo por punción retroorbital, después de anestesiarse a los ratones con éter. Los animales fueron separados aleatoriamente en diferentes grupos para obtener la muestra a los 10, 20, 30, 40, 60, 120 o 180 minutos después de haber administrado el PEG-400.

3.2.5. Desproteínización de las muestras de suero.

Cada muestra de sangre se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos. Se separaron 100 μ l de suero y éstos fueron desproteínizados con 5 volúmenes de metanol (R.A. Mallinckrodt). La mezcla fue agitada y centrifugada a 3500 rpm por 10 minutos. Cada sobrenadante se llevó a sequedad bajo corriente de nitrógeno y vacío.

3.2.6. Extracción en fase sólida.

Para la extracción del PEG-400 se utilizaron cartuchos de sílica Gel (Spe-ed 500 mg / 3 ml), los cuales fueron acondicionados lavándolos primero con 3 ml de metanol y después con 3 ml de cloroformo (R.A. Merck). Los cartuchos lavados se dejaron secar antes de su uso.

Cada muestra de suero desproteínizada fué resuspendida en 200 μ l de cloroformo y aplicada a un cartucho de sílica previamente acondicionado. Cada cartucho se dejó secar y se lavó con 3 ml de cloroformo, se dejó secar y el PEG-400 se eluyó con 3 ml de metanol, los cuales fueron recolectados en tubos de vidrio con tapón de rosca y teflón.

3.2.7. Adición del estándar interno.

Después de extraer el PEG-400, se adicionaron 10 µl de una solución al 10 % de escualano en cloroformo y se llevó a sequedad bajo corriente de nitrógeno y vacío.

3.2.8. Procedimiento de silanización.

A cada tubo se le adicionaron 100 µl del silanizante utilizando una jeringa Hamilton de 500 µl. Una vez hecho esto se taparon los tubos y se colocaron a 90°C durante 1 hora, con agitación ocasional. Los silanizantes probados fueron:

SILANIZANTE	ABREVIACION
N,O-bis-(trimetilsilil) trifluoro-acetamida con 1% trimetilclorosilano (Pierce)	BSTFA
Trimetil cloro silano (Pierce)	TMCS
Hexametildisilazano (Altech associates, inc)	HMDS
Una mezcla (1:4) de TMCS : HMDS.	TMCS / HMDS

En los resultados se indica por qué fue seleccionado el primero de estos cuatro agentes silanizantes.

Para calcular la reproducibilidad y la repetibilidad se prepararon cuatro curvas con réplicas de PEG-400 de concentraciones de 1000 hasta 3500 $\mu\text{g/ml}$ utilizando en cada curva uno de los silanizantes antes mencionados. Cada una de las réplicas se inyectó por triplicado. La reproducibilidad se estimó calculando la desviación estandar relativa entre las medias de cada réplica y la repetibilidad con la desviación estandar relativa entre las inyecciones de cada una de las réplicas.

3.2.9. Análisis cromatográfico.

Se utilizó un cromatógrafo Hewlett Packard, modelo 5890A, equipado con detector de ionización de llama, integrador Hewlett Packard, modelo 3392A, y una columna capilar de metil silicón de 5 metros de longitud, 0.25 mm de diámetro y 0.2 μ de espesor de película.

La temperatura de la columna fue programada de 100 a 300°C, a 30°C por minuto, con la temperatura del inyector a 300°C, la temperatura del detector a 300°C, con una razón de Split de 1:30.

Un volumen de 1 μl de cada una de las muestras se inyectó, por triplicado, al cromatógrafo de gases, utilizando una jeringa Hamilton de 10 μl .

Los resultados se expresan como la suma de las áreas de todos los picos de PEG-400 entre el área del estandar interno.

3.2.10. Curva de calibración

Para conocer la linealidad y la reproducibilidad del método analítico se realizó una curva de calibración, con réplicas, de PEG-400 de concentraciones de 1000 hasta 3500 $\mu\text{g/ml}$, que fueron adicionadas a 100 μl de un "pool" de suero de ratón. Cada una de las réplicas recibió todo el tratamiento subsecuente, y se inyectó por duplicado.

El % de recuperación de PEG-400 después de la extracción y, la existencia o no de errores sistemáticos, se evaluaron por la correlación entre la curva de calibración antes descrita y una curva obtenida con iguales concentraciones de PEG-400 en cloroformo a la cual se le dió el tratamiento subsecuente a la extracción.

3.2.11. Cinética de absorción-eliminación de PEG-400

Las curvas de absorción eliminación fueron ajustadas utilizando los paquetes:

JANA para la estimación de los parámetros.

PCNONLIN NONLINEAR ESTIMATION PROGRAM (VO3.0) para afinar los parámetros y conocer el modelo.

3.2.12. Cálculos estadísticos

Las pruebas de hipótesis y los intervalos de confianza sobre las medias, están basadas en la distribución "t" (prueba de "student") usando el nivel de significancia especificado en cada caso.

Las pruebas de varianza están basadas en la distribución "F" (prueba de "Snedecor") especificado en cada caso el nivel de significancia.

Si la prueba es de una cola el grado de incertidumbre se indica como α y si es de dos colas como $\alpha/2$

La nomenclatura utilizada es la siguiente:

H ₀ -	Hipótesis nula	\bar{x} -	Media
H ₁ -	Hipótesis alterna	S-	Desviación estandar
C-	Animales del grupo control	M-	Machos
I-	Animales del grupo I	H-	Hembras
II-	Animales del grupo II		

CAPITULO 4. RESULTADOS.

4.1. Manifestaciones del síndrome del desgaste.

Se observó que, después de las inyecciones intraperitoneales de estafilococos inactivados, los ratones desarrollaron un síndrome desgastante que fue grave en algunos y moderado o inapreciable en los restantes. Por esta razón los animales inyectados fueron separados en dos grupos. En el grupo I quedaron los ratones inyectados con estafilococos que resultaron indistinguibles de los animales del grupo control, que habían sido inyectados con solución salina. Estos animales del grupo I aparentemente pesaban menos que los animales control, sin embargo esta diferencia no fué significativa (Tabla I y II). En el grupo II se incluyeron los animales que presentaron todas las manifestaciones clínicas del desgaste. En ellos fue evidente la anorexia, la debilidad muscular, el pelo ralo y erizado, conjuntivitis, infecciones en la piel y evacuaciones líquidas. Estos animales desgastados retrasaron su crecimiento y desarrollo corporal, de tal modo que, al final del experimento, eran más pequeños y tenían alrededor del 58% del peso de los ratones control (Tabla I y II).

En la Tabla III se encuentra el grado de desnutrición observado en los animales del grupo II. Para esta clasificación se utilizó el criterio propuesto por Federico Gómez (60). Como los ratones hembra mostraron un peso promedio inferior al de los machos (Tabla I) el peso de referencia

utilizado fué el peso promedio del grupo control segun el sexo al que pertenece .

SEXO	GRUPO	No	\bar{x}	S	$t_{\alpha/2=0.025}$	INTERVALO DE CONFIANZA AL 95%
H	control	27	12.18	1.97	2.058	12.10 \pm 0.78
H	I	5	11.24	0.53	2.778	11.24 \pm 0.65
H	II	8	6.88	1.05	2.365	6.88 \pm 0.88
M	control	17	13.07	1.95	2.12	13.06 \pm 1.00
M	I	8	11.51	1.22	2.365	11.51 \pm 1.02
M	II	8	7.85	0.92	2.365	7.85 \pm 0.76

Tabla I
Peso de los animales

HIPOTESIS	S	gl	t calculado	$t_{\alpha=0.025}$	CONCLUSIÓN
Ho $\bar{x}_{HC} = \bar{x}_{HI}$ Hi $\bar{x}_{HC} > \bar{x}_{HI}$	1.87	30	0.9446	1.960	No se rechaza Ho
Ho $\bar{x}_{HC} = \bar{x}_{HII}$ Hi $\bar{x}_{HC} > \bar{x}_{HII}$	1.8	33	7.2870	1.960	Se rechaza Ho
Ho $\bar{x}_{MC} = \bar{x}_{MI}$ Hi $\bar{x}_{MC} > \bar{x}_{MI}$	1.76	23	2.0540	2.069	No se rechaza Ho
Ho $\bar{x}_{MC} = \bar{x}_{MII}$ Hi $\bar{x}_{MC} > \bar{x}_{MII}$	1.7	23	7.1480	2.069	Se rechaza Ho

Tabla II
Prueba de hipótesis sobre diferencias en peso según el grupo

% Pérdida de peso	No de animales	Grado de desnutrición
25 <	0	Primer grado
25 < X < 40	5	Sugundo grado
40 >	10	Tercer grado

Tabla III
Grado de desnutrición de los animales del grupo II

De los 60 animales inoculados con la solución bacteriana el 21.6% expresó manifestaciones discretas del síndrome (Grupo I). El 31.6% expresó las manifestaciones completas del desgaste (Grupo II) y el 46.6% restante murió, estos animales se murieron a lo largo de las cuatro semanas de inoculación, y generalmente fueron los que se veían más pequeños y enfermos.

Los animales del grupo control presentaron una mortalidad del 10% y hay que señalar que murieron al primero o segundo día de edad y generalmente provinieron de camadas grandes (de 8 a 9 crías) (Tabla IV).

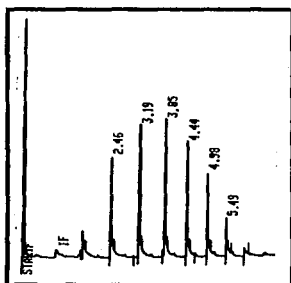
RATONES	N inicial	N final	MORTALIDAD (%)
NORMALES	50	45	10
GRUPO I Y II	60	32	46.66

Tabla IV
Índice de mortalidad

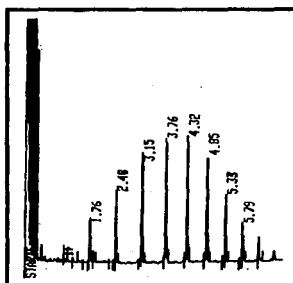
4.2. Desarrollo metodológico.

4.2.1 Silanización del PEG-400:

Para el análisis del PEG-400 se utilizó una columna capilar corta de metil silicón, con baja polaridad y alta estabilidad térmica. Donde se obtuvo una baja detectabilidad, probablemente por adsorción del PEG tanto en el inyector como en la columna, los picos fueron asimétricos y esto fué atribuido a las diferencias de polaridad entre el analito y la fase estacionaria (Cromatograma 1). Por esta razón, se consideró necesario formar derivados silanizados que disminuyeran el carácter polar del PEG, aumentando con esto la detectabilidad (Cromatograma 2).



Cromatograma 1.
750 ng de PEG-400



Cromatograma 2
50 ng de PEG-400 silanizado

Al utilizar HMDS los tiempos de reacción fueron excesivos, de 12 horas a 80°C, además, la reproducibilidad fue pobre (Tabla V) por lo que se descartó como silanizante.

Al silanizar con BSTFA o con la mezcla HMDS-TMCS los resultados fueron más satisfactorios, se obtuvo menor tiempo de reacción, 1 hora a 80°C, mayor cuantitatividad y mejor reproducibilidad (Tabla V). Entre estos dos últimos silanizantes se prefirió utilizar el BSTFA ya que no presenta el precipitado de NH_4Cl que se forma cuando reacciona el HMDS con el TMCS.

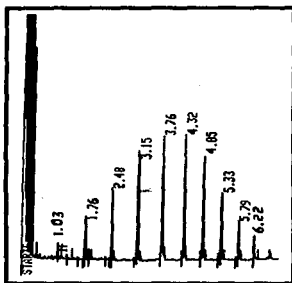
REACTIVO	REPRODUCIBILIDAD	REPETIBILIDAD
	DESVIACION ESTANDAR RELATIVA (%)	
HMDS	13.62	3.32
HMDS + TMCS	3.48	5.04
BSTFA	3.60	5.10

Tabla V
Estudio de agentes silanizantes

4.2.2. Selección de estándar Interno

Para mejorar la repetibilidad entre inyecciones se probó utilizar como estándar interno el tetraetilenglicol, el cual tiene la ventaja de comportarse igual que el PEG-400 por lo que puede ser adicionado antes de la extracción. Sin embargo, encontramos pequeñas cantidades de tetraetilenglicol ($n=4$) en el PEG-400 (de $n=5$ a $n=13$) por lo que se

descartó su utilización (Cromatograma 3), y ya que no se encontró otro estandar que pudiera ser adicionado antes de la extracción se utilizó escualano adicionado después de la extracción, obteniendo resultados satisfactorios (Tabla VI)



Cromatograma 3
PEG-400
Extracción en Fase sólida.
Formación del derivado silanizado.
El $t_r=1.03$ es tetraetilenglicol
(comparar con cromatograma 6)

ESTANDAR INTERNO	REPETIBILIDAD
	DESVIACION ESTANDAR RELATIVA (%)
Ninguno	5.2
Escualano	2.6

Tabla VI
Repetibilidad de inyección
con y sin estandar interno

4.2.3. Extracción en fase sólida.

Es imposible el análisis directo de PEG-400 en las muestras de suero desproteinizadas debido a la gran cantidad de interferencias que presenta (Cromatograma 4).

Para estandarizar el procedimiento de extracción del PEG en fase sólida utilizando cartuchos de sílice descrito en la metodología se realizó un estudio preliminar de cromatografía en placa con varios eluyentes entre los cuales fueron seleccionados el cloroformo como disolvente de lavado y el metanol como eluyente (Figura 1).

Los volúmenes de lavado y elución fueron establecidos tras coleccionar y analizar de 1 ml en 1 ml, 4 ml de cada uno de los disolventes después de pasarlos por el cartucho con un muestra de suero adicionada con PEG-400. Encontramos que con 3 ml de cloroformo se elimina gran cantidad de interferencias lo que permite cuantificar el PEG-400 que eluye posteriormente con 3 ml de metanol (Cromatograma 5 y 6).

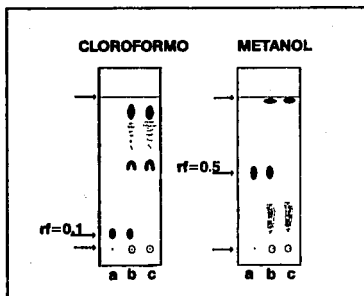
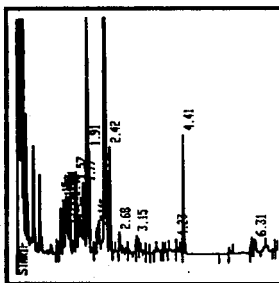
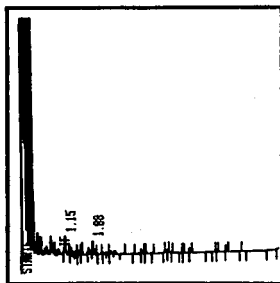


Figura 1
cromatografía en placa (fase sílice)

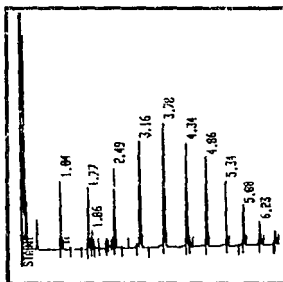
a) PEG. b) PEG + suero desproteínizado, c) suero desproteínizado



Cromatograma 4.
suero sin Extracción en fase sólida
Formación del derivado silanizado.



Cromatograma 5
.Suero. Extracción en fase sólida
Formación del derivado silanizado.



Cromatograma 6
 Suero adicionado con PEG-400
 Extracción en Fase sólida
 Formación del derivado silanizado.
 El $t_r=1.04$ es tetraetilenglicol
 adicionado ($n=5$)

4.2.4. Linealidad, reproducibilidad y % de recuperación

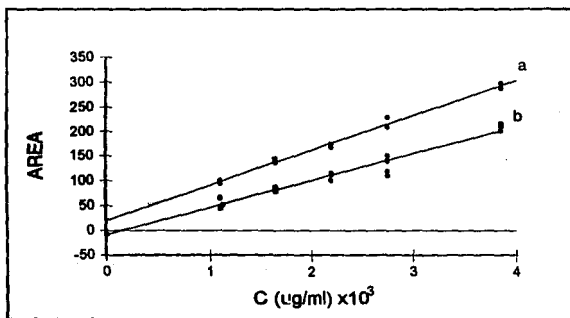
La curva de calibración es lineal en el intervalo de concentración de 1100 a 3850 $\mu\text{g/ml}$, la ecuación de esta línea es $y = 0.054 \cdot x - 7.9$ (Gráfica I) y la prueba de hipótesis de linealidad se encuentra en las Tablas VII y VIII.

Fuentes de variación	gl	suma de cuadrados	cuadrado medio
Desviación de las medias respecto a la recta de regresión	3	580.05	180.01
Desviación de los valores de cada grupo con la media de su grupo	5	741.39	148.27

Tabla VII
 Datos para prueba de linealidad

HIPOTESIS	F a=0.05, 3,5 gl	F calculado	CONCLUSION
$H_0 Y= a+bX$	5.41	1.21	No se rechaza H_0
$H_a Y\neq a+bX$			

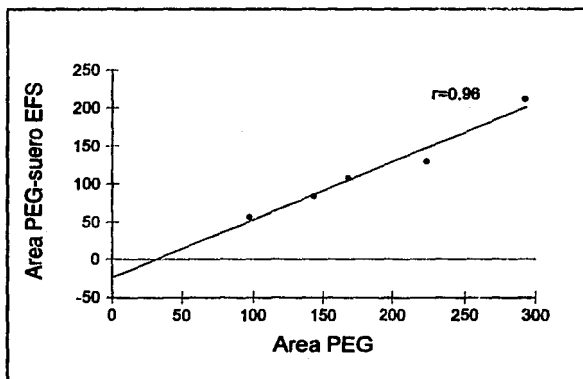
Tabla VIII
Prueba de linealidad
para la curva de calibración



Gráfica I
Curva de calibración
a) PEG, b) PEG extraído del suero en fase sólida

En la curva de calibración de PEG-400 adicionado a suero con todo el tratamiento y manipulación subsecuente la reproducibilidad (desviación estandar relativa) es de 11.48%.

Los datos y la prueba de hipótesis de correlación entre el área de PEG-suero extraído en fase sólida y el área de PEG directo se encuentran en la Tabla IX. La ecuación de esta línea es $y = 0.76 \cdot x - 23.53$ (Gráfica II). Los intervalos de confianza para la pendiente y la ordenada al origen se encuentran en la Tabla X. Donde puede observarse que la recuperación de PEG-400 adicionado a suero después de su desproteínización y extracción en fase sólida es de $77 \pm 27\%$ y no hay evidencia de errores sistemáticos ($\alpha=0$).



Gráfica II
Correlación entre PEG solo y
PEG extraído de suero

HIPOTESIS	r	gl	t _{α=0.05}	t calculado	CONCLUSION
H ₀ r = 0	0.96	3	2.353	21.17	Se rechaza H ₀
H _a r > 0					

Tabla IX

Prueba de hipótesis para la correlación entre PEG-suero extraído y PEG

	X	S	gl	t _{α/2=0.05}	Intervalo de confianza al 95%
Pendiente	0.77	0.08	3	3.182	0.7641 ± 0.28
Ordenada al origen	-24	17.04	3	3.182	-23.53 ± 54.22

Tabla X

Datos de la correlación entre PEG-suero extraído y PEG

4.3. Influencia del desgaste sobre la permeabilidad intestinal al PEG-400

En la Gráfica III se muestra la cinética de absorción-eliminación de PEG-400 en los tres grupos de animales. Observamos que el PEG-400 se absorbe rápido, probablemente, en las porciones altas del intestino delgado, y se elimina aproximadamente 3 hr después de su administración. En los tres grupos el transporte de PEG-400 sigue una cinética de primer orden, es un modelo de un compartimiento. Las curvas se ajustan a la siguiente ecuación: (56)

$$c = \frac{(K_a \cdot F \cdot X_0)}{V \cdot (K_a - K_e)} \cdot (e^{(-K_e \cdot t)} - e^{(-K_a \cdot t)})$$

Donde

K_e = Constante de eliminación

K_a = Constante de absorción

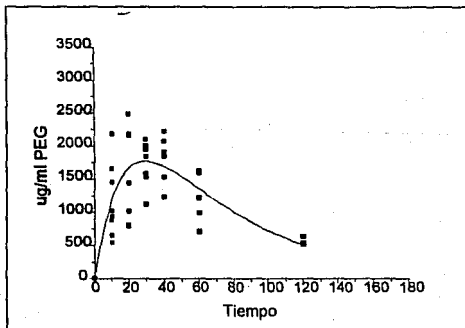
V = Volumen de distribución

F = Fracción de dosis disponible

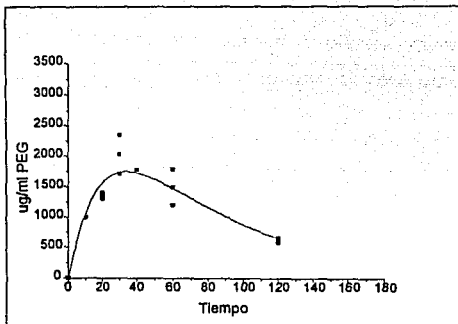
X_0 = Dosis administrada

t = Tiempo

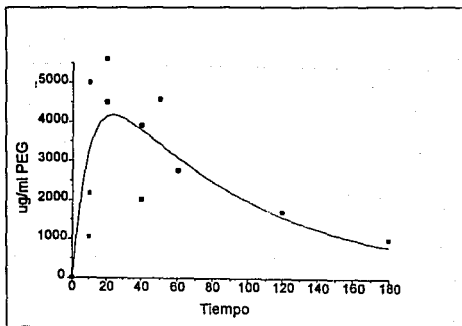
En la Gráfica III, IV, V y en la Tabla XIII se muestra que la dispersión de las mediciones en el grupo II es mayor que en los otros dos grupos, lo que obedece a que además de las diferencias individuales de cada animal que hay en todos los dos grupos, en el grupo II existen diferencias en el grado de desgaste para cada animal.



Gráfica III
Ratones normales



Gráfica IV
Ratones inyectados con bacteria no desgastados



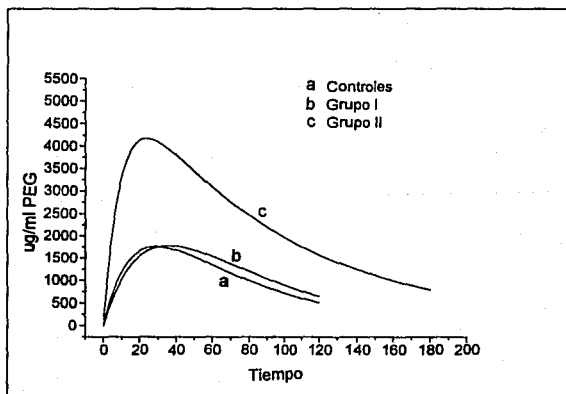
Gráfica V
Ratones desgastados

Grupo	N	S
Control	40	23.81
I	9	16.14
II	13	75.69

Tabla XII

Desviación de los puntos
a la curva ajustada correspondiente

En la Gráfica VI y en la Tabla XIII se encuentra la gráfica y los datos del ajuste en los tres grupos



Gráfica VI

Cinética de absorción-eliminación
en los tres grupos de ratones.

Grupo	Ka	Ke	Area	t max (min)	Cmax(ug/ml)
Control	0,069	0,015	139201	23,85	1735
I	0,061	0,015	143510	24,97	1799
II	0,067	0,0082	411000	23,57	4172

Tabla XIII
Datos de la cinética

En la Tabla XIV se encuentran los resultados de los límites de confianza para los parámetros de la gráfica de animales control por ser donde hay un mayor número de animales. Hay que señalar que para un ajuste confiable de los parámetros y del orden de la cinética se requieren un mayor número de puntos a diferentes tiempos y si no puede ser de un solo individuo es necesario que exista a cada tiempo un número grande de individuos para obtener un buen promedio.

Por lo anterior con los datos aquí presentados podemos conocer alteraciones entre los grupos en estudio, sin embargo si se desea afinar los parámetros, comprobar el orden de cinética y realizar el análisis estadístico adecuado se debe rediseñar el estudio con la información aquí presentada para obtener la cinética de absorción-eliminación con por lo menos cuatro puntos para la absorción (antes de 25 min) y cuatro para la eliminación, así como aumentar y controlar el número de ratones a cada tiempo.

Parametro	Estimado	S	Intervalo de confianza al 95 %
Ka	0.066	0.013	0.023 - 0.108
Ke	0.0154	0.0021	0.0086 - 0.0271

*Tabla XIV
Datos del grupo de animales control*

Podemos observar en la Gráfica VI y en la Tabla XIII que no hay diferencias importantes en la concentración de PEG-400 entre los animales control y los animales inyectados que no mostraron síntomas de enfermedad (área bajo la curva muy parecida), mientras que en el grupo de animales desgastados la concentración de PEG-400 resultó mucho mayor.

La vida media de eliminación de los animales del grupo II es de 86.6 min, es mayor que en los animales control y los del grupo I que es de 46 min. Es decir que los animales desgastados tienen un retraso en el tiempo de eliminación de PEG-400.

No hay diferencias en la vida media de absorción entre los grupos en estudio, para los tres es de 10 a 11 min.

No se encontró ninguna relación ni diferencia en la absorción intestinal de PEG-400 entre hembras y machos de cada grupo (Tabla XIV) por lo que se trabajaron indistintamente.

HIPOTESIS	DIFERENCIAS	gl	t $\alpha=0.05$	t calculado	CONCLUSION
H ₀ $\bar{X}_H = \bar{X}_M$	$\bar{X}=263$	4	2.132	0.5719	No se rechaza H ₀
H _a $\bar{X}_H > \bar{X}_M$	$S=603$				

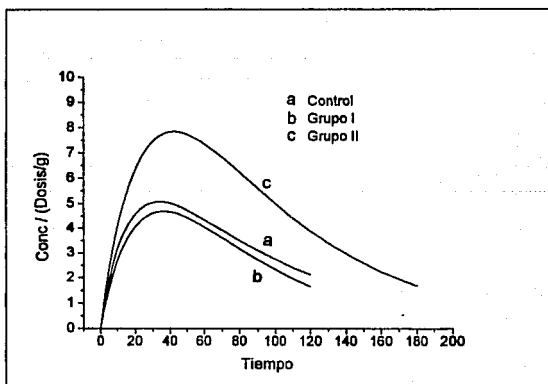
Tabla XIV
Prueba de hipótesis sobre
influencia del sexo sobre la absorción de PEG

A todos los animales se les administró la misma dosis de PEG-400 (4000 μ g) (suponiendo un peso promedio de 10 g), Para esto nos basamos en los artículos mencionados en los antecedentes de este trabajo, los cuales recomiendan la administración 10g de PEG-400 a humanos adultos sin ajustar al peso de cada uno. Al igual que en los humanos adultos no son grandes las diferencias en los pesos de los animales que pertenecen a un mismo grupo. Sin embargo los ratones del grupo II son significativamente más pequeños, y surgió la duda de si los animales del grupo desgastado presentaban una mayor absorción de PEG-400, por haber recibido más cantidad de PEG-400 por gramo de peso.

Para aclarar este punto se dividió la concentración de PEG-400 encontrada en suero entre la dosis/g de peso administrada a cada animal. Este cociente debe ser una constante para los animales de un mismo grupo y a un mismo tiempo. Y si es verdad que los animales desgastados presentan una mayor concentración solo por haber recibido proporcionalmente mayor cantidad, entonces a un mismo tiempo, el

cociente debe ser igual que en los otros dos grupos, ya que la absorción de PEG-400 es directamente proporcional a la dosis administrada (47).

En la Gráfica VII se muestra la cinética de los valores del cociente antes mencionado en función del tiempo, donde se puede ver que la curva ajustada de los animales desgastados sigue siendo diferente a las otras dos curvas, y por lo tanto podemos decir que los animales desgastados tienen una mayor cantidad de PEG-400 por tener alterada la permeabilidad intestinal.



Gráfica VII
Cinética obtenida después de corregir
con la dosis por gramo de peso de cada animal

CAPITULO 5. DISCUSION.

5.1. Manifestaciones del síndrome del desgaste

Al aplicar el procedimiento descrito por Esketdt (10) para inducir el síndrome desgastante en ratones recién nacidos, se obtuvo una mortalidad muy elevada (46.6%) que redujo significativamente, a 32, el número de animales sobrevivientes después de las inyecciones de estafilococos. De éstos, tres murieron por accidentes durante la colocación de la sonda intragástrica. De los 29 ratones restantes, solamente 16 (31.6%) desarrollaron el cuadro clínico del síndrome. Hubo 13 animales (21.6%) que, a pesar de recibir las inyecciones con bacterias muertas, al final del experimento tenían una apariencia física similar a la de los animales sanos del grupo control.

Por estas dos razones (la mortalidad elevada y la ausencia de una respuesta desgastante en un gran número de ratones), resultó baja la cantidad de animales que pudieron ser utilizados para el estudio de la permeabilidad intestinal. Esta cantidad, 16, estuvo muy por abajo de la expectativa inicial, considerada en el protocolo del trabajo, si se toma en cuenta que el experimento fue diseñado para trabajar con 120 ratones, de los cuales 60 serían inyectados con estafilococos.

La mortalidad elevada puede ser atribuida a varios factores. Primero, a la enfermedad desgastante en sí misma que, en algunos

casos, provocó un deterioro exagerado de las condiciones físicas y de la competencia inmunológica de los ratones. Segundo, al canibalismo de las madres de los animales, que se incrementa si las crías se encuentran enfermas. Y tercero, a que no son óptimas las condiciones ambientales (control de la temperatura, etc.) del Bioterio de la Facultad. Como se obtuvieron resultados negativos al cultivar la suspensión de estafilococos inactivados, se puede descartar la posibilidad de que los ratones hubieran recibido inyecciones intraperitoneales de bacterias vivas. Los microabcesos que se encontraron en el peritoneo y en varios órganos abdominales de los animales, en el momento de sacrificarlos, no estuvieron causados por estafilococos y, más bien, se pueden asociar a la inmunodeficiencia grave de los animales desgastados.

El segundo problema, la ausencia de una enfermedad desgastante a pesar de las inyecciones intraperitoneales con bacterias inactivadas, ya había sido observado por Esketdt desde sus primeros experimentos. Regularmente queda un grupo de animales que no se desgasta aunque haya sido inoculado con la suspensión de bacterias muertas (10). Sin embargo, en nuestras manos resultó muy alta (45%) la proporción de ratones inyectados que no presentaron síntomas del síndrome desgastante. Existe la posibilidad de que, en algunas camadas, la serie de inyecciones no haya comenzado inmediatamente después del nacimiento. Esketdt ya había señalado (10) que una pequeña diferencia de horas en el inicio de las inoculaciones podía influir decisivamente en la expresión del síndrome tres semanas más tarde. El error al ajustar nefelométricamente la suspensión de las bacterias inactivadas, es decir,

que éstas tuvieran una concentración inferior a la deseada, aunque factible se puede considerar una posibilidad remota. Nuevamente las condiciones y la organización del Bioterio fueron las que más influyeron para impedir el inicio de la inducción del síndrome en el momento preciso.

De todos modos, no obstante el pequeño número de animales desgastados de los cuales se pudo obtener una muestra de sangre para medir la concentración del PEG-400, se logró realizar la cinética de absorción - eliminación.

5.2. Estudio de PEG en suero

En los trabajos de investigación clínica publicados recientemente sobre el estudio de la permeabilidad intestinal, el PEG-400 ó 600 se administra por vía oral y, posteriormente, se mide la concentración de la molécula en una muestra de orina de 6 horas (47-58). La información que se obtiene con este procedimiento es la concentración total absorbida y eliminada en las 6 hr. Tiene la ventaja, al no coleccionar muestras seriadas de sangre venosa, de no ser traumático para la persona y es más económico ya que la muestra a analizar es solo una. Sin embargo el realizar el estudio en muestras de suero proporciona una mayor información.

Por otra parte, en el caso del experimento diseñado como trabajo de la presente tesis, desde un principio el análisis del PEG-400 en

muestras de orina significaba aplicar una serie de procedimientos relativamente complejos (cateterismo vesical o uretral, inmovilización del animal, etc) para obtener una cantidad suficiente de orina de ratones de un mes de edad. El segundo punto que influyó para rechazar el análisis de las muestras de orina estuvo dado por la literatura publicada en favor de un posible daño renal del animal desgastado.

Como el objetivo del trabajo era el estudio de la permeabilidad del intestino, se decidió finalmente tomar una muestra de sangre de cada ratón aunque, al hacer esto, se perdía la posibilidad de obtener la cinética de cada animal. Sin embargo, como el estudio se había programado con 60 animales desgastados y 50 controles, se consideró que esta cantidad de ratones permitiría sacrificar varios ratones a distintos tiempos y obtener una imagen fiel de la cinética de la absorción, tanto en el caso del desgaste como en el grupo control.

5.3 Método analítico

Como ya se mencionó, el trabajo que informa los resultados del análisis del PEG-400 en muestras de suero (55) donde el procedimiento de extracción del mismo con cloruro de metileno es insatisfactorio, ya que el PEG-400 presenta baja solubilidad en líquidos poco polares (56). Con el método aquí presentado se obtienen extractos limpios de PEG-400, lo cual permite realizar el estudio del curso de los niveles de PEG-400 en

suero a través del tiempo y de los niveles excretados, así como la velocidad de absorción y eliminación del mismo.

El uso de BSTFA para la formación del derivado silanizado, de entre los silanizantes probados, es el que ofrece una mejor respuesta respecto a la concentración, tal como lo propuso en 1986 Irving et al (48). El uso de escualano como estándar interno, aunque no se puede adicionar desde el momento de la obtención de la muestra de suero, permite un control del volumen final con lo que se obtiene una repetibilidad satisfactoria. La reproducibilidad del método es apropiada para el seguimiento de la cinética de absorción-eliminación de PEG-400 en los grupos de ratones en estudio, donde las variaciones encontradas se deben fundamentalmente a las diferencias entre animales ya que la varianza de los datos aportada por el método es menor que la varianza aportada por los datos de los animales.

5.4 Influencia del desgaste sobre la cinética de absorción de PEG-400

Los resultados revelan que la enfermedad desgastante aumenta la permeabilidad intestinal.

Las pruebas estadísticas aplicadas mostraron que, en los ratones de un mes de edad, el sexo es una variable que no influye de una manera

significativa en la gravedad de la pérdida de peso del animal desgastado y tampoco en la absorción del PEG a través del intestino.

En los animales desgastados debe haber alteraciones en la morfología intestinal provocadas por la respuesta del animal a los antígenos bacterianos con los cuales fueron inoculados. Esta respuesta es principalmente mediada por una producción alta de TNF, el cual es conocido por provocar entre otras cosas necrosis intestinal (30,31)

Existen trabajos de tipo morfológico (microscopía electrónica) en animales desnutridos (61) y animales con deficiencia de zinc (62) que reportan alteraciones en las vellosidades y en las uniones intercelulares de las células epiteliales del intestino. Proponen que a través de estas alteraciones morfológicas es como se pueden generar reacciones de alergia a ciertas proteínas de los alimentos, ya que las uniones intercelulares se encuentran debilitadas, el espacio intercelular es mayor y se facilita el paso de macromoléculas.

En el síndrome de desgaste, aún no se han realizado experimentos para demostrar si también existen estas alteraciones morfológicas. Sin embargo los ratones desgastados también presentan características similares a las mencionadas en los trabajos anteriores, es decir, tienen un elevado grado de desnutrición y deficiencia de zinc en algunos órganos (15). De tal forma que un mecanismo de esta naturaleza podría estar participando en el aumento de la permeabilidad intestinal que encontramos y en la traslocación bacteriana estudiada en un trabajo anterior (14).

El resultado de la reducción en la velocidad de eliminación renal de PEG-400 en los animales desgastados pudiera ser interpretado como una disminución patológica de la filtración glomerular, ya que éstos ratones presentan notables modificaciones en su composición orgánica, alteraciones a nivel celular, y la presencia del ya mencionado TNF, pudiendo esto afectar al igual que a otros tejidos al riñón, reduciendo su capacidad funcional. Sin embargo también se podría explicar como un ajuste fisiológico adecuado a la composición del organismo, cuya homeostasis ha de defender, tal como ocurre en el niño desnutrido, que tienen un gran desequilibrio electrolítico y presentan intensas pérdidas de líquidos orgánicos, y donde la reducción en la velocidad de filtración glomerular resulta ser un hecho favorable para la conservación del volumen acuoso (63,64)

CAPITULO 6.- CONCLUSIONES.

El grupo de animales a los que se les indujo el síndrome del desgaste presentó una mortalidad elevada (46.6%).

De 53.3% sobrevivientes solamente el 31.6% expresó las manifestaciones completas del síndrome.

El método desarrollado para analizar PEG-400 en suero es apropiado al estudio.

Se encontró en los ratones desgastados un aumento de los niveles de PEG-400 en suero y una reducción en la velocidad de eliminación renal.

BIBLIOGRAFIA

1. Stiehm, Richard.
Inmunologic Disorders in Infants and Children
W.B. Saunders Co.
USA, 1989
2. Fernando García-Tamayo
Trastornos del sistema inmunitario
Pediatria, 1991, 1 : 442
3. Miller, J. A. P. y J.G. Howard
Effect of Thymectomy on the Immunological Responsiveness of the Mouse
Proc. R. Soc., (Biol), 1962, 156 : 415
4. Billingham, R. E., L. Brent y B. Medawer
Actively Acquired Tolerance of Foreign Cells
Nature., 1953 172 : 603
5. Schlesinger, M. Marx, R
Wasting disease induced in young mice by administration of cortisol acetate.
Science, 1964, 143 : 965
6. Reilly R.D. Thompson J.S. Bielski R.K. Severson C.D.
Estradiol-induced wasting syndrome in neonatal mice
J. Immunol., 1967, 98 : 110
7. Julieta, John W
Etiologi of the Wasting Diseases
J.Infect. Dis., 1973, 128 suppl: S99.

8. Ekstedt, R.D.; Hayes, L.L.
Rut Disease Induced by non-living Bacterial Antigens
J. Immunol., 1967: 110
9. Pierpaoli, W.; Sorkin, E
Hormones, Thymus and Lymphocyte Functions.
Experientia, 1972, 28 : 1385
10. Ekstedt, R.D.; Nishimura, E.T.
Rut disease induced in neonatal mice by sterile bacterial vaccines
J. Exp. Med., 1964 120 : 795.
11. Garcia-T F, Aguilar AE, Rivera R, de Leon S, Pastelin R, Lastra MD.
Consecuencias de la interacción de productos bacterianos con el sistema inmunitario de ratones recién nacidos.
Boi Med Hosp Inf Mex., 1990, 47 : 173-177
12. Garcia-Tamayo F, Rivera R, Fierro L.
Oral tolerance impairment in mice with staphylococci-induced wasting syndrome.
Arch Med Res., 1992, 23 : 33-37
13. Laura Bonifaz
Utilidad de las sales de tetrazolium para estudiar la proliferación de linfocitos en ratones desgastados.
Tesis de licenciatura (QFB) Fac Química, UNAM. 1991.
14. Jose Alberto Casales
Traslación bacteriana en ratones CD1 con el síndrome de desgaste.
Tesis de licenciatura (QFB) Fac Química, UNAM. 1991.
15. Aguirre Mónica
Efecto del zinc sobre la Hipersensibilidad tardía.
Tesis de licenciatura (QFB) Fac Química, UNAM. 1991.

16. Bruciaga G, Terrazas LI, Garcia-Tamayo F.
Producción de TNF α por macrófagos peritoneales estimulados con una cepa de Staphylococcus aureus inactivados.
XXXV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Veracruz, Ver (Mexico) 1992.
17. Agurre M, Lastra MD, Terrazas LI, Saldivar L, Garcia-Tamayo F.
Utilidad de zinc para estimular las reacciones de hipersensibilidad tardía en ratones inmunodeficientes.
Rev Int Contam Ambient., 1991, 7 : 112
18. Kind, P.; campbell, P.; Rowlands, D.T.
Endotoxin-induced wasting disease in mice : a temporary condition explained by endotoxin tolerance.
Proc. Soc Exp. Biol. Med., 1967, 125 : 495.
19. Garcia-Tamayo F, Fierro L, Lastra MD.
Inducción y recuperación del desgaste inmunológico
Bol Med Hosp Inf Mex., 1991, 48 : 559-564
20. Wells, C. L., M. A. Madaus, R. L. Simmonds
Proposed Mechanisms for the Traslocation of Intestinal Bacteria
Rev. Infect. Dis., 1988, 10 : 958
21. Owens W. E., Berg R. D.
Bacterial traslocation from the gastrointestinal tract of anthymic (nu/nu) mice
Infect. Immun., 1980, 27 : 461
22. Deitch, E. A.
The Role of Intestinal Barrier Failure and Bacterial Translocation in the Development of Sístemic Infection and Multiple Organ Failure
Arch. Surg., 1990, 125 : 403

23. Berg R. D.
Bacterial traslocation from the gastrointestinal tracts of mice receiving immunosuppressive chemoterapeutic agents.
Corr. Microbiol., 1983, 8 : 285
24. Wells, C. L., Madaus M. A., Simmoms R. L.
Role of the macrophage in the traslocation of intestinal bacteria
Arch. Surg., 1987, 122 : 48
25. Madaus M. A Wells C. L. Platt J. L. Condie R.M. Simmons R.L.
Effect of T cell modulation on the traslocation of bacteria from gut and mesenteric lymph nodes.
Ann. Surg., 1988, 207 :387
26. Beutler B. Cerami A.
The biology of cachectin / TNF-A primary madiator of the host response.
Ann. Rev. Immunology., 1989, 7 : 625
27. Yoneda, T. M. A. Alsina, J. B. Chávez, L. Bonewald, R. Nishimura y G. R. Mundy
Evidence that Tumor Necrosis Factor Plays a Patogenic Role in the Paraneoplastic Syndromes of Cachexia, Hypercalcemia, and Leukocytosis in a Human Tumor in Nude Mice
J. Chin. Invest., 1991, 87 : 977
28. Nestel F.P. Seemayer T.A. Lapp W.S.
Cachectin production during acute graft vs host reaction.
FASEB J., 1988, 2 : A448 (abstrac)
29. Sung, X-m. Hsueh W.
Bowel necrosis induced by tumor necrosis factor in rats is mediated by plateled by platelet-activating factor.
J. Clin Invest., 1988, 81 : 1328

30. Kevin J. et al.
Shock and Tissue Injury Induced by Recombinant Human Cachectin
Science., 1986, 234 : 470
31. Xiaoming sun and Wei Hsueh
Platelet-activating factor produces shock in vivo complement activation, and tissue injury in mice.
J. Immunol., 1991, 147 : 509
32. Pekala P.H. et al.
Model for cachectin in chronic disease : secretory products of endotoxin-stimulated macrophages induce a catabolic state in 3T3-L adipocytes.
Trans. Assoc. Amer. Physicians., 1984, 97 : 251
33. Kaiserlian D. et al.
The wasted mutant mouse. I An animal model of secretory Ig A deficiency with normal serum Ig A.
J. Immunology., 1985, 135 : 1126
34. Kaiserlian D. et al.
The wasted mutant mouse. II Immunological abnormalities in a mouse described as a model of ataxia-telangiectasia.
Clin. Exp. Immunology., 1986, 63 : 562
35. Aubrey J. K. Fred S. R.
Gastrointestinal complications of immunodeficiency syndromes
Gut., 1977, 46 : 243
36. R. K. Chandra
Food antibodies in malnutrition
Arch. Dis. Childh., 1975, 50 : 532

37. Menzies I. S.
Intestinal Permeability in coeliac disease
Gut., 1972 13 : 847
38. Fordtran J.S. et al.
Water and solute movement in the small intestine of patients with sprue
J. Clin. Invest., 1967, 46 : 298
39. Pearson A.D.J. et al.
Intestinal permeability in children with Crohn's disease and coeliac disease
Br. Med. J., 1982, 285 : 20
40. Menzies I. S.
Abnormal intestinal permeability to sugars in villous atrophy
Lancet, 1992, 2 :1107
41. Fortran J.S. et al.
Permeability characteristic of human small intestine
J. Clin. Investi, 1965, 44 : 1935
42. Cobden I. Dickinson R. J. Rothwell J. Axon A.T.R.
Intestinal permeability assessed by excretion ratios of two molecules: Results in coeliac disease
Br. Med. J., 1978, 2 : 1060
43. Loehry C.A. et al.
Permeability of the small intestine to substances of different molecular weight
Gut., 1970, 11 : 466
44. Bright-Asare P. Binder H.J.
Simulation of colonic secretion of water and electrolytes by hydroxy fatty acids
Gastroenterology., 1973, 64 : 81

45. Billich C.O. Levitan R.
Effects of sodium concentration and osmolarity on water and electrolyte absorption from the intact human colon
J. Clin. Invest., 1969, 48 : 1336
46. Loehty C.A. Kingham J. Baker J.
Small Intestinal permeability in animals and man
Gut., 1973, 14 : 683
47. Chadwick V. S. Phillips S. F. Hofmann A. F.
Measurement of intestinal permeability using low molecular weight polyethylene glycols (PEG 400). I Chemical analysis and biological properties of PEG 400
Gastroenterology., 1977, 73 : 241
48. Irving et al.
Polyethylene glycol polymers of low molecular weight as probes of intestinal permeability. I Innovations in analysis and quantitation.
J. Lab: Clin. Med., 1986, 107 : 290
49. Krugliak P. Hollander D. Le K. Ma T. Dadufalza V. D. Katz K. D.
Regulation of polyethylene glycol 400 intestinal permeability by endogenous and exogenous prostanoids. Influence of non-steroidal anti-inflammatory drugs
Gut., 1990, 31 : 417
50. Serrander R. Magnusson K. Kihlström E. Sundqvist T.
Acute Yersinia Infections in Man Increase Intestinal Permeability for Low-molecular Weight Polyethylene Glycols (PEG 400)
Scand. J. Infect. Dis., 1986, 18 : 409
51. Hollander D. Tarnawski H.
Ageing-Associated Increase Intestinal Absorption of Macromolecules
Gerontology., 1985, 31 : 133

52. Jennifer B. Bouska Sidney F. Phillips
Simple method for gas-liquid chromatographic analysis of polyethylene glycol 400 in biological fluids
J. of Chromatography., 1990, 183 : 72
53. Chadwick V. S. Phillips S. F. Hofmann A. F.
Measurement of intestinal permeability using low molecular weight polyethylene glycols (PEG 400) II Application to normal and abnormal permeability states in man and animals
Gastroenterology., 1977, 73 : 247
54. Irving et al.
Polyethylene glycol polymers of low molecular weight as probes of intestinal permeability. II Application to infants and children with intestinal disease.
J. Lab: Clin. Med., 1986, 108 : 37
55. Robinson et al.
Low-Molecular-Weight Polyethylene Glycol as a Probe of Gastrointestinal Permeability after Alcohol Ingestion
Digestive Disease and Sciences., 26 : 971
56. Thomas Y. Ma., Daniel Hollander, Pavel Krugliak, Kent Katz
PEG 400, a Hydrophilic Molecular Probe for Measuring Intestinal Permeability
Gastroenterology., 1990, 98 : 39
57. R. Baker, Jean Ferrett
Estimation of polyethyleneglycols in human urine for studies of intestinal absorption
J. of Chromatography., 1983, 273 : 421

58. Daniel Katz, Daniel Hollander, Hamid M. Said, Violeta Dadufalza
Ageing-Associated Increase in Intestinal Permeability to Polyethylene Glycol 900
Digestive Diseases and Sciences., 1987, 32 : 285

59. National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1984.
Performance standards test, ed. 3, MZ-A3 4: 369

60. Federico Gomez
Desnutrición
Bol Med Hosp Inf Mex., 1946, 3 : 543.

61. Worthington B, Boatman E, and Kenny G.
Intestinal absorption of intact protein in normal and protein-deficient rats
Am. J. Clin. Nutr., 1974., 27 : 276

62. Moran R, and Lewis J.
The effects of Severe Zinc deficiency on Intestinal Permeability : An ultrastructural Study
Pediatr. Res., 1985, 19 : 968.

63. Gordillo G.
Problemas en pediatría. Trastornos renales en niños con desnutrición avanzada
Bol Med Hosp Inf Mex., 699.

64. Kamala Kishnaswamy.
Drug Metabolism and Pharmacokinetics in malnutrition.
Clinical Pharmacokinetics., 1978, 3 : 216

- 65.- Milo Gibaldi, Donal Perrier
Pharmacokinetics
New York 1975

- 66.- Chester, J.K., and M. Will
Some factors controlling food intake by zinc-deficient rats
Br. J. Nutr., 1973, 30 : 555