



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

16
27

Facultad de Química

EXAMEN DE CALIFICACION
1996

"PRODUCCION DE CAQUECTINA POR MACRO-
FAGOS PERITONEALES DE RATONES
DESGASTADOS".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A:
ROSA GABRIELA BRUCIAGA SANCHEZ

MEXICO, D. F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

Jurado asignado :

Presidente Prof. AIDA NAVAS PEREZ

Vocal Prof. FERNANDO GARCIA TAMAYO

Secretario Prof. LAURA CECILIA BONIFAZ ALFONZO

1er Suplente Prof. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDES

2 do Suplente Prof. JORGE FERNANDO PANIAGUA SOLIS

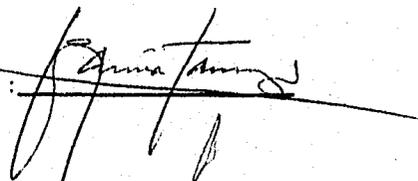
Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Investigación en Inmunología

Departamento de Biología, Facultad de Química, UNAM.

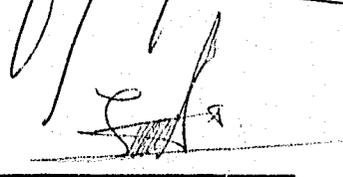
Asesor del tema :

DR. FERNANDO GARCIA TAMAYO :



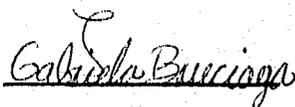
Supervisor Técnico :

Dr. LUIS IGNACIO TERRAZAS V. :



Sustentante :

R. GABRIELA BRUCIAGA SANCHEZ :



Porque todo lo que tengo

y lo que soy,

es por Ti y para Ti.

Gracias Señor.

A mis Padres, Conchita y Federico.

A mis hermanos Julia, Lucio y Fede.

A Roberto.

Quiero expresar mi sincero agradecimiento:

Al Dr. Fernando García Tamayo por la asesoría
brindada durante el desarrollo de este trabajo.
Su paciencia y consejos son invaluable. Gracias.

Al Dr. Luis Ignacio Temazas Valdes por su
participación en la asesoría técnica.
Gracias por tu ayuda y dedicación.

Al Dr. J. Súlván López del I.N.E.R. por
la donación de la línea celular L-929.

Al Dr. Enrique Ortega del I.I.B. por las facilidades
brindadas para el desarrollo de este trabajo.

INDICE

CAPÍTULO 1.	INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2.	ANTECEDENTES	3
2.1	El Síndrome del Deagaste	3
2.2	Ceguera	5
2.3	El Factor de Necrosis Tumoral	6
2.4	Estructura	7
2.5	Biotransmisión	8
2.6	Receptores	9
2.7	Actividades del TNF α	10
2.8	Relación entre el TNF α y ceguera	11
2.9	El elemento Zinc	13
CAPÍTULO 3.	OBJETIVOS E HIPOTESIS	16
CAPÍTULO 4.	DISEÑO EXPERIMENTAL	17
CAPÍTULO 5.	MATERIAL Y MÉTODOS	18
5.1	Preparación de la suspensión de <i>S. aureus</i>	18
5.2	Animales	18
5.3	Inducción del Deagaste	18
5.4	Administración de zinc	19
5.5	Obtención de los macrófagos peritoneales	19
5.6	Cultivo de macrófagos peritoneales	19
5.7	Estimulación <i>in vitro</i> de los macrófagos peritoneales	20

5.8	Concentración óptima de <i>S. aureus</i> para estimular a los macrófagos peritoneales <i>in vitro</i>	20
5.9	Cultivo de las células L-929	21
5.10	Tripanización de las células L-929	21
5.11	Concentración óptima de mitomicina C para inhibir el crecimiento de las células L-929	21
5.12	Cuantificación de TNF α	22
5.13	Inactivación de TNF α por anticuerpos anti-TNF α	23
CAPÍTULO 6.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	24
CAPÍTULO 7.	RESULTADOS	25
7.1	Inducción del desgaste	25
7.2	Concentración óptima de mitomicina C	25
7.3	Concentración óptima de <i>S. aureus</i>	27
7.4	Inactivación del TNF α por anticuerpos anti-TNF α	28
7.5	Cuantificación de TNF α	30
CAPÍTULO 8.	DISCUSIÓN	36
CAPÍTULO 9.	CONCLUSIONES	44
CAPÍTULO 10.	BIBLIOGRAFÍA	45

1. INTRODUCCION

El desgaste es una de las principales manifestaciones que se observan en pacientes que se encuentran en las etapas finales de diversas enfermedades crónicas como cáncer y SIDA, así como en algunas enfermedades bacterianas (tuberculosis), o parasitarias (paludismo, malaria, leishmaniasis). El desgaste es un síndrome que se caracteriza por el deterioro físico paulatino, debido a la disminución del apetito (anorexia), y pérdida progresiva de peso (caquexia), que favorece el desarrollo de un estado inmune incompetente, aumentando el riesgo de adquirir infecciones secundarias. Por otro lado, el estado psicológico del paciente con desgaste también se altera presentando con frecuencia sentimientos de angustia, aislamiento y depresión. En general, su bienestar y calidad de vida disminuyen drásticamente. Por estas razones es importante estudiar las causas que originan el síndrome, así como buscar tratamientos o medidas profilácticas que ayuden a mejorar la condición física de las personas que sufren este padecimiento.

Se ha comprobado que uno de los principales mediadores de la caquexia es el Factor de Necrosis Tumoral (TNF α o caquectina). Es una citocina producida principalmente por los macrófagos y se encuentra en cantidades elevadas en el suero de personas que cursan con enfermedades crónicas, así como en animales de laboratorio en los que se ha inducido el síndrome en forma experimental.

En el Depto. de Biología de la Facultad de Química, UNAM, se ha desarrollado un modelo experimental del síndrome del desgaste, cuya inducción no depende de la infección del animal, si no de la inyección intraperitoneal de bacterias muertas. Se utilizan ratones Balb/c recién nacidos, los cuales, después de cuatro semanas de recibir inoculaciones de estafilococos muertos, presentan transitoriamente las alteraciones inmunológicas y los síntomas característicos del síndrome, entre los cuales la caquexia es uno de los más importantes. Con este modelo se han estudiado algunos mecanismos celulares que participan en el desarrollo del desgaste. Asimismo, el modelo ha servido para probar la efectividad de algunas medidas profilácticas y/o terapéuticas.

Con el propósito de prevenir la aparición del desgaste, los animales han recibido tratamientos con inmunoadyuvantes de origen bacteriano, hormonas del timo y sales de zinc. Durante la última década el elemento zinc ha sido foco de considerable interés por sus propiedades inmunoregulatorias. Se ha demostrado que el zinc tiene un papel importante en la ontogenia y el funcionamiento del sistema inmune y que su deficiencia puede causar alteraciones graves.

En el presente trabajo, se pretende estudiar si los macrófagos peritoneales de los animales desgastados producen una cantidad elevada de TNF α , y si hay alguna relación entre la producción de esta citocina y la administración del elemento zinc.

2. ANTECEDENTES

2.1.- EL SINDROME DEL DESGASTE.

Las personas con enfermedades crónicas presentan durante el desarrollo de la enfermedad inmunodeficiencias secundarias que favorecen la aparición de infecciones recurrentes causadas por microorganismos comensales que se vuelven oportunistas y se diseminan en el organismo al disminuir las defensas a nivel de la piel, tubo digestivo y aparato respiratorio. Si las infecciones recurrentes y la enfermedad primaria no son controlados, el paciente puede desarrollar un deterioro físico progresivo conocido como el síndrome del desgaste. Este síndrome se caracteriza por pérdida de peso (caquexia), anemia, anorexia, e incompetencia inmunológica. Además puede ser reproducido en forma experimental en animales de laboratorio, utilizando diversos procedimientos. Las formas de desgaste experimental más conocidas son la extirpación del timo (25), las reacciones injerto vs. huésped que provocan los trasplantes de linfocitos alogénicos (26), la administración de hormonas como el acetato de cortisol (27) o el estradiol (28), la eliminación del zinc de la dieta (29), y las inyecciones intraperitoneales de productos bacterianos como los lipopolisacáridos (LPS) o de suspensiones de bacterias muertas como los estafilococos del grupo A (31, 33). Todos estos procedimientos se caracterizan por causar una pérdida de peso, irritabilidad, infecciones de la piel y de las mucosas, diarrea recurrente, anorexia y finalmente la muerte (30). Según la técnica utilizada para su inducción, el desgaste experimental puede ser de carácter transitorio o definitivo. Además, puede variar la frecuencia con la que se presentan los síntomas y la incidencia de las principales manifestaciones patológicas (32). Sin embargo, los animales desgastados siempre presentan 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 utilizado para inducir el desgaste fue descrito en 1964 por Ekstedt et al (33), el cual consiste en la inyección intraperitoneal de estafilococos, inactivados por calor, en ratones recién nacidos.

El desgaste inducido de ésta forma en los ratones se caracteriza principalmente por un retardo en el crecimiento del animal, atrofia del timo, de la médula ósea y de los ganglios linfáticos, lo cual se traduce en una respuesta inmune deficiente y la consecuente susceptibilidad de los animales a las infecciones por microorganismos oportunistas. Otras características son el pelo ralo, el adelgazamiento de la piel, la esplenomegalia, alteraciones en el sistema endócrino y daño en el tubo digestivo.

Durante el estudio de este modelo murino se han logrado caracterizar algunos aspectos inmunológicos y fisiológicos de los animales desgastados. En la Tabla 1 se enumeran estas características.

Tabla 1.- Principales características de los ratones desgastados mediante la técnica de Ewald (33).

• Disminución de la producción de anticuerpos	(34)
• Pérdida de la tolerancia inmune contra antígenos administrados por vía oral	(35)
• Disminución de la respuesta proliferativa de linfocitos esplénicos estimulados <i>in vitro</i> con mitógenos	(36)
• Translocación de las bacterias intestinales	(37)
• Aumento de la concentración de zinc en timo	(22)
• Disminución de la respuesta de hipersensibilidad tardía a la ovoalbúmina	(22)
• Aumento de la permeabilidad intestinal	(39)
• Aumento en la respuesta proliferativa de timocitos estimulados <i>in vitro</i> con mitógenos	(40)
• Disminución de la respuesta proliferativa de linfocitos esplénicos estimulados <i>in vitro</i> con concanavalina A.	(40)
• Aumento en la producción de IL-6 por macrófagos estimulados con LPS	(41)
• Aumento en la captación de ⁶⁵ Zn por glándulas suprarrenales	(41)

Sin embargo, dos semanas después de terminadas las inyecciones intraperitoneales desaparecen todas estas manifestaciones y los animales continúan su vida en forma indistinguible a la de los animales que no recibieron tratamiento (38), por esta razón se considera que la inducción del desgaste mediante la inyección intraperitoneal de estafilococos inactivados es de carácter transitorio.

2.2.- CAQUEXIA

La anorexia, la pérdida de peso y la anemia, son manifestaciones características de las enfermedades crónicas y degenerativas. La pérdida peso exagerada, hasta llegar a la caquexia, se presenta en el 70% de los pacientes con algunos tipos de cáncer (11) y en un porcentaje más alto en los pacientes con SIDA (12), tuberculosis miliar, paludismo, y otras infecciones parasitarias (13). Los pacientes con caquexia, pierden más del 50% de su peso, previo a la enfermedad, debido a la falta de apetito y alteraciones en el metabolismo de los lípidos (11). Estos pacientes además presentan infecciones recurrentes a causa de una deficiencia en el sistema inmune, lo que facilita las complicaciones infecciosas y reduce la eficacia del tratamiento contra la enfermedad primaria. A medida que avanza la enfermedad y que la caquexia se instala progresivamente, se incrementan los requerimientos energéticos del paciente ya que, además de las necesidades básicas del organismo, por un lado se necesita desarrollar una respuesta inmune en contra de la enfermedad primaria, y por otro, existe un secuestro de nutrientes que depende del agente etiológico. Por ejemplo, se sabe que una vez desarrollada la caquexia algunas células tumorales no son capaces de efectuar adecuadamente la respiración como vía de degradación de la glucosa, utilizando en su lugar principalmente la glucólisis. De esta manera consumen hasta 10 veces más glucosa que una célula normal (14). A pesar de esto el paciente reduce su ingestión de calorías las cuales no alcanzan a satisfacer las necesidades energéticas que el cuerpo demanda. De este modo el paciente se vuelve dependiente de formas artificiales de nutrición, que en la mayoría de los casos, no resuelven el problema, (11).

Las causas de la caquexia no son conocidas perfectamente. Se sabe que además están involucradas alteraciones en los mecanismos que regulan el apetito y el sentido de gusto (11). Se cree que estas alteraciones están relacionadas con un gasto ineficiente de energía durante los procesos metabólicos que, bajo estas circunstancias, se desarrollan aceleradamente. Por ejemplo, en los procesos inflamatorios donde es común observar anorexia, se estimula la síntesis de proteínas de fase aguda (15), disminuye la producción de albúmina y ocurre un catabolismo acelerado de las proteínas del músculo y de los lípidos del tejido adiposo. Estos hechos dependen de la producción y liberación de diversas citocinas como la IL-1, la IL-6 y el TNF α (13). Numerosas veces se ha dicho que el TNF α tiene la capacidad de inducir anorexia y pérdida de peso. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que una gran variedad de factores pueden producir anorexia y/o pérdida de peso, por ejemplo, enteropatía obstructiva, mala absorción, secuelas de radioterapia o quimioterapia, intervenciones quirúrgicas, o complicaciones gastrointestinales (dolor al masticar o al deglutir, náuseas, meteorismo, diarrea o motilidad intestinal ineficiente) (11). Por estas razones es importante distinguir que la falta de apetito puede tener causas diferentes y además, que no todos los procesos con anorexia desarrollan caquexia.

2.3.- FACTOR DE NECROSIS TUMORAL

La existencia de un factor de necrosis tumoral (TNF α), fue propuesta desde 1893 por William B. Coley, debido a la capacidad de las endotoxinas de causar *in vivo* la necrosis hemorrágica de cierto tipo de tumores. El factor fue aislado del suero de ratones por Old y cols. en la década de los años 70's. En estudios independientes realizados años más tarde Rouzer y Cerami comprobaron que, además, era uno de los principales mediadores de la caquexia, actividad por la cual se le denominó caquectina (1). Actualmente se sabe que el TNF α es una de las principales moléculas mediadoras de la respuesta inmune, y que posee un gran espectro de actividades biológicas en células inmunes y no inmunes.

2.4.- ESTRUCTURA

El gen del TNF α se encuentra codificado en el brazo corto del cromosoma 6 humano (2) y del cromosoma 17 del ratón (2) en el límite de las regiones del MHC que contiene la información necesaria para la síntesis de las moléculas clase I y clase II del HLA. El TNF α humano es una proteína no glucosilada de 157 aminoácidos, y un peso molecular de 17 kDa. Además, presenta un puente disulfuro no indispensable para su bioactividad (2).

El TNF α maduro deriva de una molécula precursora, el pre-TNF α que posee 76 aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos en el extremo amino terminal de la proteína. Esta presuencia es utilizada por el TNF α como una ancla para unirse a la membrana celular produciéndose así la forma transmembranal de la molécula con un peso molecular de 26 kDa. A partir de esta se produce la forma libre del TNF α . Se ha demostrado que el TNF α membranal también presenta actividad citotóxica, siendo en los macrófagos el responsable de su acción citotóxica. El TNF α después de ser liberado se agrega espontáneamente mediante enlaces no covalentes para formar multímeros de tamaño variable, siendo el trímero el que posee la forma activa (2).

El TNF α está relacionado estructural y biológicamente con otra citocina conocida como linfotoxina (LT), que es producida solamente por células linfoides estimuladas con mitógenos y antígenos específicos, pero no con LPS (3). Al igual que el TNF α , la LT también tiene la capacidad de lisar células tumorales, compitiendo por el mismo receptor celular (4). Las dos moléculas son estructuralmente homólogas en un 30%, por estas razones la LT se conoce como TNF β . Cada una de estas citocinas representa el producto final de diferentes sistemas de señalización y pueden ser requeridas selectivamente dependiendo de la naturaleza del estímulo (3,4).

2.5.- BIOSÍNTESIS

La principal célula productora de TNF α es el macrófago (5), sin embargo, bajo estimulación adecuada, el TNF α es producido por otros tipos de células corporales, aunque en menor cantidad. Diversos estímulos invasivos pueden activar la producción de TNF α . Entre estos el más potente es el lipopolisacárido (LPS), y en menor medida las enterotoxinas y los complejos inmunes. Ciertos virus como el Sendai, el virus de la influenza, o el papilomavirus, los lisados de parásitos, de hongos y de ciertas bacterias Gram positivas, como los estafilococos, también son capaces de activar la producción de TNF α , aunque en menor cantidad (5).

La biosíntesis del TNF α es controlada en forma rigurosa principalmente a nivel transcripcional y postranscripcional. La molécula no es producida por células sin estimular, con excepción de las células cebadas que contienen TNF α almacenado en sus gránulos. En los macrófagos en reposo el gen del TNF α es transcrito en poca cantidad, además, el mensaje no es traducido. Sin embargo, después de la estimulación con LPS se producen grandes cantidades de la proteína en poco tiempo (5). Ciertos factores juegan un papel muy importante en la producción de TNF α . Por ejemplo, los glucocorticoides suprimen la producción de TNF α cuando se añaden a un cultivo de macrófagos antes de que estas células sean activadas con LPS. Los glucocorticoides actúan inhibiendo la transcripción y traducción. Sin embargo, una vez iniciada la traducción, son incapaces de inhibir la síntesis de TNF α (1). Otras citocinas también actúan sobre la producción de TNF α . Por ejemplo, el INF γ , por sí solo no induce la producción de TNF α pero sí aumenta el grado de transcripción y eventos postranscripcionales en los macrófagos activados con LPS. La IL-2, el C5a, el GM-CSF, y el CSF-1 tienen efectos similares. Por otro lado el TGF γ , la PGE $_2$ y la IL-6 inhiben la biosíntesis del TNF α , así como la pentoxifilina, la talidomida y la ciclosporina. También se ha observado que la adrenalina participa en la regulación de la síntesis y liberación de esta citocina (6). Cabe señalar que existe una regulación autocrina en la producción de TNF α , es decir, que la molécula de TNF α por sí misma induce su producción (7).

2.6.- RECEPTORES

La unión a receptores celulares específicos es el primer paso en la interacción TNF α -célula blanco. La presencia de receptores en la superficie celular es necesaria, más no suficiente, para que el TNF α lleve a cabo su efecto. Se ha podido comprobar que existen células tumorales que, aunque presentan receptores para TNF α en su superficie, son resistentes a la acción citotóxica de esta citocina.

Estudios recientes han demostrado que existen dos tipos de receptores: uno de 55 kDa (2), y otro de 75 kDa (2). Las secuencias de aminoácidos de la región extracelular de ambas moléculas son similares entre sí. Por el contrario las regiones intracitoplásmicas de cada receptor, no presentan homología entre ellas, ni se parecen a ninguna secuencia peptídica conocida. Los dos receptores unen TNF α y TNF β con afinidad semejante. La síntesis de cada receptor es regulada en forma independiente el uno del otro. Ambos receptores son coexpresados en la mayoría de las células y líneas celulares. Estos receptores, canalizan las señales desde la membrana celular hasta el núcleo para iniciar una serie de mensajes metabólicos. Cada receptor desencadena diferentes señales, por ejemplo, se ha demostrado que el receptor de 55 kDa depende la citotoxicidad celular, la inducción de la síntesis de PGE₂, y de la superóxido dismutasa, así como la expresión del receptor para IL-2 y del HLA-I. Aunque todavía no es clara la función del receptor de 75 kDa en células humanas, en el ratón se ha logrado relacionar su expresión con la proliferación de timocitos y linfocitos T citotóxicos (2). En suero y orina se han encontrado fragmentos solubles de la región extracelular de ambos receptores (2). En un principio fueron identificadas como proteínas inhibitorias de TNF α . La función de los fragmentos solubles pueden ser regular la actividad del TNF α en el organismo.

2.7.- ACTIVIDADES DEL TNF α

El TNF α participa en la defensa del organismo como un agente inmunoestimulante e inmunomodulador. Inicialmente fue identificado por su capacidad de causar necrosis hemorrágica de tumores. Estudios posteriores revelaron que era capaz de inducir una gran variedad de actividades biológicas en diversas células del organismo, lo cual revela la gran importancia de esta molécula. (1)

Prácticamente todas las células del organismo, con excepción de los glóbulos rojos, poseen receptor para TNF α . La naturaleza de las señales que se desencadenan después de la interacción TNF α / receptor celular solo son conocidas parcialmente. Sin embargo, se sabe que su acción origina la activación de una gran variedad de genes celulares, siendo de naturaleza catabólica la gran mayoría de las acciones activadas.

Mientras la producción de TNF α durante los procesos inflamatorios es de gran valor para la protección del organismo, una producción elevada y repentina o por largos periodos de tiempo, puede tener efectos adversos. Se ha demostrado que una sobreproducción de TNF α juega un papel central en el desarrollo del síndrome del shock séptico (8), causado por organismos Gram negativos, así como en el síndrome del desgaste (9), que aparece en la etapa terminal de las enfermedades crónicas o malignas.

Probablemente una de las razones por las que el TNF α presenta tan numerosas y variadas actividades, es porque se presenta en forma libre y asociada a membrana, ambas con actividad biológica (10). La participación de una de ellas o ambas puede determinar el tipo de actividad desencadenada. Además la participación de dos receptores celulares diferentes también puede influir al respecto. El efecto biológico neto del TNF α también depende de su concentración, del sitio de producción y de la presencia de otros mediadores inflamatorios. En la Tabla 2 se enlistan las principales actividades del TNF α .

TABLA 2.- Principales actividades del TNF α . (1-9).

A) Mediador inmunopatológico: Reacción injerto vs. huésped Esclerosis múltiple Síndrome del desgaste Fibrosis quística Shock séptico Desórdenes autoinmunes
B) Inducción de citocinas: IL-1 α y β , IL-6, IL-8, TNF α
C) Inducción de moléculas de superficie: ELAM-1, ICAM-1, MHC I y II
D) Inducción de receptores: IL-2R, IFN γ R
E) Inducción de mediadores inflamatorios: PAF, PGE2
F) Otras actividades: Activación/Diferenciación de LT, LB, PMN, M ϕ Potenciador de células NK y LAK Diferenciación de timocitos Inducción de proteínas de fase aguda Inhibición de la hematopoyesis Mediador de apoptosis Acción citostática/citotóxica de células tumorales Lisis de células infectadas por virus Actividad pirogénica

2.8.- RELACIÓN ENTRE EL TNF α Y LA CAQUEXIA.

Durante los periodos de restricción calórica se efectúan cambios de adaptación en el metabolismo normal. Por ejemplo, se llevan a cabo alteraciones graves en el metabolismo de los lípidos, aumentando su degradación y disminuyendo su síntesis. En el músculo esquelético también se observan cambios catabólicos. Además el contenido total de proteínas en los tejidos, disminuye notablemente. Estas alteraciones contribuyen al desequilibrio nutricional característico de los pacientes con caquexia. En estas personas se encuentran elevados los niveles de triglicéridos séricos. Esta alteración es debido a la inhibición de la enzima lipoprotein lipasa.

Aunque diversas causas pueden inducir caquexia, uno de los principales candidatos como mediador quimico es el TNF α ó caquectina.

El TNF α regula la biosintesis de diversas enzimas metabólicas. Cuando se cultivan *in vitro* preadipocitos en presencia de TNF α , se inhibe su diferenciación (5). En cultivos de adipocitos 3T3-L1 y en animales, el TNF α inhibe la actividad de lipoproteín lipasa y de ciertas enzimas anabólicas como la acetil-CoA carboxilasa y la ácidograsosintetasa. Por el contrario, la hormona sensible a lipasa se activa induciendo así la lipólisis. En cultivos de miocitos diferenciados, al adicionar TNF α se acelera la glucogenólisis y aumenta la producción de lactato. Posteriormente aumenta la expresión de transportadores de hexosas y con esto la asimilación de glucosa. En hepaticitos, el TNF α incrementa la síntesis de proteínas de fase aguda y acelera la asimilación de aminoácidos. En animales de laboratorio, se ha demostrado que la administración crónica de TNF α puede mediar la pérdida de peso y alterar las prioridades metabólicas normales a través de sus efectos en el SNC y tejidos periféricos. Diversos grupos han demostrado que la administración crónica intraperitoneal de TNF α induce caquexia (9). La administración sistémica de TNF α disminuye la síntesis muscular de actina y miosina, además de alterar la motilidad y absorción intestinal. Oliff y cols. (16), realizaron un importante estudio que apoya la inducción de caquexia por el TNF α . En ratones desnudos realizaron implantes intramusculares de células preparadas genéticamente para producir cantidades constantes de TNF α . Después de 2-4 semanas de la implantación de las células, los ratones perdían peso y disminuían su ingestión de alimentos.

En otros estudios, se observó que cantidades pequeñas de TNF α inyectadas directamente en la región intracerebroventricular, suprimen el apetito (17). Finalmente, los anticuerpos anti-TNF α atenúan la anorexia y la pérdida de peso en animales inyectados crónicamente con TNF α .

El incremento en el gasto de energía corporal, lipólisis y degradación de proteínas, así como la anorexia, y la pérdida de peso inducida por TNF α son semejantes a las alteraciones metabólicas observadas en las infecciones crónicas. Se han observado niveles altos de TNF α en pacientes con

caquexia que cursan con cáncer, SIDA y diversas enfermedades parasitarias o bacterianas, aunque cabe señalar que los niveles de TNF α no siempre correlacionan con la pérdida de peso observada. Por ejemplo, se han encontrado niveles elevados de TNF α en el 50% de pacientes con cáncer seleccionados al azar (18). Sin embargo, otros trabajos no han detectado TNF α en el suero de pacientes con caquexia asociada a cáncer, es decir, mientras niveles elevados de TNF α pueden estar presentes en algunos pacientes con cáncer, el TNF α no parece ser necesario para el desarrollo de la caquexia asociada a cáncer. En estudios recientes, Tracey y cols. (17), demostraron que el efecto metabólico del TNF α depende de su sitio de producción. Ellos realizaron en ratones implantes intracerebrales e intramusculares de células productoras de TNF α . Aunque ambos implantes producían concentraciones séricas de TNF α semejantes, solamente los animales con implante intracerebral desarrollaban caquexia.

2.9.- EL ELEMENTO ZINC.

El zinc es un micronutriente esencial para el crecimiento de los seres vivos. Participa en el metabolismo de los ácidos nucleicos y síntesis de proteínas. Algunas proteínas tienen zinc en su estructura, formando metaloproteínas (19). Dentro de este grupo existen enzimas dependientes de zinc, formando metaloenzimas o complejos enzima-zinc. La función del zinc en las enzimas es mantener íntegra la estructura y/o participar directamente en la reacción enzimática. En los complejos enzima-zinc, el elemento participa como activador o inhibidor de la reacción enzimática. Algunos ejemplos de enzimas con zinc en su estructura son la fosfatasa alcalina, DNA polimerasa, anhidrasa carbónica, carboxipeptidasa, aldolasa, deshidrogenasa málica y superóxido dismutasa (20).

La concentración de zinc en el organismo puede variar, alterando con ello diversas funciones metabólicas. Varios estudios demuestran que el balance de zinc se modifica por condiciones que requieren mayor demanda de este elemento como el crecimiento, la lactancia y el embarazo. En las personas de edad avanzada la concentración de zinc disminuye probablemente porque disminuye su

ingesta o su absorción. Algunas condiciones que implican deficiencia de zinc en el organismo son la desnutrición, la mala absorción, hiporexresión, las infecciones, las quemaduras y el alcoholismo. Algunas enfermedades como el cáncer, talasemia mayor, síndrome de Down y acrodermatitis enteropática, también se caracterizan por una deficiencia de zinc en el organismo (19). Las principales manifestaciones clínicas que se observan en el organismo por deficiencia de zinc son (19) :

A) Características físicas: retardo en el crecimiento, hipogonadismo, pubertad retardada, estatura baja, bajo peso corporal, microcefalia y mandíbula pequeña.

B) Anormalidades fisicoquímicas: retardo en la cicatrización de heridas, bajos niveles de zinc en plasma, pelo y orina, hiperamonemia, metaloenzimas de zinc disminuidas, anemia ferropénica, disminución en la producción de ACTH, incremento en la sensibilidad a la insulina.

C) Patología: diarrea, desordenes de tipo inmune, gestación prolongada, infecciones frecuentes, mala absorción, intolerancia a la lactosa, hipofunción testicular, teratogénesis, impotencia, defectos renales, hepatoesplenomegalia.

D) Signos neuropsiquiátricos: Pérdida del apetito, letargo mental, adaptación anormal a la oscuridad, depresión, irritabilidad, desordenes emocionales, temblores.

E) Desordenes dermatológicos: Piel áspera, pelo disminuido y quebradizo, queratitis.

Se ha demostrado que el zinc participa directamente en el desarrollo y funcionamiento del sistema inmune (21), y que la deficiencia de este elemento traza puede causar alteraciones graves (TABLA 3). Por otro lado, se ha demostrado que la suplementación con zinc normaliza el funcionamiento inmune en diversos padecimientos. En estudios *in vitro* se ha comprobado que la adición de zinc a cultivos de linfocitos, causa activación policlonal y proliferación celular. El zinc también se considera como adyuvante en la actividad proliferativa inducida por mitógenos.

TABLA 3.- Alteraciones inmunológicas causadas por la deficiencia de zinc.

<ul style="list-style-type: none">· Atrofia del timo· Disminución de células T· Disminución de células de bazo· Baja respuesta proliferativa a mitógenos· Depresión de la respuesta a antígenos de células T· Quimiotáxis defectuosa· Disminución de la actividad de las células NK· Acumulación de células B inmaduras· Alteración en la actividad de la hormona timulina· Aumento en la producción de corticosteroides

La concentración de zinc ha sido encontrada elevada en el timo de ratones que han sido infectados con suspensiones de estafilococos muertos. Asimismo, estos animales tienen disminuida su concentración de zinc en la sangre y en varios órganos no linfoides como el hígado (22). Los animales desgastados tienen un timo hipoplásico, lo que se ha relacionado con la sobreproducción de TNF α y otras citocinas. No obstante, el TNF α inhibe la apoptosis de células de sangre periférica (23) y la involución del timo parece estar más relacionada con la sobreproducción de glucocorticoides que con la deficiencia de zinc (24). Sin embargo, los resultados obtenidos hasta ahora, sugieren que el desgaste está relacionado a una alteración en el metabolismo del zinc. Por esta razón en el presente trabajo se decidió estudiar si el tratamiento con zinc administrado a los ratones desgastados, modifica o no la producción de TNF α por los macrófagos peritoneales.

3. OBJETIVOS E HIPOTESIS

OBJETIVOS:

1) Conocer si la inducción del síndrome del desgaste en ratones recién nacidos, mediante la inyección intraperitoneal de bacterias muertas, modifica la producción de TNF α por sus macrófagos peritoneales.

2) Conocer si la mejoría clínica del animal desgastado, después de recibir un tratamiento con sales de zinc, se relaciona con una disminución en la producción de esta citocina.

HIPOTESIS

1) En el presente modelo murino del desgaste, el animal desgastado tiene elevada su producción *in vitro* de TNF α por los macrófagos peritoneales.

2) La administración de un tratamiento con sales de zinc a los animales desgastados disminuye la producción *in vitro* de TNF α por sus macrófagos peritoneales.

4. DISEÑO EXPERIMENTAL

Se trabajaron con ratones Balb/c que fueron divididos aleatoriamente en 4 grupos:

- A.- Animales sanos
- B.- Animales desgastados mediante inyecciones intraperitoneales de estafilococos
- C.- Animales sanos que recibieron un tratamiento con sales de zinc
- D.- Animales desgastados y tratados con sales de zinc

Los animales de los grupos B y D fueron desgastados mediante inyecciones intraperitoneales de una suspensión de estafilococos muertos. Los ratones de los grupos A y C permanecieron como controles y solo recibieron inyecciones intraperitoneales de solución salina isotónica estéril. Uno de los dos grupos de animales desgastados (D), y su correspondiente grupo control (C), recibieron un tratamiento con sales de zinc, las cuales, de acuerdo a resultados de trabajos anteriores, han demostrado ser útiles para prevenir el deterioro inmunológico de los animales que recibieron inyecciones intraperitoneales de estafilococos muertos.

Todos los ratones fueron sacrificados a los 28 días de edad. Los macrófagos peritoneales fueron cosechados, lavados y cultivados con el fin de medir su producción *in vitro* de TNF α mediante un ensayo biológico con la línea de células L-929, la cual es sensible a esta citocina.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1.- PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN DE *S. aureus*.

Staphylococcus aureus, de la cepa ATCC 6538 (proporcionado por el ceperío de la facultad de Química, UNAM), fue cultivado en medio BHI líquido y estéril, con agitación constante, a 37°C durante 18 horas. La suspensión de bacterias se lavó 3 veces con solución salina isotónica estéril y se inactivó con calor a 121°C durante 1 hora. Posteriormente las bacterias se cosecharon por centrifugación y se realizaron las pruebas de inactivación, esterilidad y pureza correspondientes. Finalmente, se ajustaron a una concentración de 5×10^9 bacterias/ ml en solución salina isotónica estéril. La suspensión se repartió en alícuotas de 10 ml y se mantuvieron a 4°C hasta el momento de su utilización.

5.2.- ANIMALES.

Se utilizaron ratones Balb/c, de ambos sexos, recién nacidos obtenidos del bioterio de la Facultad de Química, UNAM, en donde permanecieron durante el desarrollo del experimento, bajo condiciones convencionales de iluminación (ciclos de luz/oscuridad de 12 horas cada uno), y temperatura (20-25°C). Los animales se destetaron a los 21 días de nacidos y posteriormente se mantuvieron con alimento (Bluebonnet, Brand), y agua *ad libitum*.

5.3.-INDUCCIÓN DEL DESGASTE.

El desgaste se indujo en ratones recién nacidos, mediante la inyección intraperitoneal de 0.1 ml de la suspensión ajustada de estafilococos inactivados. La primera dosis se administró antes de que los animales tuvieran 2 horas de nacidos, y posteriormente cada tercer día durante cuatro semanas.

5.4.- ADMINISTRACIÓN DE ZINC.

Tanto a los animales de un grupo de ratones desgastados como a los de su correspondiente grupo de animales control sanos, se les administró por vía intramuscular, 5µg de acetato de zinc (Acetato de zinc, Mellinckrodt), en 50 µl de solución salina isotónica (100 µg / ml) (NaCl, Baker), a partir de los 5 días de nacidos, repitiendo la misma dosis cada 6 días durante 4 semanas.

5.5.- OBTENCIÓN DE LOS MACRÓFAGOS PERITONEALES.

Para incrementar el número de macrófagos residentes en la cavidad peritoneal de los animales, 48 horas antes de ser sacrificados, los ratones fueron inyectados intraperitonealmente con 2 ml de una solución estéril de tioglicolato al 3% (Difco) en agua desionizada.

5.6.- CULTIVO DE MACRÓFAGOS PERITONEALES.

Al día siguiente de terminar la inducción del desgaste, los ratones fueron anestesiados con éter y sacrificados por dislocación cervical. Posteriormente, bajo condiciones de esterilidad, se obtuvieron las células del peritoneo lavando activamente ésta cavidad con aproximadamente 5 ml de una solución salina amortiguadora (BSS). Las células se lavaron 3 veces con la misma solución y se mantuvieron durante 60 segundos en una solución hemolizante estéril (20% NH_4Cl 0.16 M y 80% de Trizma Base 0.17 M). Posteriormente se lavaron con BSS estéril para eliminar la hemoglobina liberada y finalmente se resuspendieron en 1 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (HY CLONE Laboratories, USA), recién suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (HY CLONE Laboratories, USA), 0.5% de aminoácidos no esenciales (Microlab, México), 0.5% de glutamina 200 mM (Microlab, México), 0.5% de piruvato de sodio 100 mM (Microlab, México), 1% de antibiótico (penicilina 10000 U/ml, estreptomycin 10 mg/ml, Gibco Laboratories, USA), y 0.5% de HEPES 25 mM (Microlab, México).

La viabilidad celular se determinó con el colorante azul tripano al 0.4% (Sigma Chemical, USA), en solución salina isotónica. Las células se ajustaron a una concentración final de 1×10^6 células viables/ml. Posteriormente, en placas de cultivo con pozos de 16 mm de diámetro (Costar, USA), se depositó 1 ml de la suspensión celular por pozo, y se incubaron a 37 °C con una atmósfera de CO₂ al 5% y 19.7 % de humedad, durante un mínimo de 2 horas. Al terminar la incubación, se retiró el sobrenadante y se lavó cada pozo, para eliminar las células no adherentes. Por último, se restituyó el volumen original de medio de cultivo y se incubó durante 24 horas en las condiciones anteriormente citadas.

5.7.- ESTIMULACIÓN *in vitro* DE LOS MACRÓFAGOS PERITONEALES.

Después de retirar las células no adherentes y restituir el medio de cultivo, se realizó la estimulación de los macrófagos, agregando a cada pozo 5×10^8 estafilococos inactivados. Después de 24 horas de incubación, el medio de cultivo de cada pozo se depositó en tubos estériles y se centrifugaron a 10 000 rpm durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante y se guardó en tubos estériles y mantenidos a -70°C hasta el momento de su utilización.

5.8.- CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE *S. aureus* PARA ESTIMULAR A LOS MACRÓFAGOS PERITONEALES *in vitro*

Se realizó el cultivo de macrófagos según el procedimiento descrito en los puntos 4.6 y 4.7 agregándose diferentes cantidades de estafilococos inactivados por pozo.

5.9.- CULTIVO DE LAS CELULAS L-929

La línea celular L-929 fue proporcionada amablemente por el Dr. J. Sullivan López, del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Las células se cultivaron en cajas de 50 ml (Costar, USA), con 5 ml de medio de cultivo RPMI 1640 recién suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado, 1% de antibiótico, 10 % de NaHCO_3 al 2% y 0.5% de HEPES 25 mM. El medio de cultivo fue cambiado por medio fresco cada tercer día. Posteriormente, se procedió a tripsinizar las células cuando se observaba confluencia celular.

5.10.- TRIPSINIZACIÓN DE LAS CÉLULAS L-929

En condiciones de esterilidad, se procedió a eliminar el medio de cultivo de la caja, y la monocapa celular se lavó 3 veces con PBS (pH= 7.4) estéril, en seguida se agregó tripsina 1 mM en EDTA 0.01 mM (Microlab, México), en cantidad suficiente para cubrir la superficie de la caja. Al observarse en el microscopio invertido que las células se habían desprendido casi en su totalidad, se agregaron 3 ml de medio de cultivo recién suplementado para inhibir la actividad enzimática de la tripsina. Se cosechó el sobrenadante y se procedió a determinar la viabilidad celular con el colorante azul tripano. Posteriormente, se ajustó la suspensión celular a una concentración final de 4×10^5 células/ml.

5.11.- CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE MITOMICINA C PARA INHIBIR EL CRECIMIENTO DE LAS CÉLULAS L-929.

Esta determinación se llevó a cabo utilizando el método de incorporación nuclear de timidina tritiada. En una placa de cultivo de 96 pozos (Costar, USA), se colocaron 40 mil células por pozo. La placa se incubó durante 24 horas a 37°C y 5% de CO_2 . Al terminar la incubación, se agregaron

diferentes concentraciones de mitomicina c y se incubó nuevamente en las mismas condiciones durante 24 horas más. Posteriormente, se añadió a cada pozo 1 μ Ci de timidina tritiada (New England Nuclear, USA), diluida en 20 μ l de medio de cultivo. La placa se incubó nuevamente 18 horas y posteriormente las células se procesaron en un cosechador (Modelo 24v, Brandel, USA), que depositó el contenido insoluble de cada pozo sobre papel fibra de vidrio con poro de 0.4 μ de diámetro (Whatman, USA). Las tiras de papel se dejaron secar a temperatura ambiente y posteriormente las muestras correspondientes a cada pozo fueron separadas y colocadas dentro de viales de 20 ml de capacidad (Wheaton, USA), que contenían 5 ml de líquido de centelleo, compuesto por PPO (2,5 - difenil coxazol), y POPOP (p-bis(2-(5-feniloxazol)) benceno). Estas dos sustancias se disolvieron en tolueno y se mantuvieron a 4°C. La radiactividad de cada muestra fue medida en un contador de centelleo (TRI-CARB 300, Packard, USA). Las lecturas fueron registradas como cpm.

5.12.- CUANTIFICACIÓN DE TNF α .

Se realizó un ensayo de citotoxicidad utilizando la línea L-929. En una placa de cultivo de 96 pozos se colocaron 4×10^4 células/ pozo, en un volumen de 100 μ l de medio de cultivo. Después de 24 horas de incubación a 37°C y 5% de CO₂ , a cada pozo se le adicionó 1 μ g de mitomicina C en 50 μ l de medio de cultivo. Después de cultivar las células durante 24 horas se retiró el sobrenadante y se sustituyó por 100 μ l de la muestra problema (sobrenadantes de los cultivos de macrófagos). Los pozos que fueron utilizados como blanco se les cambió el sobrenadante por 100 μ l de medio de cultivo fresco. Posteriormente, la placa se incubó durante 24 horas. Al día siguiente se retiró el sobrenadante y se añadieron 100 μ l de colorante cristal violeta al 0.2% (E. Merck, Alemania), en una solución con 22.3% de etanol (Merck, México), y 8% de formaldehído, disueltos en 100 ml de NaCl al 0.85%. Las placas se dejaron en reposo por 5 minutos y posteriormente se retiró el colorante. Se hicieron varios lavados con PBS hasta eliminar el colorante que no fue incluido por las células. Por último, se lisaron las células con SDS al 10% en HCl 0.01 N, para liberar el colorante que fue incorporado en ellas. La

absorbancia se leyó en un lector de ELISA a una longitud de onda de 595 nm. El valor promedio obtenido por los pozos blanco se tomó como el 100% de células sin lisar. En base a este valor se determinó el % de células sin lisar en cada determinación problema. La diferencia aritmética de estos valores nos da como resultado el % de lisis celular producido por el TNF α presente en cada uno de los sobrenadantes problema.

5.13.- INACTIVACION DEL TNF α CON ANTICUERPOS ANTI-TNF α .

Para la inactivación de TNF α se utilizó un antisuero anti-TNF α desarrollado en conejo (Sigma Immuno Chemicals). Se usaron los sobrenadantes del cultivo de macrófagos, de ratones normales, estimulados *in vitro* con diferentes cantidades de *S. aureus*. 150 μ l de cada sobrenadante se incubaron durante 2 horas con 2 μ g de antisuero/ pozo. Posteriormente, 100 μ l de cada sobrenadante se agregaron a las células L-929 para efectuar el ensayo de citotoxicidad descrito en el punto anterior.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se determinó la heterogeneidad de las varianzas mediante la prueba X^2 de Barlett (59). Para establecer el grado de significancia de las diferencias entre las medias de los grupos estudiados se realizó el análisis de varianza mediante la prueba F de Tukey para muestras independientes en escalas de intervalo y carentes de ortogonalidad (59).

7. RESULTADOS

7.1.- INDUCCIÓN DEL DESGASTE

Al terminar el tratamiento, los animales desgastados presentaron las características principales del síndrome: retardo en el crecimiento, diarrea, anorexia, infecciones oculares, debilidad y pelo erizado. En la cavidad abdominal de algunos animales se encontraron microabscesos visibles macroscópicamente en hígado.

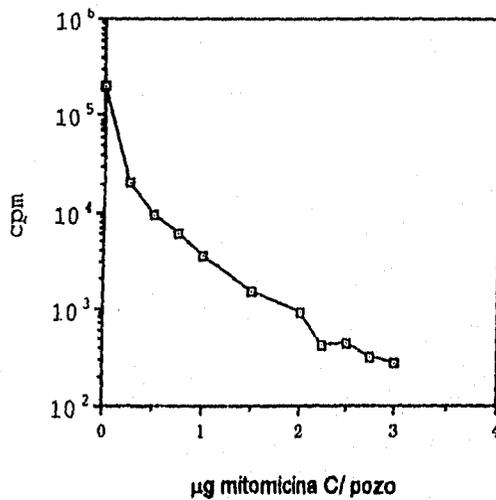
Los animales desgastados que recibieron suplementación con sales de zinc, presentaron las mismas características citadas anteriormente, aunque se observó en este grupo de animales una mortandad más elevada.

7.2.- CONCENTRACIÓN ÓPTIMA DE MITOMICINA C PARA INHIBIR EL CRECIMIENTO DE LAS CÉLULAS L-929.

Para determinar la concentración óptima de mitomicina C que inhibiera más del 95% de la multiplicación de las células L-929, se realizó una curva de calibración. A partir de 0.75 μg /pozo de mitomicina C se obtuvo más del 95% de inhibición del crecimiento celular. Se eligió como concentración de trabajo 1 μg /pozo (TABLA 4, GRAFICA 1).

mitomicina c ($\mu\text{g/ pozo}$)	cuentas por minuto (cpm)	ICC (%)
0.00	200,522	100.00
0.25	20,847	89.60
0.50	9,340	95.30
0.75	5,968	97.00
1.00	3,543	98.20
1.50	1,484	99.20
2.00	895	99.50
2.25	417	99.70
2.50	430	99.80
2.75	310	99.80
3.00	275	99.80

TABLA 4.- Determinación de la concentración de mitomicina C para Inhibir el crecimiento *in vitro* de las células L-929. ICC= Inhibición del crecimiento celular.



GRAFICA 1.- Curva de calibración de mitomicina C para Inhibir el crecimiento *in vitro* de las células L-929.

7.3.- CONCENTRACIÓN OPTIMA DE *S. aureus* INACTIVADOS PARA ESTIMULAR A LOS MACRÓFAGOS PERITONEALES *in vitro*.

Se determinó la cantidad de estafilococos inactivados que fuera capaz de inducir la mayor producción y liberación de TNF α por los macrófagos peritoneales de animales sanos. Se observó que conforme aumentaba la cantidad de bacterias añadidas al medio de cultivo, el porcentaje de lisis de las células L-929 causado por la citocina también aumentaba, hasta alcanzar un máximo de lisis celular al agregar 5×10^6 bacterias /pozo. Después de este punto, los porcentajes de lisis se mantienen elevados con una discreta tendencia a disminuir, aunque la cantidad de bacterias inactivadas añadidas al pozo sea mayor (TABLA 5 , GRAFICA 2).

BACTERIAS (10^6)	ABSORBANCIA	% DE LISIS
1	0.660	28.30
2	0.746	37.80
3	0.716	40.30
4	0.690	42.50
5	0.664	44.80
6	0.661	43.20
7	0.691	42.40
9	0.725	39.50

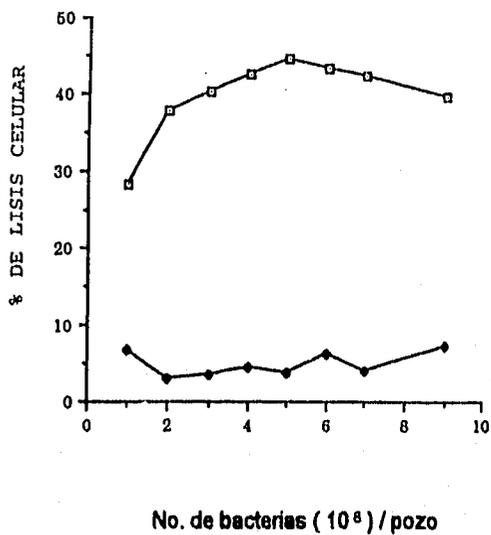
TABLA 5.- Curva de calibración de la cantidad de *S. aureus* inactivados añadida a los cultivos de macrófagos peritoneales de ratones sanos.

7.4.- INACTIVACIÓN DEL TNF α POR ANTISUERO ANTI-TNF α .

Para determinar si la actividad lítica causada por los sobrenadantes del cultivo de macrófagos peritoneales de ratones sanos estimulados *in vitro* con estafilococos inactivados, era causada por TNF α y no por linfoxina, se procedió a bloquear esta actividad lítica, sometiéndolo a los sobrenadantes a una incubación con antisuero anti-TNF α (2 μ g/pozo), antes de realizar la prueba de citotoxicidad con las células L-929. Los resultados demuestran una disminución en el porcentaje de lisis celular causado por cada uno de los sobrenadantes utilizados originalmente, lo cual indica que, efectivamente la lisis de las células L-929 era debida al TNF α . (TABLA 6, GRAFICA 2).

BACTERIAS (10 ⁶)	ABSORBANCIA	% DE LISIS
1	1.119	6.7
2	1.163	3.0
3	1.158	3.5
4	1.147	4.4
5	1.155	3.7
6	1.125	6.2
7	1.151	4.0
8	1.112	7.3

TABLA 6.- Inhibición de la actividad del TNF α por antisuero anti-TNF α .



GRAFICA 3.- Producción *in vitro* de TNF α por macrófagos peritoneales estimulados con estafilococos inactivados y bloqueo de la actividad TNF α con antisuero anti-TNF α . (—●—) Sobrenadantes de cultivo de macrófagos peritoneales estimulados *in vitro* con estafilococos inactivados sin bloquear. (—□—) Los mismos sobrenadantes de cultivo sometidos a incubación previa con suero anti-TNF α .

7.5.- PRODUCCIÓN DE TNF α POR MACROFAGOS PERITONEALES.

Se determinó la producción de TNF α por los macrófagos peritoneales de los animales sometidos a los diferentes tratamientos así como a los animales control. Las determinaciones se hicieron en condiciones basales y bajo estimulación *in vitro* con estafilococos inactivos. Los resultados se observan en las TABLAS 6 y 7. Los resultados están expresados como el valor promedio del % de lisis de las células L-929. Cada determinación se hizo por triplicado. Los porcentajes fueron calculados según las lecturas de las absorbancias del colorante cristal violeta retenido por las células L-929 que se cultivaron en medio de cultivo fresco (Blanco).

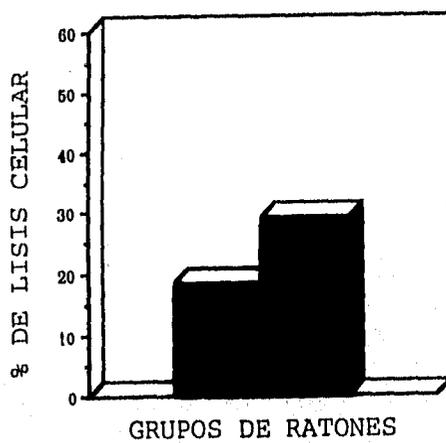
RATONES	n	ABSORBANCIA	% DE LISIS
SANOS	12	0.977 \pm 0.038	18.6 \pm 3.2
SANOS/ Zn	12	0.912 \pm 0.056	24.0 \pm 4.6
DESGASTADOS	12	0.850 \pm 0.025	29.1 \pm 2.0
DESGASTADOS/ Zn	12	0.765 \pm 0.022	36.2 \pm 1.9

TABLA 6.- Cantidad de TNF α . (% de lisis de las células L.929) en el sobrenadante de cultivos de macrófagos peritoneales en condiciones basales (no estimulados).

RATONES	n	ABSORBANCIA	% DE LISIS
SANOS	12	0.740 \pm 0.044	38.3 \pm 3.6
SANOS/ Zn	12	0.821 \pm 0.045	31.5 \pm 3.8
DESGASTADOS	12	0.720 \pm 0.053	39.5 \pm 4.0
DESGASTADOS/ Zn	12	0.550 \pm 0.069	54.1 \pm 5.8

TABLA 7.- Cantidad de TNF α . (% de lisis de las células L.929) en el sobrenadante de cultivos de macrófagos peritoneales estimulados con estafilococos inactivados.

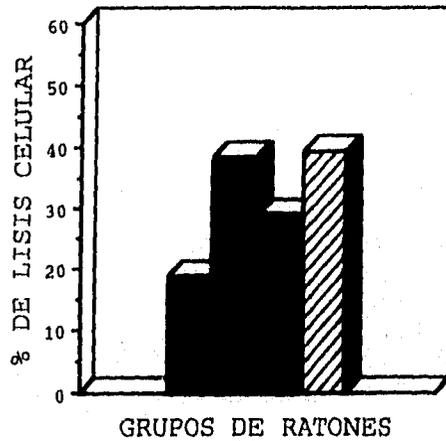
En condiciones basales de cultivo, el sobrenadante del medio donde se cultivaron los macrófagos peritoneales de los ratones desgastados presentó un porcentaje de lisis de las células L-929, mayor (29.1%) al porcentaje observado en el sobrenadante del cultivo de los macrófagos de animales sanos (18.6%). ($p < 0.05$). GRAFICA 3.



GRAFICA 3.- Producción de TNF α (% de lisis celular) por los macrófagos peritoneales en condiciones basales de cultivo. (■) macrófagos de ratones sanos, (■) macrófagos de ratones desgastados.

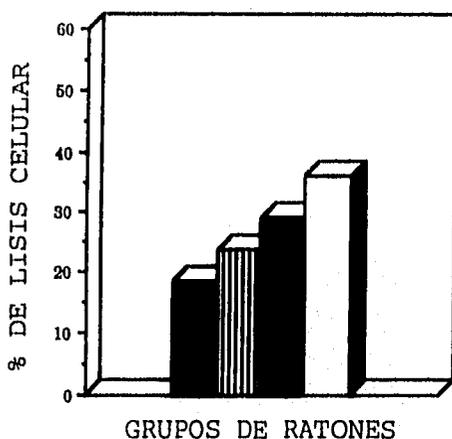
Al agregar estafilococos inactivados al medio donde se cultivaron los macrófagos peritoneales, aumentó el porcentaje de lisis celular tanto por el sobrenadante del cultivo de macrófagos de los animales sanos (38.3%) como por el obtenido del cultivo de macrófagos de los animales desgastados (39.5%). Entre ambos grupos no se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0.05$).

GRAFICA 4.



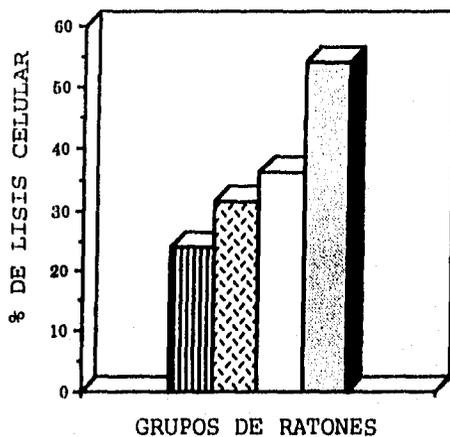
GRAFICA 4.- Producción de $TNF\alpha$ (% de lisis celular) por los macrófagos peritoneales estimulados *in vitro* con estafilococos inactivados. (■) macrófagos de ratones sanos, (■) macrófagos de ratones desgastados, (■) macrófagos de ratones sanos estimulados *in vitro* con bacterias muertas, (▨) macrófagos de ratones desgastados estimulados *in vitro* con bacterias muertas

En el caso de los sobrenadantes del cultivo de macrófagos peritoneales de los animales desgastados que recibieron un tratamiento con sales de zinc durante la inducción del desgaste, se encontró un mayor porcentaje de lisis celular (36.2%), que el sobrenadante del cultivo de macrófagos peritoneales de los animales desgastados sin tratamiento (29.1%), ($p < 0.05$). Se observó el mismo comportamiento en el caso de los animales sanos tratados con zinc (24%) con respecto a los animales sanos sin tratamiento (18.6%), ($p < 0.05$). GRAFICA 5.



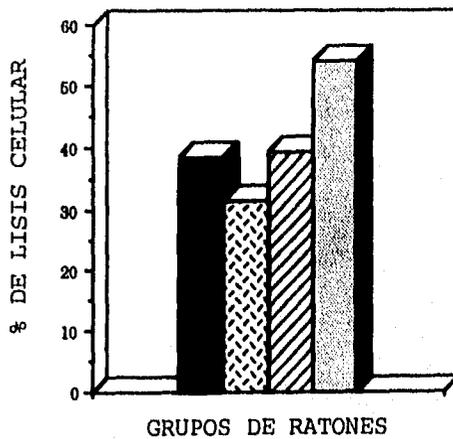
GRAFICA 5.- Producción en condiciones basales de $TNF\alpha$ (% de lisis celular) por macrófagos peritoneales de ratones sometidos a tratamiento con inyecciones intramusculares con sales de zinc. (■) macrófagos de ratones sanos, (▨) macrófagos de ratones desgastados, (□) macrófagos de ratones sanos tratados con sales de zinc, (▤) macrófagos de ratones desgastados tratados con sales de zinc.

Cuando los macrófagos peritoneales de los animales desgastados tratados con zinc fueron estimulados *in vitro* con estafilococos inactivados, el sobrenadante de cultivo presentó un aumento considerable en su capacidad de lisis (54.1%), con respecto al sobrenadante de cultivo en condiciones basales (29.1%), ($p < 0.05$). El mismo comportamiento se observó al estimular *in vitro* a los macrófagos peritoneales de los animales sanos tratados con zinc (31.5%), ($p < 0.05$), GRAFICA 6.



GRAFICA 6.- Producción de TNF α (% de lisis celular) por los macrófagos peritoneales estimulados *in vitro* , con estafilococos inactivados provenientes de ratones tratados con inyecciones intramusculares de sales de zinc. (▨) macrófagos de ratones sanos tratados con sales de zinc, (□) macrófagos de ratones desgastados tratados con sales de zinc, (▤) macrófagos de ratones sanos tratados con sales de zinc estimulados *in vitro* con bacterias muertas, (▩) macrófagos de ratones desgastados tratados con sales de zinc estimulados *in vitro* con bacterias muertas

El sobrenadante del cultivo de los macrófagos de los animales sanos estimulados *in vitro* con estafilococos inactivados, presentó una diferencia estadísticamente significativa en el porcentaje de lisis celular (38.8%) con respecto al que presentó el sobrenadante del cultivo de macrófagos de los animales sanos tratados con zinc (31.5%), ($p < 0.05$). De la misma forma, el sobrenadante de los macrófagos de los animales desgastados tratados con zinc presentó una mayor cantidad de lisis celular (54.1%), que el sobrenadante del cultivo de macrófagos de animales desgastados sin tratamiento (39.5%). ($p < 0.05$) GRAFICA 7.



GRAFICA 7.- Comparación de la producción de TNF α (% de lisis celular) por los macrófagos peritoneales estimulados *in vitro* con bacterias muertas. (■) macrófagos de ratones sanos estimulados *in vitro* con bacterias muertas, (▨) macrófagos de ratones desgastados estimulados *in vitro* con bacterias muertas (▩) macrófagos de ratones sanos tratados con sales de zinc estimulados *in vitro* con bacterias muertas, (□) macrófagos de ratones desgastados tratados con sales de zinc estimulados *in vitro* con bacterias muertas

8. DISCUSIÓN

Durante el desarrollo del presente trabajo se indujo la aparición del síndrome del desgaste en ratones recién nacidos mediante la inoculación intraperitoneal de estafilococos muertos (33). Como se esperaba, los animales sometidos al tratamiento desgestante presentaron un menor tamaño y menor peso corporal, anorexia e infecciones recurrentes (diarrea, infecciones de la conjuntiva ocular, microabscesos en peritoneo). La falta de peso y e infecciones recurrentes se pueden explicar, en primera instancia, como una causa de la anorexia que sufren los animales ya que al no consumir alimento en la cantidad adecuada, los animales no cuentan con la materia prima necesaria para cubrir los requerimientos basales del organismo, conduciendolo a una desnutrición severa que también influye directamente en el mal funcionamiento del sistema inmune que se observa en el animal desgastado (56, 57). Por otr lado, estos síntomas también se pueden asociar con la producción y liberación de TNF α , que como se observó en este trabajo, los macrófagos peritoneales de los animales desgastados producen una mayor cantidad de esta citocina (% de lisis de las células L-929), que los macrófagos de los animales sanos. El TNF α está directamente asociado al catabolismo de los lípidos y proteínas. Esta citocina es capaz de aumentar el catabolismo de proteínas en el tejido muscular y en hígado, así como de suprimir la expresión de la lipoprotein lipasa, enzima necesaria para la asimilación de triglicéridos séricos por los adipocitos, el mismo tiempo que aumenta el catabolismo de los lípidos intracelulares (58). También se ha comprobado que el TNF α es un potente inductor de anorexia a nivel de sistema nervioso central (17). En cuanto a la relación del TNF α con la aparición de infecciones oportunistas se sabe que esta citocina deprime el funcionamiento de los linfocitos B (60), e induce la liberación de glucocorticoides por las glándulas suprarrenales (6).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo concuerdan con el planteamiento hecho en la primera hipótesis, ya que permiten aceptar que los macrófagos peritoneales de los animales desgastados producen mayor cantidad de TNF α (% de lisis de las células L-929), que los macrófagos

de animales sanos. Las diferencias entre los dos grupos fueron estadísticamente significativas. No obstante, estos resultados no representan una prueba de que el TNF α es el único responsable de las alteraciones inmunológicas y/o del dolor físico provocado por las inyecciones de estafilococos. De todos modos, la evidencia experimental acumulada hasta ahora por otros autores (9,16,17), permite sugerir una asociación entre el desarrollo del síndrome y el aumento en la síntesis de ésta y otras citocinas que tienen una actividad biológica similar.

La inyección intraperitoneal de estafilococos muertos representa una agresión estresante que durante el desarrollo del experimento, se prolongó durante cuatro semanas. La literatura publicada (22-25) reúne una cantidad importante de observaciones respecto a los cambios inmunológicos que pueden presentarse en los animales de laboratorio que desarrollan una respuesta aguda o crónica de estrés. Se puede decir que todos los animales estresados por una agresión repetida, como las infecciones o algunos traumas físico-químicos, se observa una mayor actividad del eje hipotálamico-hipofisario-suprarrenal y un aumento en la producción y concentración sanguínea de glucocorticoides.

En el caso del presente trabajo, la inyección de bacterias muertas al peritoneo de los ratones representa una agresión que simula una infección. Las bacterias inoculadas intraperitonealmente no se multiplican ni invaden los tejidos del animal porque han sido inactivadas previamente a 120°C. Sin embargo, el material inyectado tiene que ser fagocitado y este proceso implica la activación de los macrófagos y otras células del peritoneo. Ante este estímulo crónico, los macrófagos liberan al exterior, durante cuatro semanas, una serie de moléculas con capacidad para causar reacciones inflamatorias. Entre los principales mediadores liberados por los macrófagos se pueden citar las prostaglandinas, la IL-1, la IL-6 y el TNF α . Los resultados de este trabajo apoyan este último punto de vista. Algunos de estos mediadores tienen una actividad biológica pleiotrópica que les permite actuar tanto a nivel local, en el peritoneo, como sobre otros tejidos u órganos. Además, los ratones desgastados mediante una serie de inyecciones intraperitoneales de estafilococos muertos, deben tener una elevación de la concentración sanguínea de glucocorticoides (48), como una respuesta anti inflamatoria de estrés. Las dos respuestas, inflamatoria y anti inflamatoria (de los macrófagos y de las

suprarrenales), son eventos fisiológicos que se complementan y modulan. El $TNF\alpha$ y las interleucinas liberadas por los macrófagos estimulan el eje hipotálamico-hipofisario, aumentan la producción de ACTH (46) y esta hormona estimula a las glándulas suprarrenales, que aumentan la liberación de glucocorticoides (47). Como parte de un mecanismo homeostático, tanto la adrenalina (8) como los glucocorticoides modulan la producción de $TNF\alpha$ (6), y actúan como anti inflamatorios que limitan la acción al peritoneo.

La edad de los animales, recién nacidos al iniciar el experimento, y la frecuencia de las inyecciones de bacterias muertas (que son inoculadas durante cuatro semanas), son dos factores que, conforme pasa el tiempo desequilibran los mecanismos estresantes homeostáticos de los ratones al provocarles una depleción importante de zinc (22). La concentración de zinc en la sangre de los ratones estresados se encuentra disminuido (hipozincemia) tanto por la reducción en su ingesta, a causa de la anorexia, como por la actividad depletores de zinc que tienen los glucocorticoides. Otro factor que favorece el desequilibrio de los mecanismos homeostáticos es la prolongada hiperactividad inmunológica de los linfocitos y macrófagos, estimulados durante cuatro semanas de una forma innecesaria, ya que las inoculaciones no representan ningún riesgo de infección intraperitoneal. Sin embargo, los animales terminan el experimento con sus linfocitos (36) y macrófagos hiperestimulados, con un deterioro grave en el sistema inmunitario (35) y con una mayor susceptibilidad para adquirir infecciones secundarias por microorganismos oportunistas (37). Una parte de las alteraciones en el sistema inmunitario del animal desgastado dependen del aumento en la producción de glucocorticoides, los cuales son activos a nivel de timo, acelerando la muerte celular programada de los timocitos y causando hipoplasia tímica (48). Otras alteraciones inmunológicas son el resultado de la actividad biológica inhibitoria que tienen algunas citocinas, entre ellas el $TNF\alpha$, sobre los linfocitos y otras células inmunocompetentes. En el caso del presente experimento, el aumento en la producción de glucocorticoides y citocinas, representan un esfuerzo inútil, que lleva a cabo el organismo del ratón para combatir una infección que no existe. Sin embargo, las dos reacciones (inflamatoria y anti

inflamatoria), se complementan y la homeostásis que resulta permite asegurar la vida del animal desgastado durante el tiempo que dura la aplicación de las inyecciones intraperitoneales.

Probablemente, uno de los hallazgos más interesantes del presente trabajo fué que la capacidad de producir TNF α por los macrófagos peritoneales (% de lisis de las células L-929), puede ser mejorada significativamente. Los resultados favorables obtenidos después de la administración de sales de zinc por vía intramuscular solamente reflejan la respuesta del animal que se le administra un suplemento del elemento traza que tiene disminuido (22). Hallazgos similares han sido obtenidos previamente al administrar sales de zinc a distintos pacientes con una disminución en la ingesta o absorción de este elemento traza (49, 50, 51). En este trabajo observamos que el zinc puede inducir al macrófago a producir un exceso de mediadores que son necesarios cuando son retados por microorganismos, aunque en el caso del presente trabajo, las bacterias estaban muertas.

Originalmente se había propuesto, en una segunda hipótesis, que los macrófagos peritoneales de los animales desgastados sometidos a un tratamiento con sales de zinc, presentarían una menor producción de TNF α (% de lisis de las células L-929), que los macrófagos de los animales desgastados sin tratamiento. Trabajos previos dentro de esta misma línea de investigación han demostrado que la administración de sales de zinc a los animales desgastados mejora su competencia inmunológica al igual que su condición física (22, 34, 35, 55). Por otro lado, teniendo como antecedente que el TNF α está relacionado con la pérdida de peso (caquexia), anorexia e incompetencia del sistema inmune, se pensó en la posibilidad de que el zinc pudiera estar relacionado con una disminución en la producción de esta citocina por los macrófagos peritoneales y de esta manera originar una recuperación de la condición inmunológica y física del animal desgastado. Sin embargo, los resultados encontrados demostraron lo contrario.

Este resultado puede ser originado por varias razones:

1.- Conviene tener presente que durante el desarrollo del presente trabajo se utilizó una vía de inoculación diferente (intramuscular), a la utilizada en los trabajos previamente realizados

(intraperitoneal). Se sabe que la vía de inoculación puede ser determinante en el resultado final de un experimento.

2.- De igual forma, la frecuencia de inoculación y la concentración de acetato de zinc utilizada en este trabajo fueron diferentes a las utilizadas en los trabajos anteriores. Originalmente se utilizaba una concentración de acetato de zinc de 2.5 mg/dl (25 mg/l), cada tercer día, dando una dosis semanal de 7.5 - 10 µg de acetato de zinc. En el presente trabajo se utilizó una concentración de 100 µg/ml de acetato de zinc una vez a la semana, siendo equivalente a una dosis semanal de 5 µg de acetato de zinc.

3.- El animal desgastado tiene (como una respuesta de estrés) un flujo de zinc de la sangre hacia los tejidos, originando hipozincemia y un aumento de la concentración tisular de zinc. Al administrar zinc (sin modificar la inducción de estrés), probablemente aumenta este flujo de zinc a los tejidos, y se eleva la concentración intracitoplásmica de este elemento en los macrófagos peritoneales de los animales desgastados. De esta forma se pueden ver favorecidos algunos eventos celulares dependientes de zinc. Se sabe que el TNF α maduro libre se deriva de una molécula precursora, el TNF α unido a membrana (52). Trabajos recientes han comprobado que este procesamiento se lleva a cabo por una endopeptidasa (TNF α convertasa) (53), la cual es dependiente de zinc y cuya actividad es inhibida selectivamente *in vivo* e *in vitro* por el inhibidor de metaloproteinasas GI 129471 (54). Estos datos nos permiten sugerir que en el presente modelo experimental, los animales desgastados que recibieron suplementación con sales de zinc, probablemente presentaban una actividad elevada de la enzima TNF α convertasa dependiente de zinc, originando una mayor cantidad de TNF α liberada al medio de cultivo por los macrófagos.

4.- Es probable que el efecto benéfico del tratamiento con zinc sea variable. Algunas funciones mejoran para beneficio del animal, como la elevación de la producción de anticuerpos, pero otras funciones contribuyen a su deterioro, como lo es la producción de TNF α . Tal vez sea por esta razón que se observó una mayor mortalidad en el grupo de animales desgastados que recibieron tratamiento con

zinc, ya que al haber una mayor producción de esta citocina se mantienen todos los efectos dependientes de ella. En este caso una mayor producción de TNF α podría favorecer o acelerar el desarrollo del síndrome, aunque al mismo tiempo se mejoró la competencia inmunológica del animal desgastado, la cual no es suficiente para mantener vivo al animal durante el desarrollo del experimento. También debemos mencionar que el efecto final del TNF α depende de muchos factores. Como hemos mencionado, esta citocina presenta un amplio espectro de actividades, que dependen del sitio de producción, de la célula productora, de la concentración, de la célula o tejido afectado, del tiempo de exposición, de la forma de TNF α (libre o asociado a membrana), y del tipo de receptor involucrado.

5.- Sin embargo, hay una parte de animales de este grupo que al terminar el tratamiento y que presentan también una mayor producción de TNF α . Es importante destacar que los efectos benéficos del tratamiento con zinc dependen de la enfermedad (crónica o aguda), y de la edad del animal. Además, el éxito de una buena inducción del síndrome del desgaste depende de que la primera inoculación de bacterias muertas se lleve a cabo dentro de las dos primeras horas de nacido el animal. En este caso, no todos los animales iniciaron el tratamiento al mismo tiempo. Probablemente en este subgrupo de animales se inició el tratamiento después de las dos horas recomendadas. De esta forma, al no inducirse el síndrome adecuadamente desde el inicio, aunque los animales presentan una producción elevada de TNF α , el efecto neto del tratamiento con zinc y la producción de TNF α es benéfico para el animal, aumentando su sobrevivencia y mejorando su competencia inmunológica.

Por otra parte, se debe aceptar que, a pesar de su incompetencia, el sistema inmune de los animales desgastados se encuentra hiperestimulado (36), tanto por las bacterias como por algunos mediadores liberados por los macrófagos (41). Su deficiencia para responder puede atribuirse, tentativamente, a la falta de zinc (22,36,40,55). Los resultados de otros estudios sobre esta misma línea de investigación han demostrado que solamente con un suplemento de zinc se eleva drásticamente la producción de anticuerpos por encima de los niveles observados en los animales sanos (55). Una prueba más del bloqueo que ocurre en el caso de la hiperestimulación lo representan

los resultados del presente trabajo. Solamente al inyectar zinc a los animales desgastados sus macrófagos peritoneales aumentaron la producción de TNF α hasta causar porcentajes de lisis de las células L-929 significativamente superiores a los observados en los ratones sanos de los grupos control, con o sin tratamiento de zinc. Aunque en el caso del presente trabajo la suplementación con zinc puede ser poco recomendable, ya que en algunos casos favorecería las manifestaciones del síndrome. Tal vez, la limitación de la producción de TNF α por los macrófagos peritoneales de los animales desgastados sea un mecanismo de defensa que establece el animal para aumentar su tiempo de supervivida. En la Figura 1 se proponen los posibles mecanismos involucrados durante la inducción del desgaste en los ratones recién nacidos.

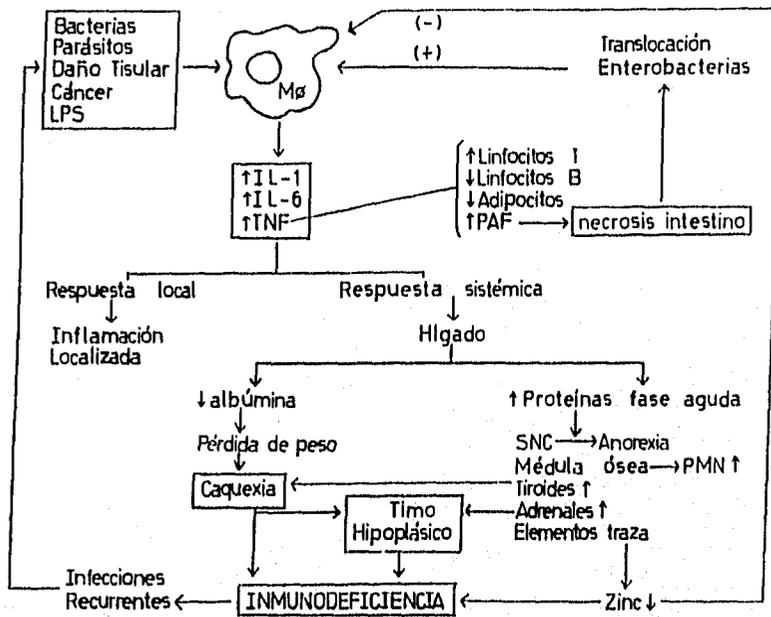


Figura 1.- En este esquema se muestran la serie de eventos que se desencadenan al estimular constantemente a los macrófagos peritoneales de los ratones recién nacidos. Los macrófagos al ser estimulados secretan una serie de citocinas como el TNF α , la IL-1 y la IL-6, las cuales inducen cambios inmunológicos y metabólicos que favorecen la aparición del síndrome del desgaste.

Estos resultados son importantes porque orientan respecto a la clase de tratamiento que se debe aplicar para mejorar la competencia inmunológica de un individuo estresado de una forma crónica. El tratamiento ideal parece ser la reposición de, al menos el elemento cuya concentración en la sangre disminuye a causa del estrés prolongado, pero que al mismo tiempo no afecte negativamente la condición física del animal.

Los resultados de los experimentos realizados *in vitro*, en cultivo de macrófagos peritoneales estimulados con una suspensión de estafilococos muertos, también revelan que estas células (ocupadas en fagocitar los estafilococos durante todo el experimento), tienen agotada su capacidad para elevar más aún la producción de TNF α . En los sobrenadantes de los cultivos de macrófagos peritoneales estimulados *in vitro* con estafilococos muertos se puede observar que no había diferencias entre el grupo de animales desgastados y sus correspondientes controles sanos. Una situación completamente diferente se obtuvo al cultivar y estimular *in vitro* los macrófagos peritoneales de ratones desgastados que habían recibido un tratamiento con sales de zinc.

En este sentido se puede sugerir que, si a un organismo se le suministran los factores (hormonas, nutrientes) que tienen disminuidos a causa del estrés prolongado, entonces se puede evitar la aparición de algunas complicaciones graves que habitualmente representan un riesgo de muerte. Al aumentar la tasa de supervivencia y mejorar las condiciones generales, puede quedar más tiempo para intentar un tratamiento más efectivo o más enérgico en contra de la enfermedad primaria responsable del desgaste o la eliminación de los agentes estresantes que mantienen su desarrollo.

Por las razones anteriores el modelo experimental utilizado en este trabajo proporciona un microambiente útil para estudiar algunas de las consecuencias que pueden tener las agresiones prolongadas sobre el desarrollo físico e inmunológico de individuos. Asimismo, el desgaste experimental ofrece la oportunidad de estudiar el efecto que tienen algunos tratamientos que pueden ser aplicados para normalizar la inmunidad cuando esta se encuentra comprometida en una forma secundaria.

9. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permiten llegar a las siguientes conclusiones:

La inyección intraperitoneal de estafilococos muertos a ratones Balb/c recién nacidos durante un periodo de cuatro semanas induce un estado transitorio de desgaste.

Los macrófagos peritoneales de los animales desgastados producen mayores niveles de TNF α . Esta citocina puede estar directamente relacionada con la aparición del síndrome del desgaste.

La suplementación intramuscular con sales de zinc aumenta la producción *in vitro* de TNF α por los macrófagos peritoneales de los ratones desgastados.

10. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- B. Beutler and A. Cerami. "Cachectin: more than a tumor necrosis factor". The new England Journal of Medicine. (1987), 316: 379-385.
- 2.- Vilcek J. and Tao H. Lee. "Tumor Necrosis Factor". The Journal of Biological Chemistry, (1991), 266: 7313-7316.
- 3.- Aggarwal B. B., Moffat B., Harkins R. N., "Human lymphotoxin: production by lymphoblastoid cell line, purification and initial characterization". J. Biol. Chem. (1984) 259:686-691.
- 4.- Ruddle H. Nancy. "Tumor necrosis factor and related cytotoxins". Immunol Today, (1987), 8: 129-130.
- 5.- B. Beutler and A. Cerami. "Tumor necrosis, cachexia, shock and inflammation: a common mediator". Ann. Rev. Biochem. (1988), 57: 505-518.
- 6.- Vassalli P. "The pathophysiology of tumor necrosis factor". Ann. Rev. Immunol. (1992), 10: 411-452.
- 7.- Le J. and Vilcek J. "Biology of disease, tumor necrosis factor and interleukin 1: Cytokines with multiple overlapping biological activities". Lab. Invest. (1987), 56: 234-248.
- 8.- Tracey K. J., Beutler B., Lowry S. F., Merryweather J., Wolpe S., Millark I. W., Hariri R.J., Fahey T. J., III Zentella A., Albert J. D., Shires G. T., and Cerami A. "Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin". Science (1986a) 234:470.
- 9.- Tracey K. J., Wei H., Manogue K. R., Fong Y., Hesse D. G., Nguyen H. T., Kuo G. C., Beutler B., Cotran R. S., Cerami A., Lowry S. F. "Cachectin/TNF (tumor necrosis factor) induces cachexia, anemia and inflammation". J. Exp. Med. (1988) 167: 1211-1227.

10.-Kriegler M., Peraz C., De Fay K., Albert I., Lu S.D. "A novel form of TNF/Cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein, ramification for the complex physiology of TNF." Cell (1988) 53: 45-53.

11.- W. Zuckschwardt Verlag. "Hormones in cancer cachexia: Megestrol Acetate". Ed. R. Hartenstein, N.S. Tchokmodyan München, Germany, 1991.

12.- Lähdevirta J., Maury C.P.J., Teppo A.m., Repo H. "Elevated levels of circulating Cachectin/ Tumor necrosis factor in patients with acquired immunodeficiency syndrome." The American Journal of Medicine, (1988), 85: 289-291.

13.- Titus R.G., Sherry B. and A. Cerami. "The involvement of TNF, IL-1 and IL-6 in the immune response to protozoan parasites". (1991), Immunol. Today

14.- Lehninger Albert L. "Bioenergetics". Fondo Educativo Interamericano Médico D.F. (1986) p. 71 .

15.- Stadnyk A.W. and Gaukkie J. "The acute phase protein response during parasitic infection". (1991), Immunol. Today.

16.- A. Orlif, D. Defeo-Jones, M. Boyer, D. Martinez, D. Kiefer, G. Vuocolo, A. Wolfe and S. H. Socher. "Tumors secreting human TNF/ Cachectin induce cachexia in mice"; Cell (1987), 50: 555-563.

17.- K. J. Tracey, S. Morgello, B. Koplin, T.J. Fahey III, J. Fox, A. Aledo, K.R. Manogue and A. Cerami. "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 predominately acute anorexia". J. Clin. Invest. (1990), 86: 2014-2024.

18.- M.J. Tisdale. "Cancer Cachexia". Br. J. Cancer (1991), 63: 337-342.

19.- Brambila Colombres E. M., González Vergara E. "Zinc: Función e interacción con las moléculas de los sistemas biológicos". B.E.B. (1994) 3: 36-45.

20.- Cunnane Stephen Ph. D. "Zinc: Clinical and biochemical significance". CRC Press, Inc. Boca Raton, USA 1988.

21.- Fraker P. J., Gorslwin M. E., Good R. A. and Prasad A. "Interrelationships between zinc and immune function". Federation Proceedings (1986), 45: 1475-1479.

22.- Aguirre Rodríguez Mónica Alicia, "Efecto del zinc sobre la hipersensibilidad tardía". Tesis para obtener el título de Q.F.B. Facultad de Química, UNAM, 1992.

23.- Mangan D.F., Welch G.R and Wahl S. M., "Lipopolysaccharide, tumor necrosis factor- α and IL-10 prevent programmed cell death (apoptosis) in human peripheral blood monocytes". Journal Immunology, (1991), 146: 1541-1546.

24.- De Pasquale-Jardieu P. and Fraker P. J., "Further characterization of the role of corticosterone in the loss of humoral immunity in zinc deficient A/J mice as determined by adrenalectomy". Journal Immunology, (1980), 124: 2650-2655.

25.- Miller J. A. Howard J. G. "Effect of thymectomy on the immunological responsiveness of the mouse." Proc. R. Soc. (Biol) 1962 156: 415

26.- Billingham R. E. Brent L. Medawer B. "Actively acquired tolerance of foreign cells." Nature (1953) 172: 603

27.- Schlesinger M., Marx R. "Wasting disease induced in young mice by administration of cortisol acetate." Science (1964) 143: 965

28.- Reilly R. D., Thompson J. S., Bielski R. K., Severson C. D. "Estradiol induced wasting syndrome in neonatal mice." J. Immunol. (1967) 98: 110

- 29.-Chester J. K., Will M. "Some factors controlling food intake by zinc-deficient rats." Br. J. Nutr. (1973) 30 : 555
- 30.- John W. Julia "Etiologi of the wasting disease." J. Infect. Dis. (1973) 128 suppl : S99
- 31.- Ekstedt R. D., Hayes L.L. "Runt disease induced by non-living bacterial antigens." J. Immunol. (1967) 110 :
- 32.- Pierpaoli W., Sorkin E. "Hormones, thymus and lymphocyte functions." Experientia (1972) 28 : 1385
- 33.- Ekstedt R. D., Nishimura E. T. "Runt disease induced in neonatal mice by sterile bacterial vaccines." J. Exp. Med. (1964) 120 : 795
- 34.- García Tamayo F. , Aguilón A. E., Rivera R., De León S., Pastelin R., Lastra M. D. "Consecuencias de la inyección de productos bacterianos con el sistema inmunitario de ratones recién nacidos." Bol. Med. Hosp. Inf. Mex. (1990) 47 : 173-177.
- 35.- Fierro Gaxiola Leonel, "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.
- 36.- Bonifaz Alfonso Laura C., "Utilidad de las sales de tetrazolium para estudiar la proliferación de linfocitos en ratones desnutridos." Tesis para obtener el título de Q. F. B. Facultad de Química, UNAM, (1991).
- 37.- Casales José Alberto, "Translocación bacteriana en ratones CD1 con el síndrome del desgaste." Tesis para obtener el título de Q.F.B. Facultad de química, UNAM (1991).
- 38.- García-Tamayo F., Fierro L., Lastra M. D. "Inducción y recuperación del desgaste inmunológico." Bol. Med. Hosp. Inf. Mex (1991) 48 : 559-564

39.- Esturau Escofet Nuria. "Permeabilidad intestinal en ratones con el síndrome de desgaste." Tesis para obtener el título de Q.F.B. Facultad de química, UNAM (1993)

40.- Hortensia Nachelli Malpica López "Acción de TP-1 y zinc sobre la respuesta de los linfocitos T en ratones desgastados." Tesis para obtener el título de Q.F.B. Facultad de química, UNAM (1994).

41.- Terrazas L. I., Martínez T., García Tamayo F. "Administration of ⁶⁵Zn by brain of Balb/c healthy mice." Abstracts of 2nd international congress of the International Society for Neuroimmunomodulation. Salerno, Italy (1993) p. 191

42.- Marvin S, M. D. , "Stress, depression, and the immune system". J. Clin. Psychiatry (1989), 50:36-42.

43.- Restak R. M, M. D. , "The brain, depression, and the immune system". J. Clin. Psychiatry (1989), 50:23-26.

44.- Nemeroff Ch. B. "Clinical significance of psychoneuroendocrinology in Psychiatry: focus on thyroid and adrenal". J. Clin. Psychiatry (1989), 50:13-18.

45.- Weiss J. M., Sundar S.K., Becker K.J., Ciarpal M.A. , "Behavioral and neural influences on cellular immune responses: effects of stress and interleukin-1". J. Clin. Psychiatry (1989), 50:43-55.

46.- Morales Montor J. y Terrazas Luis I. "Regulación de la esteroidogénesis gonadal por linfocinas". B.E.B. (1994) 3: 46-52.

47.- Dallman M. F., Akana S. F., Cascio C. S., Darlington D.N., Jacobson L., and Levyn N. "Regulation of ACTH secretion: Variations on a theme of B". (1987) 43: 113-

48.- Moreno Tovar Juan Manuel, "Grado de susceptibilidad al desgaste inmunológico en ratones CD1 y C3HeB/FeJ tratados con Staphylococcus aureus". Tesis para obtener el título de Q.F.B., Facultad de Q.F.B., Universidad Veracruzana, 1991.

49.- Golden M. H. N., Golden E. B., Harland P.S.E.G., Jackson A. A., "Zinc and immunocompetence in protein-energy malnutrition". The Lancet (1978), 10: 1226-1229.

50.- Hambidge K.M., Hambidge C., Jacobs M., Baum J. D., "Low levels of zinc in hair, anorexia, poor growth, and hypoguesia in children". *Pediat. Res.* (1972) 8: 868-874.

51.- Bogden J.D., Oleske J.M., Murves E.M., Lavenhar M.A., Bruening K.S., Kemp F.W., Holding K.J., Denny T.H., Louria D.B., "Zinc and immunocompetence in the elderly: baseline data on zinc and immunity in unsupplemented subjects". *Am. J.Clin. Nutr.* (1987) 46:101-109.

52.- Krieger M., Perez C., Defay K., Albert I., Lu S.D. "A novel form of TNF/ Cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: Ramifications for the complex physiology of TNF". *Cell* (1988) 53: 45-53.

53.- Gearing A. J. H., Beckett P., Christodoulou M., Churchill M., Clements J., Davidson A. H., Drummond A. H., Galloway W.A., Gilbert R., Gordon J. L., Leber T. M., Mangan M., Miller K., Neyes P., Owen K., Patel S., Thomas W., Wells G., Wood L. M., Woolley K. "Processing of tumor necrosis factor- α precursor by metalloproteinases". *Nature* (1994) 370: 555-557.

54.- McGeehan G.M., Becherer J.D., Best Jr R. C., Boyer C. M., Champion B., Connolly K. M., Conway J. G., Furdon P., Karp S., Kido S., McElroy A. B., Nichols J., Pryzwansky K. M., Schoonen F., Sekul L., Truesdale A., Vergese M., Warner J., Ways P. J. "Regulation of tumor necrosis factor - α processing by a metalloproteinase inhibitor". *Nature* (1994). 370: 558-561.

55.- González Macouzet Eduardo, "Efecto de la administración de zinc sobre la inmunocompetencia de ratones CD1 con el síndrome del desgaste". Tesis para obtener el título de Q. F. B. Fac. de Química, UNAM, (1991).

56.- Chandra R. K. et al: "Nutritional regulation of immunity and risk of illness." Indian J. Pediatr. (1989) 56 : 607.

57.- Faulk W. P. Demayer E. M. "Some effects of malnutrition on the immune response in man." Am J. Clin. Nutr. (1974) 27 : 638

58.- Aggarwal B. B. , Vlicek J. "Tumor Necrosis Factors. Structure, Function and mechanism of action." Immunology series Vol 56 by Marcel Dekker Inc. 1992, USA. p: 431-452

59.- Castilla Sama Luis y Cravioto Joaquín, "Estadística Simplificada" , Ed. Trillas, 1991, México D.F.

60.- 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