



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

EFFECTOS DE LA DESNUTRICION SOBRE EL METABOLISMO ENERGÉTICO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE RATA.

M. A. Aceves Pacheco, J. T. Hernández Jaime, C. García Guerrero, M. Fernández-Guasti, R. Godínez Fernández.

Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa.

Resumen.

Los efectos de la desnutrición severa en el sistema inmune son comparables con enfermedades como el VIH, afectando el desarrollo y los mecanismos que utilizan las células mononucleares para la respuesta inmune. Se han realizado diversos estudios a nivel clínico, epidemiológico, inmunológico, bioquímico y otros sobre los efectos de la desnutrición en la inmunidad. Sin embargo, no existe en la literatura especializada un análisis de los efectos de la desnutrición sobre el metabolismo energético que pudiera explicar la pobre respuesta inmune de los organismos que padecen desnutrición severa. Por tal motivo, se implementó un protocolo experimental con células mononucleares de ratas de la cepa Wistar con desnutrición severa y técnicas de fluorescencia por excitación láser a frecuencias específicas. Se obtuvieron espectros de la molécula NADH intracelular tomando como referencia la amplitud máxima emitida por células de ratas (control) bien nutridas. En las células de ratas desnutridas se observó una disminución en la amplitud de la fluorescencia. Asimismo, se han encontrado corrimientos en la longitud de onda donde se encuentra la máxima emisión del espectro del NADH en las células mononucleares de ratas desnutridas comparadas a las ratas control. Este hecho sugiere que existe un efecto de la desnutrición severa sobre la bioenergética celular mononuclear.



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

INTRODUCCIÓN

La desnutrición moderada y grave tiene consecuencias en el sistema inmunológico del cuerpo humano muy parecidos a los que provoca el SIDA (VIH). Inmunólogos, bioquímicos, biólogos han estudiado sus consecuencias pero no se han hecho estudios en la bioenergética celular. Una forma de medir esto es a través de la obtención de la fluorescencia de sus células. Las células contienen una molécula fluorescente que es el NADH, esta molécula es clave en la bioenergética de la célula, la cual nos indica el estado del metabolismo celular en células mononucleares que pertenecen al sistema inmunológico innato y adquirido (figura 1)



Figura 1

TEORIA.

El NADH es una molécula fluorescente, por lo que al ser excitada a una longitud de onda de 340 nm emite radiación pero con una longitud de onda corrida a 460 nm (figura 2).



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

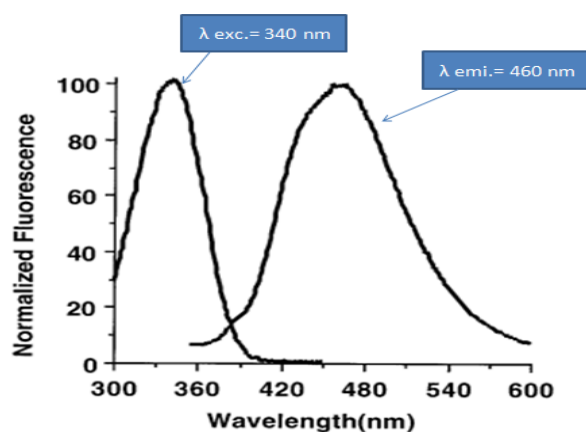


Figura 2.

Esta molécula se encuentra en mitocondrias de células. El NADH se encargan de transportar electrones a la cadena respiratoria, los cuales son donados para producir moléculas energéticas llamadas ATP. Para que la célula pueda generar el NADH, debe reducir el NAD⁺ en los ciclos metabólicos (glucólisis y ciclo de krebs); el NAD⁺ no es una molécula que emita fluorescencia, por lo que la medición de la fluorescencia se diseñó de manera selectiva en el NADH.

Se ha realizado espectroscopia de fluorescencia con esta molécula fluorescente en diversas patologías como cáncer, papiloma, hipoxia, etc.; donde se ha medido su intensidad y la longitud de onda máxima a la cual emite la molécula, ya que al unirse a ciertas proteínas, puede cambiar su espectro de emisión.

PARTE EXPERIMENTAL:

Se realizó la extracción de sangre de 4 ratas desnutridas y 4 controles a la edad de 21 días. Las células mononucleares se separaron de sangre periférica por medio de la técnica gradiente de densidad. La muestra de células mononucleares se suspendió en 1.5 ml de PBS y se colocó en una cubeta de cuarzo de 1x1x4 cm. El esquema del arreglo experimental se muestra en la figura 3.



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

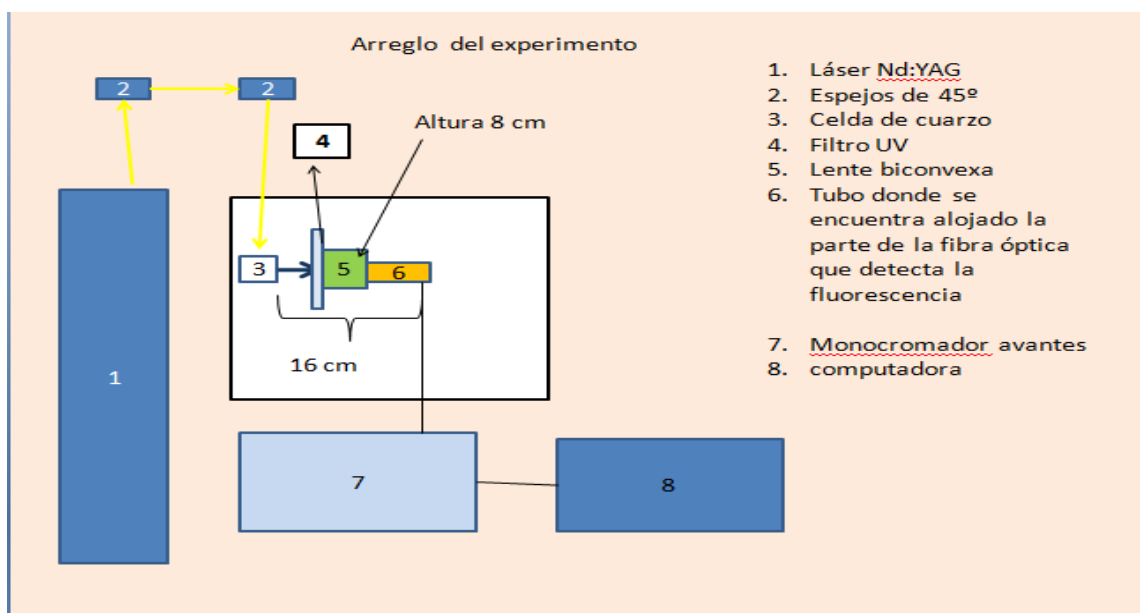


figura 3

Se utilizó un láser Nd: YAG a 355 nm para excitar a la molécula (NADH) y se midió la fluorescencia con un arreglo óptico donde la muestra y su imagen se ubican a una distancia dos veces la distancia focal de la lente y en lados opuestos de la misma. Dicha configuración óptica se conoce como un arreglo 2f. En el plano imagen se colocó una fibra óptica multimodo que conduce la señal óptica a un monocromador. El monocromador contiene un arreglo lineal de fotodiodos a 500 ms a una muestra promedio.

RESULTADOS

Se hicieron diluciones con células mononucleares de 4 ratas bien nutridas, primero obteniendo la muestra de células mononucleares y suspendiéndolas en 1.5 ml de PBS, posteriormente estas muestras se diluyeron en 3 ml de PBS. De cada una de estas muestras (diluidas como no diluidas), se tomó el espectro de fluorescencia del NADH de las células mononucleares. Esto para evaluar el cambio en la intensidad de la fluorescencia en la molécula del NADH, debido a la densidad celular, ya que en la desnutrición severa en ratas se ha encontrado una menor densidad celular en células mononucleares comparadas con ratas bien nutridas (9).



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

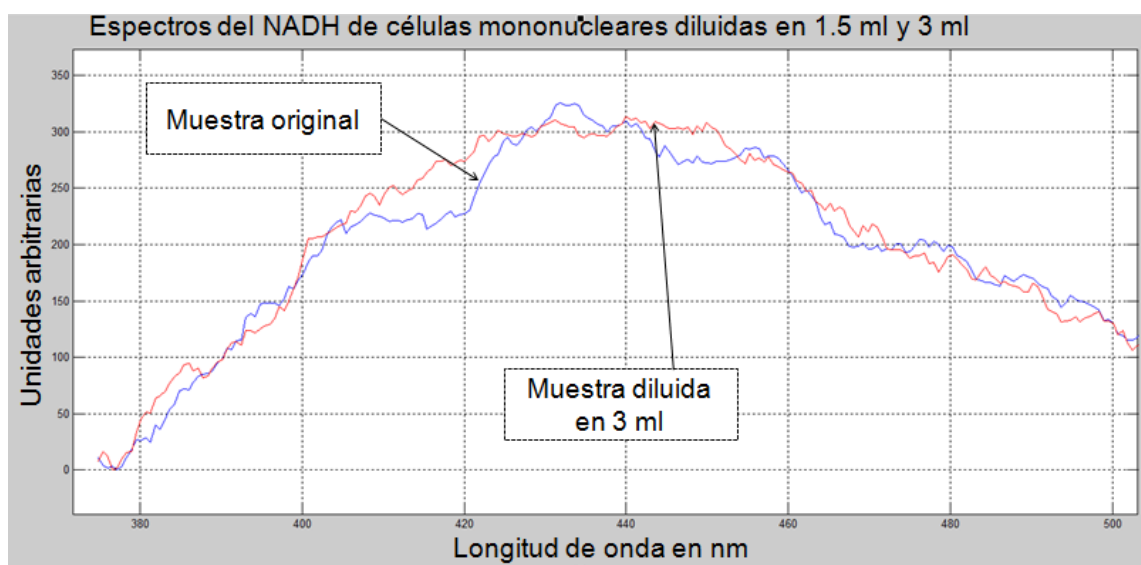


figura 4. Espectro promedio de la fluorescencia del NADH de células mononucleares de 4 ratas bien nutridas a lo largo de 10 minutos (la línea azul corresponde a células mononucleares suspendidas en 1.5 ml de PBS y la línea roja esta diluida al 50% con PBS. La diferencia de amplitud es del 0.07% entre la original y la diluida.

Se obtuvieron posteriormente espectros del NADH de células mononucleares de 4 ratas bien nutridas (control) y de 4 ratas desnutridas (experimentales). Se tomó una muestra cada segundo a lo largo de diez minutos para el NADH de las células mononucleares tanto de ratas nutridas como desnutridas. En la figura 5, se muestran los espectros promedio de la fluorescencia del NADH de células mononucleares de 4 ratas control (línea azul) y el espectro promedio de la fluorescencia del NADH de células mononucleares de 4 ratas desnutridas (línea roja); donde la fluorescencia del NADH de células mononucleares de ratas desnutridas es 58% menor con respecto a las bien nutridas, viendo claramente que hay un efecto en el metabolismo celular debido a la desnutrición con respecto a las ratas control.



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

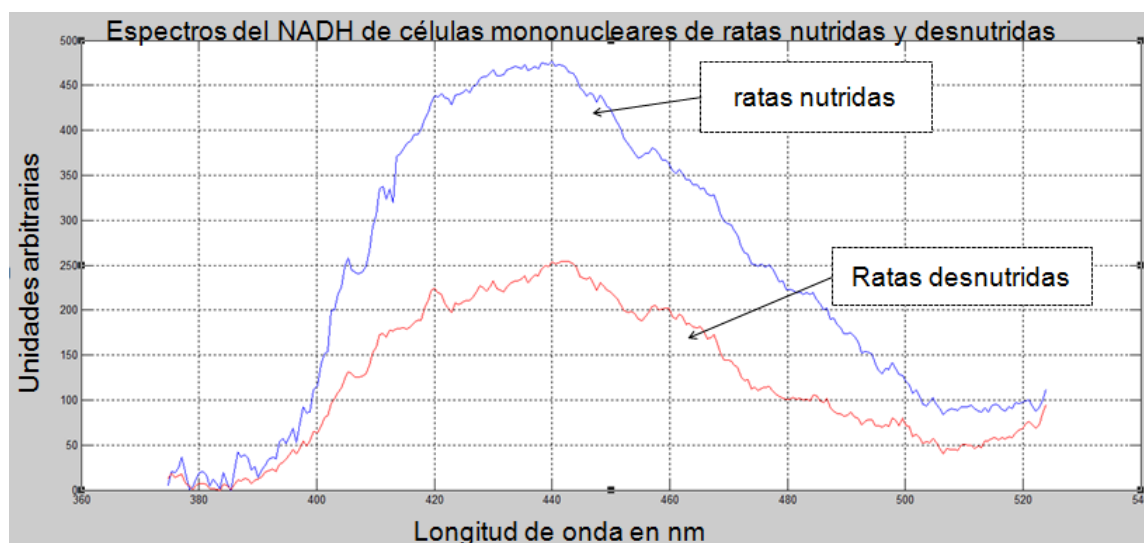


Figura 5. Espectro promedio del NADH de células mononucleares en 4 ratas bien nutridas (línea azul) y en 4 ratas desnutridas (línea roja). Se muestra la longitud de onda del pico máximo promedio de ratas del espectro del NADH de células mononucleares de ratas desnutridas (experimentales) que es 441.8 nm y de ratas bien nutridas de 440 nm.

Existe un corrimiento a longitudes mayores del espectro promedio en el tiempo del NADH de células mononucleares de ratas desnutridas con respecto a ratas nutridas. En la figura 6 la señal de corrimiento (línea roja) aparece encima de la señal de corrimiento en ratas bien nutridas (línea azul). Los corrimientos a mayores longitudes de onda son muestra de que la molécula NADH aparece libre y no acoplada a proteínas (5,6).



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

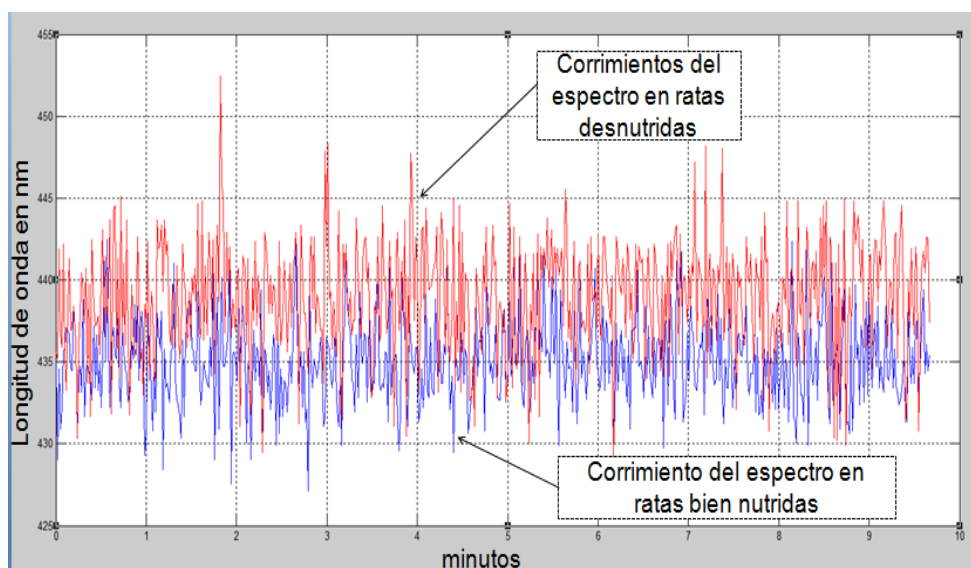


Figura 6. Corrimientos del espectro del NADH en células mononucleares en ratas tas desnutridas (línea roja) y ratas bien nutridas (línea azul).

Se realizó una prueba t para observar si había diferencias significativas entre el promedio de los corrimientos del NADH de células mononucleares de ratas desnutridas y ratas bien nutridas. El valor de $t=1.94$, por lo que no hay diferencia significativa.

CONCLUSIONES

Se ha encontrado que hay una disminución del espectro promedio del NADH de células mononucleares de ratas desnutridas con respecto a las nutridas por lo que sugeriría dos aspectos uno que hay disminución de las reservas metabólicas o la otra que hay un aumento en el metabolismo celular en células mononucleares de ratas desnutridas con respecto a las bien nutridas. Se necesitan hacer más experimentos para descartar; sin embargo se ha visto en organismos con desnutrición severa y moderada que hay una pobre función del sistema inmunológico para combatir un agente patógeno, por lo que se sugeriría que es una alteración en el sistema inmune que disminuye la producción de energía en células mononucleares en ratas desnutridas.

BIBLIOGRAFIA

1. **Leopoldo Vega-Franco.** Hitos conceptuales en la historia de la desnutrición proteico-energética. Rev. Salud Pública de México (1999); Vol. 41(4): 328-333



V CONGRESO NACIONAL DE TECNOLOGÍA APLICADA A CIENCIAS DE LA SALUD

5, 6 y 7 de junio de 2014
TONANTZINTLA, PUEBLA, MÉXICO

2. **Maria Jesus Gómez Ramos, Fco. Miguel González Valverde.** Alta prevalencia de la desnutrición en ancianos españoles ingresados en un hospital general y factores asociados. Rev. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. (2005); Vol. 55 (10)
3. **Chandra R. K.** Nutrition, Immunity and Infection: From Basic Knowledge of Dietary Manipulation of Immune Responses to Practical Application of Ameliorating Suffering and Improving Survival. Rev. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. (1996). Vol. 93, No 25: 14304-14307.
4. **Varendi-Espinoza, L.E.; Zafra-Tanaka, Salazar Saavedra, Basilio-Flores, Millones Sanchez.** Prevalencia y factores asociados a desnutrición hospitalaria en un hospital general; Perú, 2012. Rev. Nutrición Hospitalaria (2013). Vol. 28. (3): 1236-1243.
5. **Clark C. Fjeld, William T. Birdsong, and Richard H. Goodman***, Differential binding of NAD and NADH allows the transcriptional corepressor carboxyl-terminal binding protein to serve as a metabolic sensor. Proceedings of the National Academy of the United States of America. (2003); vol. 100 (16): 9202-9207
6. **Ramanujam N, Mitchell MF, Mahadevan A, Warren S, Thomsen S, Silva E,** al. In-vivo diagnosis of cervical intraepithelial neoplasia using 337-nm-excited laser-induced fluorescence. Proceedings of the National Academy of the United States of America (1994) vol. 91(21):10193-7.
7. **Guan-Chin Su,¹ Yau-Huei Wei,^{2,3} and Hsing-Wen Wang^{1,*},** NADH fluorescence as a photobiological metric in 5-aminolevulinic acid (ALA)-photodynamic therapy. Optics Express (2011) Vol. 19 (22): 21145-21154.
8. **Ortiz R, Cortés E, Pérez L, González C, Betancourt M.** Assessment of an experimental method to induce malnutrition by food competition during lactation. Med Sci Res (1996) Vol. 24:843-6.
9. **Evaluación de la activación de linfocitos de ratas desnutridas durante la lactancia.** Edith Cortés Barberena. Tesis para obtener grado de doctora en ciencias biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa. (2010).