

Posgrado en Biología Experimental

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA**

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**“EVALUACIÓN DE LA FRECUENCIA DE APOPTOSIS EN
LINFOCITOS DE NIÑOS DESNUTRIDOS”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A:

CATALINA PLIEGO VILLANUEVA

DIRECTORA:
DRA. A. ROCÍO ORTIZ MUÑIZ

ASESORA INTERNA:
DRA. LEONOR RODRÍGUEZ CRUZ

ASESORA EXTERNA:
M en C. ROSALVA RANGEL CORONA

MÉXICO, D. F.

ABRIL DE 2006

COMITÉ TUTORAL:

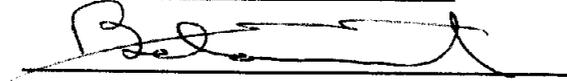
Dra. Alda Rocío Ortiz Muñiz
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento Ciencias de la Salud
arom@xanum.uam.mx

Dra. Leonor Rodríguez Cruz
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento Ciencias de la Salud
leor@xanum.uam.mx

M en C. Rosalva Rangel Corona
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza
Laboratorio de Inmunoterapia
rancor@servidor.unam.mx

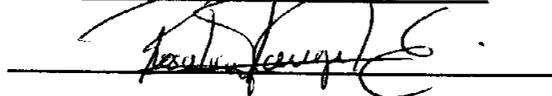
Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada "EVALUACIÓN DE LA FRECUENCIA DE APOPTOSIS EN LINFOCITOS DE NIÑOS DESNUTRIDOS" el día 5 de abril de 2006

Dr. José Miguel Betancourt Rule
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento Ciencias de la Salud
bet@xanum.uam.mx



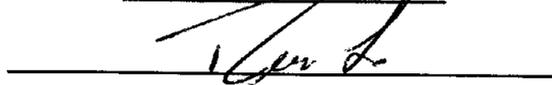
PRESIDENTE

M en C. Rosalva Rangel Corona
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza
Laboratorio de Inmunoterapia
rancor@servidor.unam.mx



SECRETARIA

Dra. Leonor Rodríguez Cruz
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento Ciencias de la Salud
leor@xanum.uam.mx



VOCAL

AGRADECIMIENTOS

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa se encuentra dentro del Padrón de Excelencia del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, con número de registro 309-0, y en el Padrón de Programas del PIFOP-CONACYT clave C/PFPN-2002-35-32.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Biología Celular y Citometría de Flujo, del Departamento de Ciencias de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

El laboratorio ha recibido apoyo de FOMES, PIFI-PROMEP y CONACyT

De igual forma agradezco al Dr. Jaime Graniel del Hospital Pediátrico de Iztapalapa del Gobierno del Distrito Federal por su valiosa participación en este trabajo ya que sin su cooperación no hubiese sido posible recolectar las muestras necesarias para este estudio

Además, para el inicio y término de esta tesis le doy las GRACIAS:

A todos los miembros del laboratorio de Biología celular y citometría de flujo:

A la Doctora Rocío Ortiz por su comprensión, profesionalismo y dirección en esta tesis, a la Doctora Leonor Rodríguez por su asesoría y apoyo en la misma

A la maestra Edith por sus múltiples asesorías

A mis queridas compañeras y amigas Hilda, Elsa y Julieta por compartir el trabajo, espacio y tiempo conmigo

A la Maestra Rosalva Rangel y al Dr. Betancourt por su asesoría en este trabajo, a las Doctoras Cristina González y Oralia Nájera por su valioso apoyo en el mismo

A Marianita y Lulú por su apoyo y dedicación

Le doy las gracias especialmente a mi esposo Arturo, por que sin su apoyo, este trabajo hubiera sido mucho más difícil

DEDICATORIAS

Al pequeño Pablo y mi moreno por su apoyo

A mis padres, María del Carmen y Primitivo (†)

***A toda mi familia, los Pliego, los Villanueva, los Robledo y los
Martínez, por sus porras para concluir esta etapa***

A mis amigos de siempre Irma, Oli, Eli, Marco, Jaime Rebe y Gus

***A los niños que hicieron posible este trabajo con su valiosísima
aportación, base de este estudio y a las instituciones participantes en
el mismo***

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada “EVALUACIÓN DE LA FRECUENCIA DE APOPTOSIS EN LINFOCITOS DE NIÑOS DESNUTRIDOS” el día 5 de abril de 2006

Dr. José Miguel Betancourt Rule
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento Ciencias de la Salud
bet@xanum.uam.mx

PRESIDENTE

M en C. Rosalva Rangel Corona
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza
Laboratorio de Inmunoterapia
rancor@servidor.unam.mx

SECRETARIA

Dra. Leonor Rodríguez Cruz
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa
División de Ciencias Biológicas y de la Salud
Departamento Ciencias de la Salud
leor@xanum.uam.mx

VOCAL

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE CUADROS	v
RESUMEN	vi
ABSTRACT	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	1
DESNUTRICIÓN	1
<i>CLASIFICACIÓN DE LA DESNUTRICIÓN</i>	2
<i>MARASMO</i>	2
<i>KWASHIORKOR</i>	2
<i>CONSECUENCIAS DE LA DESNUTRICIÓN</i>	3
SISTEMA INMUNOLÓGICO	4
<i>LINFOCITOS</i>	4
<i>LINFOCITOS T</i>	5
<i>LINFOCITOS B</i>	6
<i>ÓRGANOS LINFOIDES</i>	7
RESPUESTA INMUNOLÓGICA	7
<i>RESPUESTA POSITIVA Y NEGATIVA</i>	7
<i>INMUNIDAD INNATA</i>	8
<i>INMUNIDAD ADQUIRIDA</i>	9

ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T	9
MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA	11
<i>CITOCINAS</i>	11
<i>FACTOR DE NECROSIS TUMORALα</i>	11
<i>CD95 (APO-1 o Fas)</i>	12
MUERTE CELULAR	12
<i>NECROSIS</i>	12
<i>APOPTOSIS</i>	13
<i>CAMBIOS MORFOLÓGICOS</i>	13
<i>CAMBIOS BIOQUÍMICOS Y FUNCIONALES</i>	14
<i>CASPASAS</i>	15
<i>VÍA EXTRÍNSECA DE LA APOPTOSIS</i>	15
<i>VÍA INTRÍNSECA DE LA APOPTOSIS</i>	16
RELACIÓN DESNUTRICIÓN- SISTEMA INMUNOLÓGICO- APOPTOSIS	18
TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DE APOPTOSIS	20
CITOMETRÍA DE FLUJO	22
III. JUSTIFICACIÓN	25
IV. HIPÓTESIS	26
V. OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS PARTICULARES	27

VI. METODOLOGÍA	28
OBTENCIÓN DE LA MUESTRA	28
FRECUENCIA DE APOPTOSIS	28
MARCAJE CON ANEXINA V Y CD95	28
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	29
VII. RESULTADOS	30
ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA	32
FRECUENCIA DE APOPTOSIS Y NECROSIS TOTAL	32
FRECUENCIA DE APOPTOSIS EN CÉLULAS CD4 ⁺ Y CD8 ⁺	36
EXPRESIÓN DE CD95	40
VIII. DISCUSIÓN	43
IX. CONCLUSIÓN	48
X. BIBLIOGRAFÍA	49

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AICD	Muerte celular inducida por activación
AMC	Anticuerpos monoclonales
Apaf-1	Factor estimulador de apoptosis
APC	Células presentadoras de antígeno
BN	Bien nutridos
CAD	DNasas activables por caspasas
CASPASAS	Cistein Aspartato Specific ProteASEs
CD	Grupos de diferenciación
CMF	Citómetro de flujo
CMH	Complejo mayor de histocompatibilidad
DCP	Desnutrición calórico proteica
DD	Dominio de muerte
DN2	Desnutridos de segundo grado
DN3	Desnutridos de tercer grado
FADD	Dominios de muerte asociados a Fas
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Luz con desviación frontal
I-CAD	Inhibidor de DNasas activables por caspasas
IFN	Interferón?
IL-1	Interleucina 1
IP	Yoduro de propidio
LT	Linfotoxina
MEC	Matriz extracelular
PCD	Muerte celular programada

PE	Ficoeritrina
PerCP	Proteína peridina clorofila
PS	Fosfatidilserina
SSC	Luz con desviación lateral
TCR	Receptor de células T
TNF	Factor de Necrosis Tumoral
TNF-RI	Receptores tipo I del TNF
TNF-RII	Receptores tipo II del TNF
TNFRs	Receptores del TNF
TRAFs	Factores asociados al TNFR
TRAIL -R1	Ligando inductor de apoptosis relacionados a TNF -R1
UNICEF	Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1 Niño con marasmo	3
Figura 2 Niño con kwashiorkor	3
Figura 3 Presentación del antígeno por moléculas del CMH I y II	6
Figura 4 Activación de células B, producción de Ab y células B dememoria	7
Figura 5 Activación de linfocito Th	10
Figura 6 Expansión clonal de linfocitos Th y producción de citocinas	10
Figura 7 Término del estímulo antigénico e inicio de la muerte celular	10
Figura 8 Funciones principales de la muerte celular por apoptosis	14
Figura 9 Vía extrínseca de señalización de muerte celular por medio de Fas	16
Figura 10 Vía intrínseca de señalización de muerte celular por medio de mitocondria-citocromo c	17
Figura 11 Formación de cuerpos apoptóticos	18
Figura 12 Acción del yoduro de propidio (PI)	21
Figura 13 Translocación de fosfolípidos y externalización de la PS	22
Figura 14 Partes que componen un citómetro de flujo	23
Figura 15 Gráfica de puntos que muestra la identificación de la región de linfocitos	32
Figura 16 Gráfica de puntos para seleccionar la región de células totales en necrosis y apoptosis	33

Figura 17	Porcentaje promedio de células totales en apoptosis (ANEXINA+), obtenido en cada uno de los grupos de estudio	35
Figura 18	Porcentaje promedio de células totales en necrosis (IP+), obtenido en cada uno de los grupos de estudio	35
Figura 19	Región de células CD4+ (gráfica A) y Porcentaje de células CD4+ totales y CD4+ANEXINA+ (gráfica B)	36
Figura 20.	Región de células CD8+ (gráfica A) y porcentaje de células CD8+ totales y CD8+ANEXINA+ (gráfica B)	37
Figura 21	Porcentaje promedio de Células CD4+ANEXINA+	39
Figura 22	Porcentaje promedio de células CD8+ANEXINA+	40
Figura 23	Gráficas de puntos que muestran las células CD95+	40
Figura 24	Porcentaje promedio de células CD4+ y CD95+	42
Figura 25	Porcentaje promedio de células CD8+ y CD95+	43

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1 Métodos para la detección de apoptosis	20
Cuadro 2 Anticuerpos y moléculas conjugadas con fluorocromos	29
Cuadro 3 Descripción de niños de los diferentes grupos de estudio	31
Cuadro 4 Porcentajes de leucocitos totales en apoptosis y necrosis	34
Cuadro 5 Porcentajes de células CD4+ y CD8+ANEXINA+	38
Cuadro 6 Porcentajes de células CD4+ y CD8+CD95+	41

RESUMEN

Hoy, en pleno siglo XXI, la desnutrición sigue siendo uno de los principales problemas de salud pública y está aumentando. La desnutrición es una de las principales causas de muerte en niños menores de cinco años, principalmente en países en vías de desarrollo como el nuestro. Uno de los principales problemas que origina la desnutrición es la alteración del sistema inmunológico lo cual hace al organismo más susceptible a contraer infecciones.

La muerte celular por apoptosis es el tipo de muerte fisiológica que se encarga de mantener la homeostasis de los tejidos y es de especial importancia en el sistema inmunológico. La alteración de este proceso de muerte se vería reflejada en la inadecuada formación de la respuesta inmunológica y por ende en la incapacidad del organismo para responder ante el ataque de agentes patógenos.

La meta de este trabajo fue determinar por medio de citometría de flujo si la frecuencia de apoptosis y la expresión de CD95 (molécula de membrana inductora de señales de muerte) se encuentran alteradas en linfocitos de niños con desnutrición de segundo grado o moderada y niños con desnutrición de tercer grado o grave los cuales se encontraban entre 6 meses y 5 años de edad.

En este estudio se incluyeron cuatro grupos de niños: 1) Bien nutridos (BN) sanos con peso y talla correspondientes a su edad. 2) Bien nutridos con infecciones asociadas (BNI). 3) Desnutridos de segundo grado (DN2) con infecciones asociadas y 4) Desnutridos de tercer grado (DN3), con infecciones asociadas. En todos los casos las infecciones fueron graves de tipo bacteriano en vías respiratorias o gastrointestinales.

Los resultados del presente estudio muestran que el grupo de los niños DN3 presentan la mayor frecuencia de apoptosis de leucocitos totales, además hay una relación directa entre el grado de desnutrición, la frecuencia de apoptosis y la expresión de CD95 en los subtipos celulares CD4⁺ y CD8⁺. En la cuantificación de la expresión de Anexina V (o apoptosis) y CD95 se encontró que los niños DN3 presentaron la mayor frecuencia de apoptosis en células CD8⁺ así como la mayor expresión de CD95 en células CD4⁺ y CD8⁺, por su parte, los DN2 tuvieron la mayor frecuencia de apoptosis en células CD4⁺.

También se observó que la frecuencia de apoptosis y la expresión de CD95 fueron menores en el grupo de los niños BNI en relación a los DN2 y los DN3 pero fueron mayores que en los BN. El grupo de BNI es de gran utilidad, ya que se considera el grupo control de niños con infecciones pero sin desnutrición. Lo anterior permitió considerar directamente a la desnutrición como la responsable tanto de la alta frecuencia de apoptosis como de la expresión de CD95.

En conclusión, la alta frecuencia de apoptosis en células T maduras en sangre periférica podrían impedir que las células T se activen y lleven a cabo su función, esto originaría una inadecuada formación de la respuesta inmunológica en los niños desnutridos lo cual disminuye su capacidad para responder a una infección. Esto sugiere que la inmunidad mediada por células está alterada por la desnutrición.

ABSTRACT

In the present malnutrition is still one of the main health public problems and it is increasing. Malnutrition is one of the main causes of death in children aged under five years, principally in developing countries like México. One of the main problems of malnutrition is the alteration of the immunology system, this makes the organism more susceptible to infection.

The programmed cell death (PCD) or apoptosis is the type of physiological death that maintains homeostasis in all the tissues and is especially important in the immunology system. The alteration of this death process will be reflected in the inadequate formation of the immune response and in the incapacity of the organism to respond to the attack of pathogen agents.

The aim of this work was to determine, using flow cytometry, whether the apoptosis frequency and the CD95 expression are altered in lymphocytes of children with second and third degree

This study included four groups: 1) healthy well nourished children (WN), with weight and height corresponding to their age, 2) well nourished with associated infections (WNI), 3) malnourished of second-degree (MN2 or moderate malnutrition) with associated infections and 4) malnourished of third-degree (MN3 or severe malnutrition) with associated infections. In all the cases there were serious bacterial infections in respiratory or the gastrointestinal way.

The results of this study show that, the MN3 group had the greatest total apoptosis frequency. Also we found that there is a direct relationship between malnutrition degree, apoptosis frequency and CD95 expression in the lymphocytes subsets CD4⁺ and CD8⁺.

In the measurement of Annexin and CD95 expression we found that the MN3 group had the higher apoptosis frequency in CD8⁺ cells as well as the higher CD95 expression in CD4⁺ and CD8⁺ cells. In the MN2 group, it had the higher apoptosis frequency in CD4⁺ cells.

The apoptosis frequency and CD95 expression in the control group of children with infection but without malnutrition (WNI) were lower than those of MN2 and MN3 children but were higher than in WN children. The comparison between this group and the malnourished groups, permitted to consider malnutrition the main reason for the high apoptosis frequency as the CD95 expression.

In conclusion the high apoptosis frequency on lymphocytes could alter T-cells functions. This may be associated with the mechanisms involved in the immunodeficiency observed in malnourished children. This finding support that cell-mediated immunity is impaired by malnutrition.

I. INTRODUCCIÓN

Contrario a algunos de los hallazgos científicos más relevantes como son el desciframiento del código genético humano o los primeros intentos por conquistar otros planetas, la desnutrición sigue siendo uno de los principales problemas de salud a nivel mundial (Vega-Franco, 1999). Hoy en pleno siglo XXI este padecimiento que parecería sólo de épocas pasadas va en aumento, Instituciones como el Fondo de las Naciones Unidas para la Infancia (UNICEF) reporta que cerca de 150 millones de niños en el mundo sufren de desnutrición, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación (FAO) reporta 800 millones de personas que sufren de desnutrición crónica.

La desnutrición calórico-proteica es directa o indirectamente responsable de un tercio de las muertes totales en niños menores de 6 años de edad en América Latina (Chandra, 1991; Chevalier y col. 1996). Los países más afectados son países pobres, en vías de desarrollo o que están en guerra.

Para el año 2000 la cifra de niños con desnutrición y retraso del desarrollo fue del 33% a nivel mundial. Asia, África y Latinoamérica registran las prevalencias alta, intermedia y baja respectivamente de retraso de crecimiento infantil. En México, también en el año 2000, se reporta un 46.4% de niños con desnutrición o que alguna vez la padecieron distribuidas en 36.1% en primer grado, 9.0% en segundo grado y 1.3% en tercer grado (Gámez y col., 2003). La mayor prevalencia se registra en estados del sur de la república y la más baja en estados del norte (Ávila y col., 1998). Lo anterior hace a este padecimiento uno de los problemas principales de salud pública (Lesourd y Mazari., 1997).

II. ANTECEDENTES

DESNUTRICIÓN

La desnutrición es un estado de desequilibrio en el que el organismo requiere una mayor cantidad de nutrientes de los que recibe, se puede generar por la carencia de alguno o todos los elementos nutritivos requeridos en la dieta o por alteración en la digestión o absorción de los mismos (Gámez y col., 2003).

La principal causa del origen de la desnutrición es una dieta inadecuada, la cual es originada por deficiencia en vitaminas, minerales, proteínas y/o calorías o una combinación entre ellas, además de factores socioculturales o ignorancia en la población (Jelliffe, 1985).

CLASIFICACIÓN DE LA DESNUTRICIÓN

Se ha determinado que la desnutrición, se presenta con mayor frecuencia en niños ya que sus requerimientos de proteínas son mayores que en la edad adulta. Con base en los factores que la causan, la desnutrición se puede clasificar como primaria, secundaria o mixta (Gómez y col., 1956).

En estudios nutricionales se han clasificado tres grados de desnutrición, de primero, segundo y tercer grado o leve, moderada y grave respectivamente, basándose en el peso para la edad del paciente o déficit corporal (Gómez y col., 1956; Gómez, 2003).

- Desnutrición de primer grado o leve, se caracteriza por un déficit en el peso corporal de 10 a 24% del promedio correspondiente a su edad.
- Desnutrición de segundo grado o moderada, es más marcada que la anterior, el déficit de peso oscila entre 25 y 39% correspondiente a su edad y frecuentemente los pacientes requieren hospitalización.
- Desnutrición de tercer grado o grave. Es conocida también como desnutrición calórico proteica (DCP), se presenta normalmente en niños lactantes y preescolares, en estos pacientes las reservas nutricionales prácticamente se han agotado, el déficit de peso es mayor al 40%, se producen cambios a nivel somático, funcional y psicológico. En este tipo de desnutrición se distinguen dos tipos clínicos: *Marasmo* y *Kwashiorkor*, aunque algunos autores agregan el tipo *Kwashiorkor marasmático*.

MARASMO

El Marasmo se ocasiona por una dieta baja en proteínas y calorías, normalmente la padecen niños menores de un año. Presentan un desgaste muscular muy marcado con disminución en el contenido de grasa y por lo tanto una pérdida considerable de peso, disminución en el crecimiento, su pelo es aparentemente normal a comparación de los que sufren Kwashiorkor, se puede presentar diarrea y la concentración de proteínas plasmáticas disminuye (Figura 1) (Manocha, 1972).

KWASHIORKOR

En el Kwashiorkor la dieta es principalmente deficiente en proteínas y abundante en carbohidratos, este tipo de desnutrición lo padecen normalmente los niños entre el primer y tercer año de vida (Jelliffe, 1985), en este padecimiento el desgaste muscular es menos evidente que en el marasmo y

tanto el déficit de peso como el retardo en el crecimiento pueden “enmascararse” por la presencia de edema, hay una gran retención de agua (pérdida de potasio y retención de sodio), las proteínas plasmáticas se ven reducidas principalmente en la concentración de albúmina, además hay cambios en la textura, resistencia y color del cabello (Manocha, 1972). La presencia de edema, característico del kwashiorkor, se ha encontrado relacionada con una gran cantidad de grasa y una deficiente capacidad antioxidante en el hígado, por lo que la hipótesis de generación de radicales libres demuestra que la carencia de proteínas es la principal pero no la única causa en el origen de este padecimiento (Figura 2) (Waterlow 1961). Debido a la etiología del kwashiorkor, también ha sido llamado Síndrome Pluricarencial de la Infancia (Icaza y Béhar., 1981), en la actualidad el kwashiorkor es menos frecuente que el marasmo. El tercer tipo de desnutrición llamado kwashiorkor marasmático, se refiere a los casos que presentan síntomas de marasmo pero que además sufren de edema.

CONSECUENCIAS DE LA DESNUTRICIÓN

Cualquier tipo de desnutrición trae consecuencias a corto o a largo plazo, ya que es en los primeros años de vida, específicamente durante la lactancia, cuando el crecimiento corporal es más rápido y los requerimientos nutricionales son mayores, además algunos de los daños causados en este periodo son irreversibles (Ortiz y col., 1999). Al nacer y en los primeros años de vida la desnutrición se manifiesta principalmente como falta de peso y/o talla pero estos parámetros pueden recuperarse con una alimentación adecuada ya que el crecimiento del organismo se detiene hasta los 18 años de edad; si la desnutrición persiste, en los niños se observará alta susceptibilidad a infecciones, reducida capacidad de trabajo físico, baja capacidad intelectual y de aprendizaje entre otros (Peña y Bacallao, 2002), incluso la respuesta inmunológica puede verse afectada.



Figura 1. Niño con marasmo
Tomado de Jelliffe, 1985



Figura 2. Niño con kwashiorkor
Tomado de Jelliffe, 1985

SISTEMA INMUNOLÓGICO

Todos los seres vivos están continuamente expuestos a algún tipo de agresión del medio; el destino de un inmunógeno o antígeno que penetra las barreras físicas del sistema inmune innato depende en parte de su ruta de entrada: 1) Si el inmunógeno entra al torrente sanguíneo, pasa hacia el bazo convirtiéndose en el sitio principal de la respuesta inmunitaria, 2) Si el inmunógeno permanece en la piel, se desarrolla una respuesta inflamatoria local que viaja a través de los canales linfáticos aferentes hasta los ganglios 3) Si el inmunógeno llega por las mucosas del aparato respiratorio o digestivo, donde también existe tejido linfoide, se inicia una respuesta inmunitaria que terminará diseminándose en todo el cuerpo, por lo que cualquiera que sea la vía de entrada, siempre habrá una respuesta a nivel sistémico (Daniel y Abba., 1993).

El sistema inmunológico está formado por un conjunto heterogéneo de células que se originan en la médula ósea, donde muchas de ellas maduran y luego migran hacia los tejidos a través de la circulación sanguínea y linfática. Las células blancas del sistema inmunológico derivan de una célula madre o hematopoyética pluripotencial de la cual se desprenden otros 2 precursores: el mielóide que es precursor de granulocitos, macrófagos y mastocitos y el común linfoide que da origen a los linfocitos.

LINFOCITOS

Los linfocitos forman parte de los leucocitos o células blancas, son células pequeñas con poco citoplasma y escasos organelos pero con una gran cantidad de material genético en etapa inactiva, son las células principales del sistema inmunológico (Janeway y col., 2000). Existen dos tipos de linfocitos, los T y los B que reciben su nombre dependiendo del sitio donde hayan llevado a cabo el proceso de maduración ya sea en timo (los linfocitos T) o en médula ósea (los linfocitos B).

La función central del timo es el rearreglo y expresión de los genes del receptor de las células T (TCR) y la selección subsecuente del repertorio de receptores para el antígeno que permite a las células T maduras reconocer antígenos ajenos, pero por lo general, no a los propios. Por medio de grupos de diferenciación (CD, cluster differentiation por sus siglas en inglés) se pueden identificar los diferentes tipos y subtipos de linfocitos. Para ello se utilizan anticuerpos monoclonales que identifican la misma molécula de la superficie celular, esta molécula se designa con las letras CD seguida de un número (Figura 3).

LINFOCITOS T

Los linfocitos T, son esenciales en la respuesta inmunológica mediada por células y se dividen en dos tipos: T CD4⁺ y T CD8⁺. Los linfocitos T CD4⁺ o cooperadores (Th) están especializados en activar a las células efectoras (también conocidas como células citotóxicas) de la respuesta inmunológica, se subdividen en Th1 y Th2, esta diferenciación dependerá de la expresión de moléculas de señalización específicas, sintetizadas por las células presentadoras de antígeno (APC por sus siglas en inglés). Las Th1 participan en la inmunidad celular, activan macrófagos para que destruyan agentes patógenos intracelulares, por su parte las células Th2 activan células B para que produzcan anticuerpos para combatir a organismos extracelulares formando parte de la inmunidad innata. Los linfocitos T CD8⁺ o células citotóxicas también se subdividen en Tipo 1 y Tipo 2, estos tipos celulares se encargan de aniquilar células infectadas por virus por medio de la liberación de gránulos líticos que contienen perforina y granzimas (Janeway y col., 2000).

Durante el proceso de maduración, los linfocitos adquieren la capacidad de reconocer a los antígenos propios del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) e identificarán lo propio y lo extraño o ajeno. El CMH es el segmento de cromosoma que contiene los genes en donde está codificada la información para la síntesis de los antígenos de histocompatibilidad. Las dos moléculas principales del CMH son las de clase I y las de clase II. Las moléculas del CMH clase I están formadas por dos cadenas peptídicas una α y otra β , la cadena α posee un extremo intracelular, otro hidrofóbico transmembrana y uno extracelular que está compuesto por tres dominios ($\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\alpha 3$) cada uno de los dos últimos dominios posee alrededor de 90 aminoácidos y posee un enlace disulfuro. Los dos primeros dominios $\alpha 1$ y $\alpha 2$ tienen secuencias de aminoácidos que pueden variar de un individuo a otro y forman el sitio donde la molécula se une a los determinantes antigénicos extraños. Las moléculas del CMH clase II también posee dos cadenas (una α y otra β), cada una de estas cadenas posee tres segmentos. Los segmentos extracelulares tienen dos dominios de los cuales los dominios $\alpha 1$ y $\beta 1$ de cada una de las cadenas son los que forman el sitio de unión para el oligopéptido que contiene el determinante antigénico. Una vez que los determinantes antigénicos extraños están conjugados a las moléculas de histocompatibilidad clase I ó II, se lleva a cabo la interacción entre la célula que presenta y la que reconoce. Los antígenos de histocompatibilidad clase I y II de las APC, no sólo son reconocidos por el receptor de los linfocitos T sino que, además interaccionan con los antígenos CD8 y CD4 respectivamente (García-Tamayo, 1997; Janeway y col., 2000; Mosmann y Subash, 1996; Rojas, 1996) (Figura 3).

Además del proceso de maduración y diferenciación que presentan los linfocitos en médula ósea o timo, éstos adquieren una serie de marcadores que los distinguen antigénica y funcionalmente de los linfocitos inmaduros y de otros

tipos de leucocitos. Los linfocitos T maduros en sangre periférica se identifican con el marcador CD3, los subtipos de linfocitos cooperadores y citotóxicos se identifican con los marcadores CD4+ y CD8+ respectivamente.

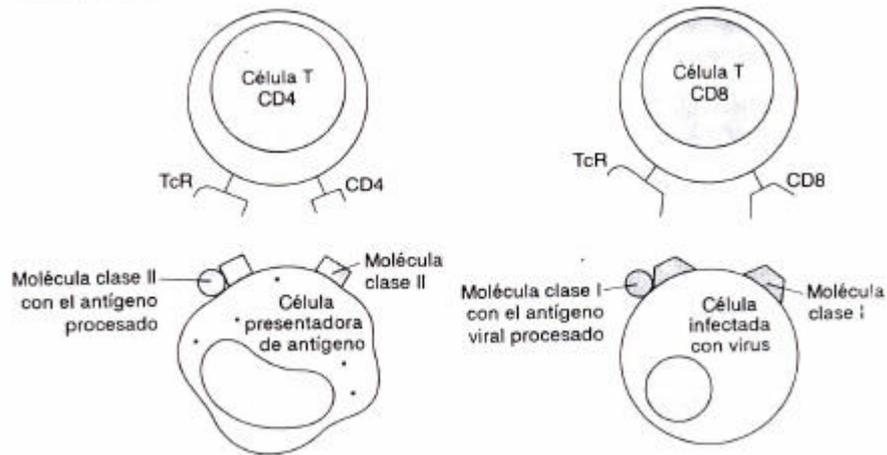


Figura 3. Presentación del antígeno por moléculas del CMH I y II a células T CD8 y CD4 respectivamente y reconocimiento del receptor de células T (TCR). Tomado de Daniel y col., 1993.

LINFOCITOS B

Los linfocitos B maduran en la médula ósea, son las células responsables de la inmunidad humoral, una vez activados, se diferencian a células plasmáticas que tienen como función principal la producción de anticuerpos específicos en contra del antígeno que los estimuló. Se necesitan al menos dos linfocinas producidas por las células Th para que se lleve a cabo el crecimiento y diferenciación de las células B, una es el factor de crecimiento para células B (BCGF por sus siglas en inglés) que junto con el antígeno estimula la proliferación de las células B, la otra es el factor de diferenciación de células B (BCDF por sus siglas en inglés) que induce a estas células a diferenciarse y producir anticuerpos. (Figura 4).

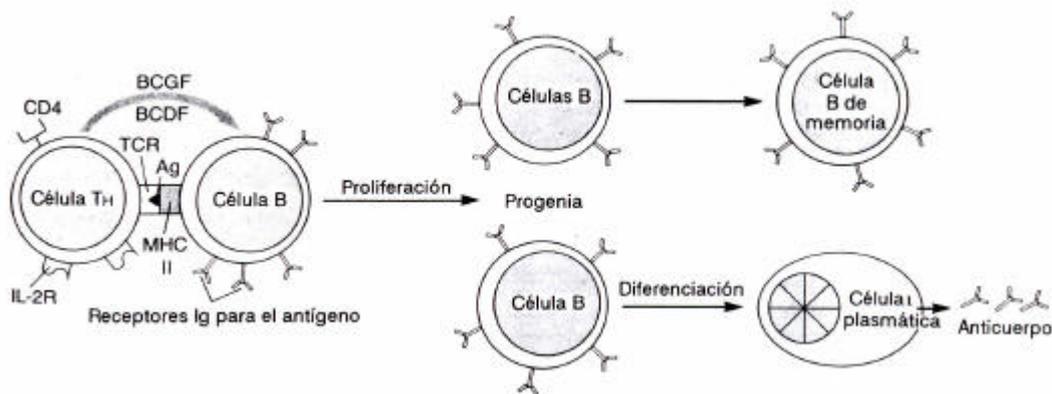


Figura 4. La célula B, presenta el antígeno (Ag) por medio del CMH –II a la célula Th, se activa el receptor de células T (TCR) y esta señal induce la secreción de linfocinas (BCGF y BCDF) por las células Th que estimulan la proliferación de las células B en células plasmáticas para la producción de anticuerpos, otras permanecen como células B de memoria. Tomado de Daniel y col., 1993.

Una vez que los linfocitos terminan el proceso de maduración y diferenciación, entran a la circulación sanguínea y de ahí migran a los órganos linfoides secundarios para ejercer su acción.

ÓRGANOS LINFOIDES

Los órganos linfoides se clasifican en centrales o primarios y periféricos o secundarios. Dentro de los primeros se encuentran el timo y la médula ósea, en ellos se lleva a cabo la maduración de los linfocitos T y B respectivamente. Entre los órganos secundarios donde los linfocitos, previamente madurados, llevan a cabo su función para iniciar la respuesta adaptativa en la cual participan (Guevara y col., 2002), se encuentran:

1. Ganglios linfáticos, órganos altamente organizados donde convergen los vasos colectores de líquido extracelular llamado linfa procedente de los tejidos que después retorna a la sangre. Los vasos aferentes conducen el líquido desde los tejidos y además llevan células con antígenos desde los sitios de infección hasta los ganglios donde son atrapados. Los linfocitos B se localizan principalmente en los folículos y los T en las áreas paracorticales (Guevara y col., 2002).
2. Bazo, este órgano colecta antígenos procedentes de la sangre, está compuesto por pulpa roja con numerosas células sanguíneas y pulpa blanca donde se encuentran los linfocitos.
3. Tejido linfoides asociado al tracto respiratorio e intestinal, está constituido por amígdalas, adenoides, apéndice y placas de Peyer en el intestino delgado (Guevara y col., 2002)

RESPUESTA INMUNOLÓGICA

RESPUESTA POSITIVA Y NEGATIVA

La respuesta del sistema inmunológico puede ser positiva o negativa según sea el origen de los antígenos, éstos pueden ser propios o extraños. Si los antígenos son reconocidos como propios, la respuesta inmunitaria es negativa e implica una tolerancia hacia ellos. En cambio, el reconocimiento de los antígenos extraños generalmente estimula una respuesta positiva que tiene como consecuencia la eliminación de las moléculas que proceden del medio externo o la destrucción de las células que los portan en su citoplasma o adheridas a su membrana.

La inmunización es el proceso de introducir un antígeno al cuerpo y obtener una respuesta inmunológica positiva contra sus determinantes. Los animales inmunizados adquieren inmunidad, o sea, capacidad de eliminar de sus cuerpos las moléculas extrañas que son reconocidas positivamente por los linfocitos, la respuesta de los linfocitos puede ser diferente dependiendo de la población con que participe.

La capacidad de un individuo para mantenerse libre de infecciones depende tanto de su resistencia natural (inmunidad innata) como de la resistencia que pueda desarrollar o adquirir durante su vida (inmunidad específica o adquirida) (Janeway y col., 2000).

INMUNIDAD INNATA

La inmunidad innata está presente desde el nacimiento y a diferencia de la adquirida, comprende elementos no específicos. La piel es la primera línea de defensa contra la penetración de microorganismos. Si ocurre la penetración de algún organismo invasor, la lisozima que está distribuida en las secreciones puede lesionar la pared celular de muchas bacterias, posteriormente ocurre la activación del complemento, la elevación en la concentración de proteína C reactiva y finalmente se considera importante la participación de los macrófagos para lisis y fagocitosis del organismo invasor (García-Tamayo 1997).

INMUNIDAD ADQUIRIDA

La inmunidad adquirida se genera después del contacto con un agente infeccioso y es específica para el mismo. Además, la inmunidad adquirida depende de un sistema celular altamente especializado, los efectores de esta forma de inmunidad incluyen tanto elementos celulares como moléculas solubles (Rojas, 1996).

ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T

Los antígenos son fragmentos peptídicos de proteínas derivadas de agentes patógenos en forma de complejos presentados por moléculas de CMH en la superficie de células infectadas o que han estado en contacto con patógenos o presentadas por APC, la fragmentación del antígeno se lleva a cabo en el compartimiento ácido de la célula y asociado a moléculas clase II del CMH se expresan en la superficie celular donde están al alcance de las células Th, es entonces cuando se inicia la activación de la Th, este evento se identifica por dos sucesos principales uno es la unión del receptor de células T con el complejo antígeno-molécula clase II del CMH sobre las APC y la otra señal proviene de la interleucina 1 (IL-1) secretada por la APC (Figura 5), esto desencadena la liberación de otras citocinas esenciales para la activación de diferentes tipos celulares (Figura 6) (Daniel y Abba, 1993).

Los linfocitos T maduros $CD4^+$ y $CD8^+$ migran a través de la circulación sanguínea hacia los órganos linfoides periféricos, donde ejecutan sus funciones con la ayuda de la expresión de moléculas de comunicación intercelular.

Cuando los linfocitos específicos de antígeno se activan a través de sus receptores (Figura 5), primero experimentan su transformación a blastos y comienzan a aumentar su número exponencialmente por división celular. Esta expansión clonal (Figura 6) permite a los linfocitos, específicos para el antígeno infeccioso, aumentar y predominar sobre otras poblaciones. Después de la expansión clonal, las células T activadas se diferencian a células efectoras, éstas eliminan el patógeno del cuerpo lo cual termina con el estímulo antigénico. Cuando la infección se ha terminado, las células T efectoras activadas ya no son necesarias por lo que inician el proceso de muerte celular (Figura 7) por apoptosis inducido principalmente por medio del receptor Fas de las células T por unión a su ligando Fas (Janeway, 2000).

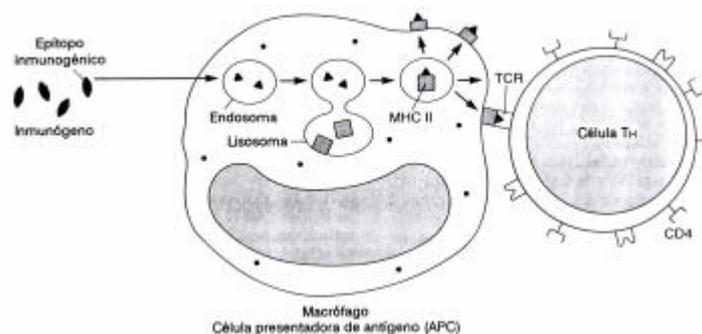


Figura 5. La APC capta y procesa el inmunógeno, el epítipo inmunogénico se asocia con moléculas clase II del CMH, esta molécula se encarga de llevar al inmunógeno a la superficie celular donde está al alcance de la célula Th, la unión del inmunógeno con TCR activa al linfocito. Tomado de Daniel y col., 1993.

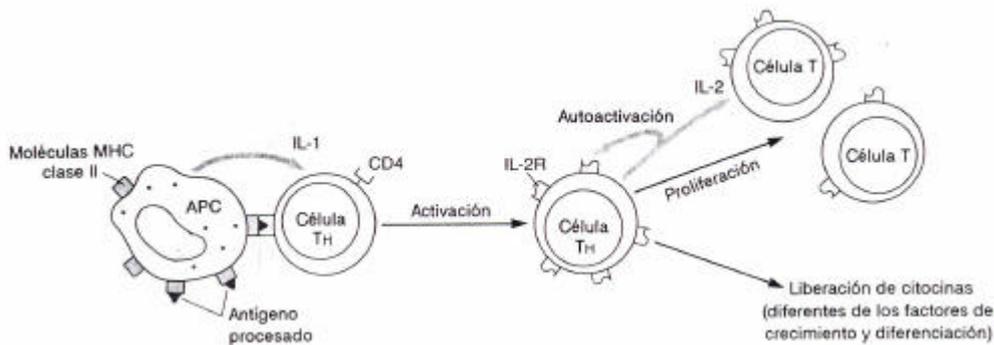


Figura 6. La APC produce IL-1 y le presenta el antígeno o procesado a la Th, ésta se activa y produce IL-2 para la autoactivación de células, por otra parte, se promueve la expansión clonal de los linfocitos y su proliferación. Tomado de Daniel y col., 1993.

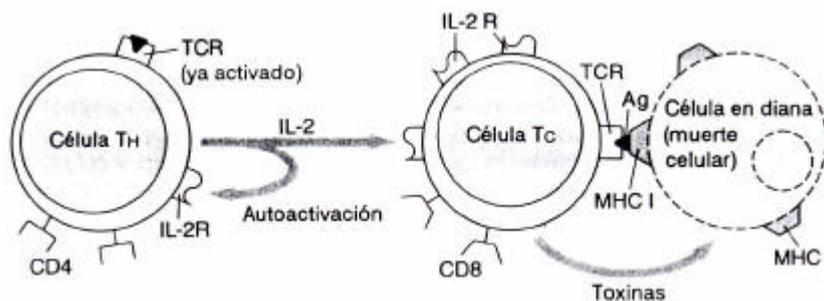


Figura 7. Término del estímulo antigénico e inicio de la muerte celular. La Th activada produce IL-2, mientras que por otra parte, la molécula CMH clase I le presenta el inmunógeno a una célula Tc (o CD8), estas señales activan a la célula CD8 la cual secreta toxinas que matan a la célula diana infectada. Tomado de Daniel y col., 1993.

MECANISMOS DE REGULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA

CITOCINAS

Las citocinas son moléculas de comunicación intercelular sintetizadas por una gran variedad de células del cuerpo entre ellas los linfocitos y macrófagos, son liberadas después de la activación de la célula, modulan las respuestas inmunológica e inflamatoria, regulan el crecimiento, la diferenciación y la movilidad de los leucocitos (Baird y col., 1999). Las principales citocinas en humanos que participan en este proceso son: interferones (IFN) α , β y γ , linfoxina (LT), la familia del factor de necrosis tumoral (TNF α y β) el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), la familia de quimiocinas, e interleucinas (IL) de la 1 a la 23 (Mosmann y Subash, 1996).

FACTOR DE NECROSIS TUMORAL α

Así como existen factores que regulan positivamente la respuesta inmunológica, también existen factores que la regulan negativamente, tal es el caso del TNF α . El TNF α es miembro de la familia de citocinas, regula procesos fisiológicos y del desarrollo, cruciales en la respuesta inmunológica adquirida e innata del huésped incluyendo organogénesis del tejido linfoide periférico y la regulación de células asesinas naturales, además de la diferenciación de linfocitos.

Han sido descritos dos tipos de receptores del TNF (TNFRs), uno de 55kDa (TNF-RI o p55) y otro de 75kDa (TNF-RII o p75), el primero es expresado principalmente en células susceptibles a la acción citotóxica del TNF α y juega un papel crítico en la defensa del hospedero contra microorganismos y sus factores patogénicos, p75 está presente en muchos tipos celulares específicamente de origen mielóide como las células T (Mackay y col., 1994). La mayoría de los efectos biológicos están mediados a través del TNF-RI. Ambos tipos de receptores se encuentran en una amplia variedad de células (Janeway y col., 2000).

Los TNFR se dividen en dos grupos en base a su dominios de señalización citosólicos. Un grupo lo forman los que tienen un dominio de muerte (DD) y activan apoptosis, el otro grupo son los TNFRs que tienen un papel de reconocimiento de péptidos cortos para reclutar factores asociados al TNFR (TRAFs) y activar factores de transcripción como NF κ B. Los TNFR con dominio de muerte más conocidos e implicados en enfermedades inmunes y muerte celular en roedores y humanos son: CD95 (APO-1 o Fas), TNF-R1, DR3 (TRAMP, wsl-1, APO-3, LARD), TRAIL-R1 (ligando inductor de apoptosis relacionados a TNF-R1, también conocido como DR4, APO-2), TRAIL-R2 (DR5, TRICK, KILLER), y DR6; todos inician señalización apoptótica a través del reclutamiento de proteínas adaptadoras con DD como las FADD (Janeway y col., 2000).

CD95 (APO-1 o Fas)

La primera proteína descrita como inductora de apoptosis fue CD95 o Fas. Es una proteína de superficie de 48 kDa que al unirse con su ligando (FasL) induce apoptosis en un amplio grupo de células incluidos los linfocitos T y B activados; esta es la vía de señalización de apoptosis mejor caracterizada y se lleva a cabo activando una serie de proteasas o caspasas que a su vez activan otras proteasas nucleares que inducen la fragmentación del ADN (Ácido desoxirribonucleico) (Janeway y col., 2000), (Figura 8).

La detección de CD95 por medio de citometría de flujo es una técnica rápida y confiable para cuantificar células en apoptosis por medio del uso de anticuerpos monoclonales y fluorocromos. La proteína FITC (Isotiocianato de

fluoresceína), es una molécula que absorbe energía y emite fotones, se une a CD95 en la superficie de la membrana, en el citómetro, una luz de un láser de 480nm incide en la célula previamente marcada con FITC/CD95, las características de la célula hacen que se emitan fotones los cuales se manifestarán con luz fluorescente a una longitud de onda de 530nm.

La célula necesita condiciones adicionales a la expresión de Fas para inducir la señalización de apoptosis, como en los timocitos; estas condiciones adicionales podrían estar relacionadas con la presencia de proteínas específicas que sólo se expresen en las diferentes etapas de desarrollo del individuo o bien en cierto estado nutricional del mismo. Existen trabajos en los que se ha observado que la expresión de células positivas a Fas o CD95 aumenta con la edad. Al comparar linfocitos previamente activados de sangre periférica de individuos recién nacidos de ocho meses de tres y veintiocho años, se observó que, la mayor expresión de Fas la registraron los individuos de veintiocho años (Miyawaki y col., 1992).

MUERTE CELULAR

Para cada estirpe celular, el control del número de células es el resultado de un balance dinámico entre la proliferación y la muerte. La muerte celular es necesaria para mantener el equilibrio entre las poblaciones celulares de los tejidos y puede darse de dos formas, por necrosis o por un tipo de muerte celular programada (Death cell programmed o PCD por sus siglas en inglés) llamado apoptosis.

NECROSIS

La necrosis es el proceso de muerte que se desencadena cuando una célula sufre un daño severo y pierde entre otras cosas la integridad de la membrana y muere por lisis, los daños pueden ser físicos o químicos, por ejemplo por privación de oxígeno como ocurre en un ataque al corazón o por daños en membrana. Los primeros cambios se dan en las mitocondrias, posteriormente se lleva a cabo la disolución de organelos y pérdida del control de la permeabilidad selectiva de la membrana, hay entrada de fluidos que causan edema celular y vesiculación que lleva a la ruptura de la membrana y la subsecuente desintegración celular por la acción de hidrolasas liberadas por la lisis de lisosomas, esto afecta a células contiguas y normalmente desencadena una reacción inflamatoria (Alfaro y col., 2000).

APOPTOSIS

En el organismo, todos los tejidos requieren de especificidad para mantener el balance entre sus poblaciones celulares, por lo que se requiere de un tipo de muerte celular programada.

La apoptosis requiere de la activación de genes específicos para que se lleve a cabo y por esto se le da el nombre de muerte celular programada (Alfaro y col., 2000), ésta, es una muerte fisiológica, se presenta porque el organismo requiere, para su desarrollo, la muerte particular de esa célula o porque la célula sufrió un daño irreparable y la célula muere en beneficio del organismo, por lo tanto, la apoptosis, es crucial en la remodelación de tejidos y se produce durante las diferentes etapas de desarrollo del organismo por lo que tiene un papel muy importante en enfermedades degenerativas (Ramírez y col., 1999).

En el proceso de muerte celular por apoptosis es importante considerar cuatro puntos 1) sus proteínas componentes están expresadas constitutivamente en todas las células animales nucleadas, 2) en su ejecución está involucrada una cascada proteolítica, 3) su activación es controlada por una familia de proteínas reguladoras intracelulares y 4) su activación durante el desarrollo podría frecuentemente ser controlada por la expresión de factores de transcripción (Michael y Miguel ., 1997).

Las principales funciones de la PCD durante el desarrollo de un individuo son cinco: esculpir partes del cuerpo, eliminar estructuras indeseables, controlar el número de células, eliminar células anormales, no funcionales o dañinas y producir células diferenciadas (Figura 8).

Contrario a la necrosis, en la apoptosis, la célula muere por la activación de una serie de mecanismos que dan como resultado cambios de tipo morfológico, bioquímico y funcional de los cuales los principales son:

CAMBIOS MORFOLÓGICOS

- DISMINUCIÓN DEL TAMAÑO CELULAR
- CONDENSACIÓN DE CITOPLASMA
- ENGROSAMIENTO DEL RETÍCULO ENDOPLÁSMICO
- CAMBIOS EN LA MEMBRANA NUCLEAR
- FRAGMENTACIÓN NUCLEAR
- PÉRDIDA DE ESTRUCTURA DE LA SUPERFICIE CELULAR
- FORMACIÓN DE CUERPOS APOPTÓTICOS
- FAGOCITOSIS RÁPIDA
- SIN REACCIÓN INFLAMATORIA

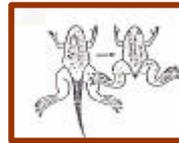
CAMBIOS BIOQUÍMICOS Y FUNCIONALES

- AUMENTO DE Ca^{2+} IÓNICO LIBRE
- INTERACCIÓN ENTRE EL GEN bcl2 Y LA PROTEÍNA BAX
- PÉRDIDA DEL POTENCIAL DE MEMBRANA EN LAS MITOCONDRIAS
- PROTEÓLISIS
- EXTERNALIZACIÓN DE LA FOSFATIDIL SERINA
- PROTEÓLISIS DE LA LAMININA B, TOPOISOMERASA Y PROTEÍNAS REGULADORAS DE LA MITOSIS
- DESNATURALIZACIÓN Y FRAGMENTACIÓN DEL ADN (50-300 kb)

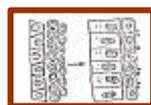
Los linfocitos presentan un proceso de selección positiva y otro de selección negativa que pueden ocurrir en órganos linfoides centrales y periféricos e incluye la inducción de muerte celular por apoptosis, esta selección es esencial para mantener el balance de poblaciones celulares del sistema inmunológico en individuos que sufren alguna alteración de éste.



ESCULPIR



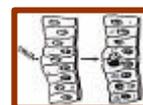
ELIMINACIÓN DE ESTRUCTURAS



AJUSTE DEL
NÚMERO DE
CÉLULAS



SELECCIÓN (+) Y (-)
EN ÓRGANOS LINFOIDES,
HOMEOSTASIS Y ELIMINACIÓN DE LINFOCITOS
AUTORREACTIVOS



ELIMINACIÓN DE
CÉLULAS DAÑADAS

Figura 8. Funciones principales de la muerte celular por apoptosis.
Tomado de Michael y col., 1997.

El proceso de muerte celular por apoptosis se puede dividir en dos fases, en el primer estadio los mediadores génicos y bioquímicos intracelulares se activan para intentar reparar el daño pero si este mecanismo falla, se inicia la muerte celular y se entra en la segunda fase de ejecución donde la célula sufre alteraciones estructurales que conducen a la muerte con la ayuda de una amplia gama de proteasas llamadas caspasas (Ramírez y col., 1999).

CASPASAS

En el proceso de muerte celular programada, la maquinaria efectora de muerte es manejada por una familia de cistein proteasas (Cistein Aspartato Specific ProteASEs o CASPASAS) que cortan las cadenas proteicas ubicadas después de residuos de ácido aspártico. Las caspasas son inicialmente sintetizadas como proteasas citosólicas inactivas las cuales tienen dos dominios uno p10 y otro p20 que en respuesta a estimulación son fragmentados para formar la enzima activa. Las caspasas activas fragmentan muchas proteínas celulares vitales como las de la familia de las Bcl2 o, actúan en varios substratos nucleares como laminina, además de que activan proteolíticamente enzimas

tales como la DNasa DFF40/CAD que contribuyen a la destrucción celular (Janeway y col., 2000).

La fragmentación de proteínas blanco originada por la acción de las caspasas activadas, puede dar como resultado una activación o una inactivación de otra proteína pero nunca la degradación de ésta. Algunos blancos de tales eventos de fragmentación incluyen polimerasas, proteínas de retinoblastoma, lámina nuclear, proteincinasas dependientes de ADN y proteínas implicadas en la replicación del ADN (Alnemri y col., 1996).

Se conocen cerca de una docena de caspasas las cuales pueden participar en tres vías de señalización principalmente: I) Activadoras de citocinas proinflamatorias como es el caso de las caspasas 1, 4, 5, 11, 12, 13, y 14; II) Promotoras de muerte celular o caspasas proapoptóticas, las 2, 8, 9 y 10 y III) Ejecutoras como son la 3, 6 y 7 (Janeway y col., 2000). Otra clasificación de las proteasas es en inductoras y efectoras (ejemplo: caspasas 8 y 3 respectivamente), como su nombre lo indica las caspasas inductoras son las que inician la cascada de señalización una vez que el ligando se une con su receptor, mientras que las efectoras actúan activando otras proteasas que fragmentan el ADN.

El mecanismo de muerte celular donde se involucra la activación de caspasas por la previa activación de los llamados receptores de muerte (por ejemplo: Fas o CD95, TNFR1, DR4, etc.) a través de la unión con sus respectivos ligandos es comúnmente referido como la vía extrínseca de la apoptosis.

VÍA EXTRÍNSECA DE LA APOPTOSIS

Esta vía se inicia cuando el ligando de Fas (FasL) trimerizado, induce la oligomerización de Fas en la superficie de la célula T, este reconocimiento promueve el reclutamiento de un número de proteínas adaptadoras con dominios de muerte que se unen a los dominios de muerte de Fas en particular la proteína FADD (proteína con dominios de muerte relacionada a Fas) que a su vez interactúa a través de un segundo dominio de muerte con la caspasa-8, el paso siguiente se puede dividir en dos vías partiendo ambos de la caspasa-8. Una vía se va hacia la activación de otras caspasas (8, 9 y 3) y culmina con la activación de DNasas activables por caspasas (CAD) que se encuentra en el citosol en forma inactiva unida a una proteína inhibitoria denominada ICAD, cuando esta proteína inhibitoria ICAD es eliminada por la acción de las caspasas, CAD entra al núcleo y corta al ADN en fragmentos alrededor de 200 pares de bases que son característicos de la apoptosis, (Figura 9) (Janeway y col., 2000).

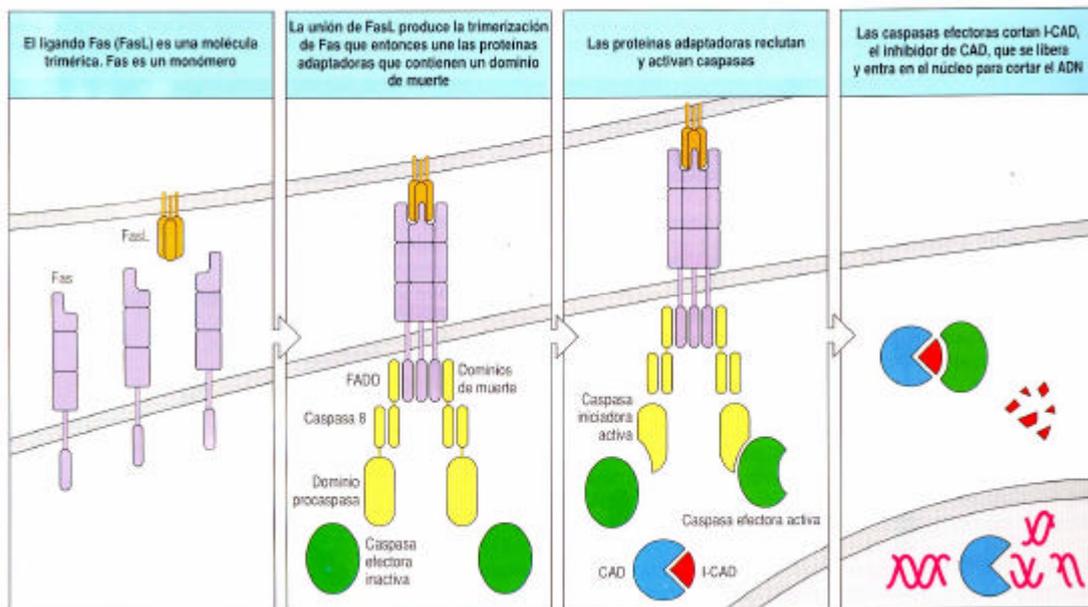


Figura 9. Vía extrínseca de señalización de muerte celular por medio de Fas.

Tomado de Janeway, 2000.

VÍA INTRÍNSECA DE LA APOPTOSIS

La otra vía, referida como vía intrínseca, se lleva a cabo con la participación de la mitocondria, ésta actúa como un punto de control central en muchas formas de apoptosis, esta vía está mediada también por caspasas, después de la activación de la caspasa-8, la mitocondria se hincha y libera citocromo c hacia el citoplasma, este puede unirse al factor estimulador de apoptosis 1 (Apaf-1), la caspasa 9 también se asocia con Apaf-1 promoviendo su activación autoproteolítica. La unión del citocromo c, la caspasa 9 y Apaf-1 forman el complejo llamado apoptosoma. La caspasa 9 subsecuentemente activa otras caspasas incluyendo la caspasa 3 lo cual lleva a la activación de otras proteasas y factores inductores de apoptosis, la caspasa 3 se ancla a un dímero llamado Factor de Fragmentación del Acido desoxirribonucleico y finalmente se comienza la degradación de proteínas, daño en la membrana y fragmentación del DNA con una inminente muerte celular (Janeway y col., 2000).

La supervivencia de los linfocitos se mantiene por un equilibrio entre miembros promotores e inhibidores de muerte de la familia de proteínas Bcl2. Esta homeostasis en la población de linfocitos se mantiene a partir de las señales que los linfocitos reciben continuamente a través de sus receptores de antígeno.

En la vía intrínseca, las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 y Bcl-x_L pueden unirse a la membrana mitocondrial para bloquear el hinchamiento y la salida de

citocromo c y así inhibir el proceso que lleva a la muerte celular (Scaffidi y col., 1999; Peterson y Koretzky, 1998), (Figura 10).

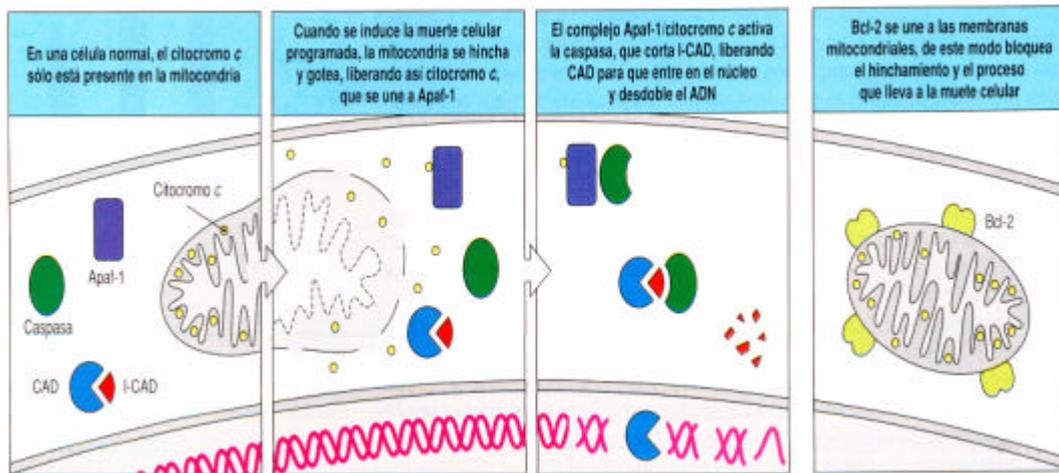


Figura 10. Vía intrínseca de señalización de muerte celular por medio de mitocondria-citocromo c. Tomado de Janeway, 2000.

Al final del proceso de muerte por apoptosis llegan a observarse fragmentos de membrana con restos de citoplasma que forman los cuerpos apoptóticos (Figura11), estos últimos son fagocitados, lo que evita la infección o lesión de otras células y la respuesta inflamatoria (Ramírez y col., 1999) por lo que este tipo de muerte no afecta a células contiguas a menos que se encuentren en la misma situación. En las células del sistema inmunológico la muerte celular por apoptosis es esencial para mantener la homeostasis celular.



Figura 11. Formación de cuerpos apoptóticos

RELACIÓN DESNUTRICIÓN- SISTEMA INMUNOLÓGICO- APOPTOSIS

Desde hace algunas décadas, se ha mostrado interés en estudiar los efectos causados por la desnutrición infantil y las posibles secuelas en la salud y desarrollo posterior del organismo. En México existen varios grupos de investigación que han abordado este padecimiento a diferentes niveles: fisiológico, bioquímico, celular y citogenético.

En la década de los 80, se inició en el laboratorio de Biología Celular de la Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa, un programa con el objetivo

de estudiar los efectos producidos por la desnutrición en los niveles celular y citogenético (Betancourt y Ortiz, 1991). Dentro de los diferentes tipos de células que se han analizado, se han estudiado principalmente a las células del sistema inmunológico. Se ha identificado que la desnutrición es un importante factor de riesgo que predispone a las infecciones que pueden conducir a la muerte. Además, diversas observaciones indican que existe una estrecha relación entre la desnutrición y las infecciones graves (Ortiz y col., 2006).

La alteración del sistema inmunológico aumenta la susceptibilidad a contraer infecciones tanto bacterianas como virales. El riesgo aumenta considerablemente si el individuo padece algún tipo de desnutrición, esto lo puede llevar a la muerte (Redmond y col., 1991) ya que se ha demostrado que la desnutrición afecta a los mecanismos de defensa específica e innata del organismo (Dai y col., 1998). Los estudios en el área inmunológica, se iniciaron con trabajos hechos en individuos que presentaban desnutrición, con una dieta deficiente en proteínas pero rica en carbohidratos (kwashiorkor), en los cuales se presentaban infecciones y la presencia de parásitos (Jelliffe, 1985).

Algunos de los efectos de la desnutrición en la inmunidad innata son: se afecta la producción de células mieloides y su liberación de la médula ósea; se reduce la movilización de células inflamatorias hasta el sitio de lesión; se alteran los procesos de fagocitosis, movilidad y quimiotaxis de neutrófilos; hay una disminución en la producción de citocinas (Simpson y Hoffman-Boetz 1993; Borrelli y col. 1995; Dai y col. 1998), hay una alteración en la secreción de IgA y existe una disminución en la afinidad de anticuerpo.

Ante necesidades inmediatas del organismo, los linfocitos se expanden de forma rápida (Janeway y col., 2000). El proceso de apoptosis en linfocitos es un evento esencial para las propias funciones del sistema inmunológico, consideran este proceso como responsable de la homeostasis de células inmunes y que juega un papel clave en la eliminación de linfocitos autoreactivos (Scaffidi y col., 1999). La evaluación de este proceso permitirá aportar nuevos conocimientos en campos tan importantes como son la inmunología y la desnutrición. Estudios realizados en ratas desnutridas experimentalmente durante la lactancia han mostrado una disminución en el número de linfocitos T en sangre periférica, esta etapa de desarrollo se podría extrapolar a la infancia temprana en niños (Ortiz y col., 1999).

El modelo de inducción de apoptosis con dexametasona en timocitos de ratas desnutridas (con desnutrición grave), se ha utilizado para estudiar el proceso de muerte celular programada. Ortiz y colaboradores (2001) observaron un incremento de la apoptosis espontánea en timocitos de ratas desnutridas en comparación con la observada en ratas bien nutridas, sin embargo la frecuencia de apoptosis inducida con dexametasona fue similar en ambos grupos. En niños nacidos con bajo peso se ha observado que el porcentaje de linfocitos en

apoptosis es de 5 a 12 veces mayor que en linfocitos de niños nacidos con peso normal (Barg y col., 2004).

La desnutrición ya sea ocasionada por deficiencia de proteínas, minerales o vitaminas, afecta los componentes linfoide y epitelial del timo, esto se refleja como cambios en el microambiente del timo y posteriormente en una atrofia de este órgano debida a una disminución de los timocitos inducida por apoptosis, afectando particularmente a los linfocitos inmaduros (Prentice , 1999).

En necropsias de niños desnutridos se determinó la disminución de timocitos por medio de estudios histológicos, ultra estructurales e inmunohistoquímicos en los que se observó un incremento consistente en la red intralobular conteniendo matriz extracelular (MEC), lo cual fue detectado por la densa tinción de reticulina. Esta anormalmente densa red en la matriz extracelular contenía fibronectina, laminina y colágena tipo IV. El aumento de matriz extracelular tímica en individuos desnutridos correlacionó positivamente con el grado de disminución de timocitos. Esta correlación podría presentar una relación causa-efecto en la cual el contacto de timocitos con cantidades anormalmente altas de MEC, dispara o aumenta la muerte celular programada (Lyra y col., 1993).

En estudios con organismos desnutridos se ha demostrado que existe una disminución en el número absoluto y relativo de linfocitos T maduros circulantes (Shenkin y col., 1995) y una disminución más marcada en la población de linfocitos T CD4, también hay una pérdida de las funciones efectora y reguladora de linfocitos T, disminuye la resistencia contra enfermedades infecciosas presentándose una pérdida de reacciones de hipersensibilidad retardada y una reducción de la proliferación inducida por mitógenos y antígenos, aunque este trabajo aporta información al tema, los resultados son controversiales (Dai y col., 1998).

En niños desnutridos con infecciones de tipo bacteriano se han encontrado alteraciones en el número de linfocitos T y B. La proporción disminuida tanto de linfocitos totales como CD4⁺ y CD8⁺ podría ser debida principalmente a la presencia de infecciones, mientras que la incapacidad para incrementar la proporción de linfocitos B se encuentra asociada a la desnutrición (Nájera y col., 2004). El deterioro en el sistema inmunológico podría no sólo deberse a la disminución en el número de linfocitos específicamente de los TCD4⁺ (Dai y col., 1998) sino también o principalmente a la fisiología alterada de estos (González y col., 1997).

La formación de una respuesta protectora de células T contra agentes infecciosos es un proceso complicado en el cual las citocinas y moléculas coestimuladoras proveen señales que dirigen el desarrollo de la inmunidad adaptativa. Se ha visto que en niños desnutridos se afecta la producción de citocinas tipo 1 (IL-2 e IFN γ) y tipo 2 (IL-4 e IL-10), cuando esto sucede, la capacidad de activación de los linfocitos T disminuye lo cual podría estar

involucrado en la deteriorada respuesta inmunológica y por lo tanto una mayor susceptibilidad a infecciones en los niños (Rodríguez y col., 2005).

TÉCNICAS PARA LA DETECCIÓN DE APOPTOSIS

La determinación de la apoptosis está relacionada con diversos parámetros y es necesario considerar diferentes aspectos para elegir el método que se va a utilizar, (Moreno y col., 2000). Para cuantificar este evento se aprovechan algunos de los cambios morfológicos presentes durante el proceso de muerte celular, los métodos más utilizados son los que se muestran en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Métodos para la detección de apoptosis

MÉTODO	DETECCIÓN	NIVEL	MOMENTO
Morfología celular (1)	Cambios en la morfología celular	Individual	Temprano y tardío
Electroforesis de DNA (2)	Degradación internucleosomal	Población	Tardío
Electroforesis de DNA de pulso-campo (2)	Fragmentos de 50 y/o 300 Kpb	Población	Temprano
ELISA para nucleosomas (3)	Degradación de internucleosomas	Población	Tardío
TUNEL (1 y 4)	Marcaje terminal de DNA	Individual	Temprano y tardío
Detección de ploidía (4)	Contenido celular de DNA	Individual	Tardío
Detección de DNA de cadena sencilla (4)	Detección de degradación de DNA	Individual	Temprano y tardío
Detección de la exposición de fosfatidil serina (1 y 4)	Cambios en la simetría de la membrana	Célula individual	Temprano

1) Microscopía óptica o electrónica, 2) Electroforesis, 3) Ensayo inmunoenzimático o ELISA, 4) Citometría de flujo.

El análisis citométrico de la expresión de residuos de fosfatidilserina (PS) en la membrana plasmática, es un método sencillo y rápido que permite cuantificar el evento de apoptosis con la ayuda de anticuerpos monoclonales y fluorocromos.

El marcaje combinado de Anexina V-FITC con yoduro de propidio (IP) se ha utilizado para hacer un marcaje diferencial entre células en apoptosis y células en necrosis. La Anexina V, es una proteína que tiene afinidad por la fosfatidilserina en la superficie celular. La Anexina V marcada con FITC puede unirse a la PS indicando su ubicación, esto permite detectar las células en apoptosis en leucocitos de sangre periférica. La molécula de superficie CD95 se expresa en la membrana de células en apoptosis y por medio del marcaje con FITC se pueden detectar las células que responden positivamente a este marcador ya que FITC emite fluorescencia, la intersección de cada célula con la luz láser provoca la emisión de una serie de señales luminosas que son detectadas, procesadas y almacenadas en el citómetro para su posterior análisis.

El IP, es uno de los fluorocromos más utilizados para marcar ácidos nucleicos,

entra en la célula por un aumento de la permeabilidad de la membrana y se intercala entre las bases de ácidos nucleicos de doble cadena (Figura 12). El IP, es excitado por luz azul dando una fluorescencia roja. El uso del IP permite diferenciar células en situación de apoptosis de células en necrosis (Ormerod, 1994).

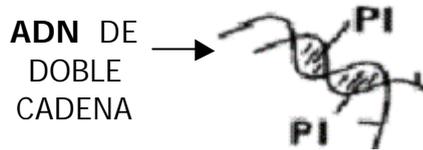


Figura 12. Acción del yoduro de propidio (PI)

Durante el proceso de apoptosis, en la membrana plasmática se expresan residuos de PS se encuentran normalmente en el lado interno o cara citosólica de la membrana, pero durante la apoptosis, se transloca hacia la monocapa exterior, estos fosfolípidos de membrana con carga negativa que son expuestos al exterior son afines al marcaje con moléculas conjugadas con fluorocromos como la Anexina V conjugada con FITC (Figura 13), de esta forma, el porcentaje de células fluorescentes puede cuantificarse fácilmente. Esta técnica es la más aceptada y estandarizada ya que detecta los cambios de fosfolípidos de membrana que aparecen de forma temprana en células apoptóticas (Alfaro y col., 2000).

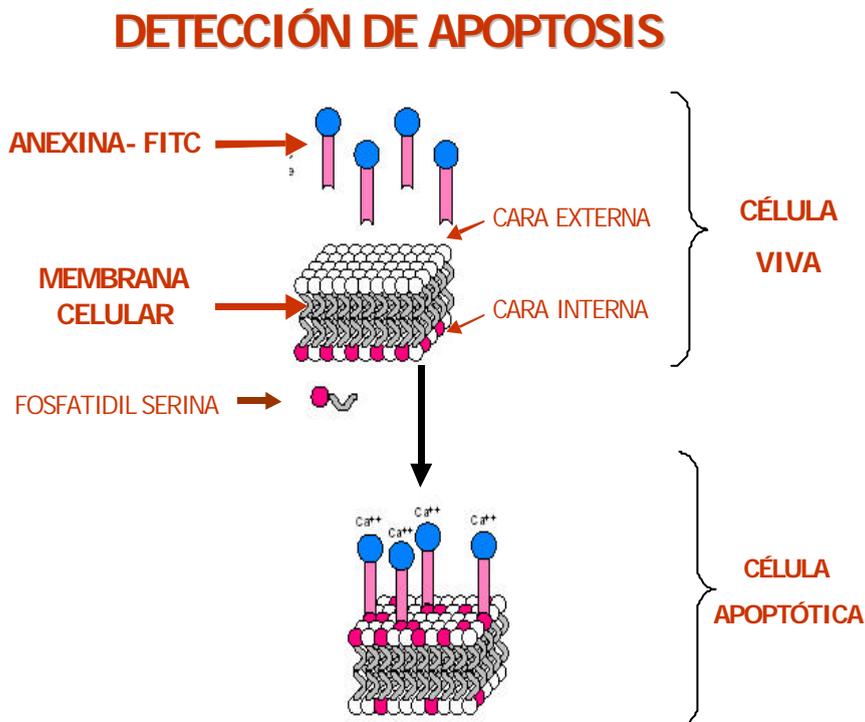


Figura 13. Translocación de fosfolípidos y externalización de la PS



Citómetro de flujo Excalibur

CITOMETRÍA DE FLUJO

El citómetro de flujo (CMF) es un instrumento que cuenta con a) un sistema óptico constituido por la fuente de iluminación, filtros para discriminar la señal lumínica que envían al detector y los fotodetectores que recogen la luz, b) un sistema hidráulico compuesto por la cámara de flujo y el sistema de presión y de inyección de la muestra y c) un componente electrónico que transforma los pulsos de luz detectados por los fotorreceptores en señales analógicas o digitales (Figura 14). Los datos obtenidos con la lectura del citómetro de flujo pueden ser almacenados en forma de histograma o como base de datos, para su uso e interpretación posterior.

La citometría de flujo es una herramienta que permite realizar la medición simultánea de múltiples características de una sola célula. Los CMF analizan células en suspensión que atraviesan de forma individual una fuente de luz. La intersección de cada célula con la luz láser provoca la emisión de una serie de señales luminosas. La luz con desviación frontal (Forward scatter o FSC) y la luz con desviación lateral (Side scatter o SSC). Estos parámetros proporcionan información tanto del área de la superficie celular (tamaño relativo) como de la granularidad (complejidad) de la misma. La posibilidad de realizar un triple o cuádruple marcaje con anticuerpos monoclonales (amc) en una misma muestra, ha permitido profundizar en el conocimiento de las diferentes poblaciones celulares. Además esta técnica es un método rápido, que permite analizar un elevado número de células a la vez (de 10,000 a 50,000) y proporciona un registro computarizado de los resultados. El programa Cell Quest es el más utilizado en citometría para el análisis de resultados, proporciona gráficas de puntos que muestran las poblaciones de interés y permite, entre otras cosas formar regiones para estudiar subpoblaciones celulares (Ormerod, 1994).

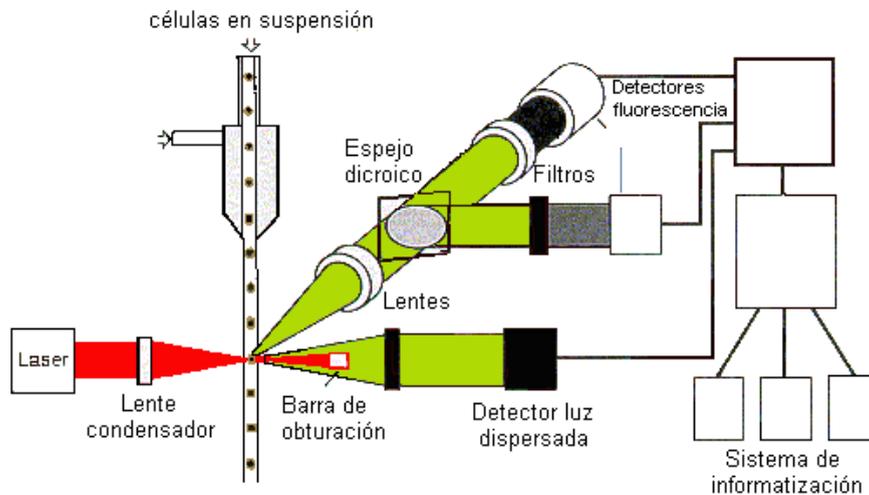


Figura 14. Partes que componen un citómetro de flujo.

En inmunología, la citometría se usa para detección y cuantificación de: antígenos, subpoblaciones de linfocitos T, tipos celulares, estimulación linfocitaria, y cuantificación de citocinas.

Los fluorocromos, son compuestos con anillos que poseen dobles enlaces en su estructura química, la absorción de energía produce que algún electrón excitado pase de un nivel de alta energía a un nivel de baja energía, esto produce que se libere energía, se emita un fotón y calor. La emisión de fotones durante esta transición energética es llamada fluorescencia. Los fluorocromos más utilizados son los que se excitan a 488nm como es el caso de FITC, la ficoeritrina (PE) y la proteína peridina clorofila (PerCP) que emiten en la zona del verde, naranja y rojo, respectivamente.

Se ha demostrado la utilidad de la CMF en el estudio de subpoblaciones linfocitarias, análisis y separación de subpoblaciones de células por medio de anticuerpos monoclonales fluorescentes así como la separación de células vivas y muertas, además de que se puede determinar el fenotipo del linfocito y su activación.

III. JUSTIFICACIÓN

La desnutrición es un problema de salud pública en los países en vías de desarrollo, en nuestro país la prevalencia de este padecimiento es muy alta.

Los estudios sobre desnutrición se han enfocado principalmente a la desnutrición grave, mientras que los otros grados de desnutrición han sido poco estudiados.

Se han observado alteraciones en el sistema inmunológico que se relacionan con una mayor susceptibilidad a infecciones en los niños desnutridos.

Los mecanismos asociados con la deficiente respuesta inmunológica son diversos, se han observado alteraciones en la funcionalidad de los linfocitos así como en el número de linfocitos T y sus subpoblaciones.

Estudios previos han evidenciado variaciones en la frecuencia apoptosis en organismos desnutridos.

Alteraciones en la frecuencia de apoptosis pueden también estar asociadas con las deficiencias en la respuesta inmune.

Existen pocos informes sobre cambios en las moléculas de señalización de muerte celular como el CD95.

El proceso de muerte celular programada incluye cambios morfológicos, bioquímicos y funcionales que pueden ser evaluados con técnicas como la citometría de flujo.

IV. HIPÓTESIS

Dado que la desnutrición altera las poblaciones celulares del sistema inmunológico, las cuales son reguladas mediante muerte celular por apoptosis, entonces se esperaría observar incremento en la frecuencia de apoptosis y alteraciones en la expresión de moléculas inductoras de señalización de muerte celular como el CD95 en linfocitos de sangre periférica de niños desnutridos.

V. OBJETIVO GENERAL

Determinar por medio de citometría de flujo la frecuencia de apoptosis en diferentes subpoblaciones de linfocitos T en sangre periférica de niños bien nutridos, bien nutridos infectados y niños desnutridos con infección.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Establecer la frecuencia de apoptosis en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de sangre periférica de niños bien nutridos (Grupo 1) y niños bien nutridos infectados (Grupo 2) para analizar las posibles diferencias en la frecuencia de apoptosis y expresión de CD95 debidas únicamente a un proceso infeccioso.
- Establecer la frecuencia de apoptosis en linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ de sangre periférica de niños bien nutridos infectados y niños con desnutrición de segundo grado (Grupo 3) y de tercer grado (Grupo 4), ambos con infección asociada, para ver si la desnutrición por si misma tiene algún efecto sobre la frecuencia de apoptosis y la expresión de CD95.
- Evaluar la expresión de CD95 de los linfocitos en los cuatro grupos de estudio mencionados.
- Relacionar la frecuencia de apoptosis con la expresión de CD95 en los cuatro grupos de estudio.

- Determinar si existe diferencia en la frecuencia de apoptosis y la expresión de CD95 dependiendo del grado de desnutrición que presenten los pacientes: de segundo grado o moderada (DN2) con relación a tercer grado o grave (DN3).

VI. METODOLOGÍA

OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

Con jeringas previamente heparinizadas se obtuvo una muestra de aproximadamente 2mL de sangre periférica de niños internados en el Hospital Pediátrico Iztapalapa del Gobierno del Distrito Federal. Se formaron cuatro grupos de estudio que están integrados al menos por seis niños por grupo, todos se encontraron dentro de un intervalo de edad de 6 meses a 5 años sin distinción de sexo. Se excluyeron niños que padecían de cardiopatías, infecciones virales o enfermedades genéticas.

1. Grupo A: Niños bien nutridos (BN) sanos con peso y talla correspondientes a su edad.
2. Grupo B: Niños bien nutridos con infecciones (BNI) bacterianas en vías respiratorias o gastrointestinales que no se encontraron tomando medicamentos con peso y talla adecuados para su edad.
3. Grupo C: Niños con desnutrición de segundo grado (DN2) que presentaron un déficit de peso entre 25 y 39 % con infecciones graves asociadas de tipo bacteriano en vías respiratorias o gastrointestinales
4. Grupo D: niños con desnutrición de tercer grado (DN3), con un déficit de peso mayor al 40% (excepto en niños con kwashiorkor), con infecciones graves asociadas de tipo bacteriano en vías respiratorias o gastrointestinales.

FRECUENCIA DE APOPTOSIS

MARCAJE CON ANEXINA V Y CD95

- ? 600 µL de sangre completa se mezclaron con 4 mL de solución de lisis y se centrifugaron a 200xg durante 5 minutos. Se realizaron dos lavados con PBS con 5% de albúmina sérica bovina (BSA) y se centrifugaron nuevamente a 200xg por 5 minutos.
- ? Se resuspendió el paquete en 600µL de PBS-BSA y se colocaron 100 µL en tubos de poliestireno de acuerdo al cuadro 2.
- ? A los tubos 4 y 5 se les realizó otro lavado con 400 µL de PBS con 5% de BSA y al paquete se le agregaron 10µL de anticuerpos de superficie marcados con PerCP para identificar los linfocitos CD4⁺ o CD8⁺ y 10µL de anticuerpos anti CD95⁺ marcado con PE, se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad, finalmente se realizó un lavado para eliminar el exceso de anticuerpo; mientras tanto, los tubos restantes permanecieron a 37⁰C en una incubadora con CO₂.

- ? Al terminar el tiempo de incubación, a los tubos 3, 4, 5 y 6, se les adicionaron 100 μ L de una mezcla de 20 μ L Anexina-V +1000 μ L de amortiguador Hepes (Hepes 10mM, NaCl 140mM, CaCl₂ 5mM a pH 7.4). A los tubos 2 y 6 se les adicionaron 1.4 μ L IP (a una concentración de 50 μ g/ μ L).
- ? Se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
- ? Se adicionaron 400 μ L de amortiguador Hepes
- ? La marca fluorescente que las células incorporaron se analizó en un citómetro de flujo.

Cuadro 2. Anticuerpos y moléculas conjugadas con diferentes fluorocromos que se utilizaron para la compensación del citómetro de flujo y para la detección de la frecuencia de apoptosis en linfocitos CD4⁺ y CD8⁺.

Tubo 1	Autofluorescencia (Control 1)
Tubo 2	Yoduro de propidio (Control 2)
Tubo 3	Anexina V(FITC) (Control 3)
Tubo 4	CD95(PE)+CD4 ⁺ (PerCP) + Anexina (FITC)
Tubo 5	CD95(PE)+CD8 ⁺ (PerCP) + Anexina (FITC)
Tubo 6	Anexina + IP

Se verificó el funcionamiento del equipo y se realizó la calibración correspondiente con el uso de controles que permiten una calibración más rápida del equipo y la discriminación de las diferentes fluorescencias, posteriormente, se adquirieron 10,000 células de cada una de las muestras utilizando un citómetro de flujo modelo FACScalibur (Becton Dickinson) usando una longitud de excitación de 488nm y un filtro para detectar la emisión de 515nm para la fluorescencia de FITC, IP, PerCP y PE. Todas las muestras se analizaron utilizando el software CELL Quest, este programa proporciona gráficas de puntos que al ser interpretadas indican el porcentaje o índice de fluorescencia de las células que dieron positivas para cada uno de los marcadores.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para evaluar la frecuencia de apoptosis en linfocitos de niños desnutridos y la relación con la expresión de CD95, fueron comparados los porcentajes promedio usando la prueba de Mann Whitney U, para muestras no apareadas, los resultados son expresados como la media y error estándar. Diferencias con una probabilidad $P < 0.05$ fueron consideradas significativas.

VII. RESULTADOS

En este trabajo se estudió la frecuencia de apoptosis por medio de la expresión de la molécula CD95 en linfocitos de sangre periférica de niños BN, BNI, DN2 y DN3. Se analizó un total de 38 niños (9 BN, 14 BNI, 10 DN2 y 5 DN3) de los cuales 24 son del sexo masculino y 14 del femenino. Todos los niños cumplieron con los criterios de inclusión, además, el déficit peso/talla fue determinado de acuerdo a tablas para niños mexicanos (Ramos-Galván, 1976). Las características de los niños se muestra en el Cuadro 3.

El análisis de los datos se realizó de acuerdo a la numeración siguiente:

- 1.- ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA
- 2.- FRECUENCIA DE APOPTOSIS Y NECROSIS TOTAL
- 3.- FRECUENCIA DE APOPTOSIS EN CÉLULAS CD4+ Y CD8+
- 4.- EXPRESIÓN DE CD95

Cuadro 3. Descripción de niños de los diferentes grupos de estudio: GRUPO: BN (Bien nutrido), BNI (Bien nutrido infectado), DN2 (Desnutrido de segundo grado), DN3 (Desnutrido de tercer grado), INICIALES, SEXO (F, femenino y M, masculino), EDAD (en años/ meses), PESO (en kilogramos), TALLA (en centímetros) y TIPO DE INFECCIÓN. ND (indica no determinado) y D. EN H. (Indica que la determinación del déficit la proporcionó el hospital). * Indica que todos los BN y los BN infectados tuvieron un déficit menor al 10%. Los BN no presentaron ningún tipo de infección

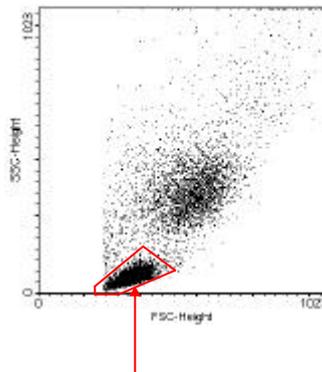
GRUPO	INICIALES	SEXO	EDAD/a.m	PESO/ka	TALLA/cm	DÉFICIT (%)	TIPO DE INFECCIÓN
BN							
	SVB	F	2a	12.2	110	*	
	CAC	M	2a	10	79	*	
	JZP	F	3a	24	98	*	
	EOA	M	3a	17.8	107	*	
	NRM	M	6m	7	ND	*	
	ELG	M	4a7m	18	101	*	
	JDPF	M	2a10m	11.63	99	*	
	JRG	M	4a10m	14.88	111	*	
	ORG	F	1a9m	11.2	95	*	
BNI							
	AMC	M	8m	8.75	46	*	GASTROINTESTINALES
	ARS	M	2a	12	112	*	VÍAS RESPIRATORIAS
	ZBV	F	2a	18	105	*	VÍAS RESPIRATORIAS
	JHE	M	3a	13	98	*	VÍAS RESPIRATORIAS
	RJPS	M	1a 4m	10.6	78	*	VÍAS RESPIRATORIAS
	JASM	M	1a 6m	10.5	85	*	VÍAS RESPIRATORIAS
	FBE	M	9m	9.5	ND	*	GASTROINTESTINALES
	PVC	F	7m	6.9	ND	*	VÍAS RESPIRATORIAS
	SFM	M	2a 3m	10.2	ND	*	VÍAS RESPIRATORIAS
	CJOH	M	2a	10.8	ND	*	VÍAS RESPIRATORIAS
	MJS	M	8m	9.6	65.5	*	VÍAS RESPIRATORIAS
	JRP	M	4a	24.5	103	*	VÍAS RESPIRATORIAS
	JGC	M	3a	14	ND	*	VÍAS RESPIRATORIAS
	OGR	M	1a2m	10.075	ND	*	VÍAS RESPIRATORIAS
DN2							
	RSL	F	10m	5.7	ND	36.31	VÍAS RESPIRATORIAS
	JAS	F	1a 5m	8	ND	27.79	GASTROINTESTINALES
	HCPG	F	5a	13.8	ND	D. EN H.	INDETERMINADA
	ADSB	M	2a 9m	ND	78	D. EN H.	VÍAS RESPIRATORIAS
	NOV	M	6m	5.7	ND	32.2	VÍAS RESPIRATORIAS
	VBL	F	1a	6.6	68	31.25	INDETERMINADA
	MRG	F	7m	ND	66	D. EN H.	VÍAS RESPIRATORIAS
	RHM	M	10m	6.6	74	29.71	INDETERMINADA
	GHP	M	2a	10	82	D. EN H.	INDETERMINADA
	ABS	M	1a1m	7	72	28.2	GASTROINTESTINALES
DN3							
	ERS	M	1a 11m	ND	ND	D. EN H.	ACIDOSIS TUBULAR
	MJS	F	10m	3.9	62	58.46	VÍAS RESPIRATORIAS
	BRV	F	1a9m	6.4	74	45.39	VÍAS RESPIRATORIAS
	NMM	F	9m	5.3	60	41	GASTROINTESTINALES
	CNAL	F	1a9m	5.8	64	39.58	VÍAS RESPIRATORIAS

1.- ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA

La estandarización de la técnica se realizó con un grupo de 4 niños BN Y 5 DN3, el objetivo de la estandarización fue identificar las poblaciones de linfocitos de acuerdo a parámetros como el tamaño y complejidad de los mismos (FSC y SSC respectivamente) y al mismo tiempo poder discriminar a células que se encuentran formando parte de la muestra pero que para nuestros fines no interesan, como son cualquier otro tipo de leucocitos (granulocitos y monocitos). En la figura 15 se muestra la región de linfocitos, esta es base para el análisis de nuestras variables.

Los resultados obtenidos interpretando las gráficas de puntos proporcionadas por el Cell Quest, están basados en el análisis de los porcentajes de las células que dieron positivas para cada uno de los marcadores utilizados. En la Figura 15 se muestra la región de linfocitos identificados como se mencionó anteriormente.

IDENTIFICACIÓN DE LA REGIÓN DE LINFOCITOS



REGIÓN LINFOCITOS

Figura 15. Gráfica de puntos que muestra la identificación de la región de linfocitos.

2) FRECUENCIA DE APOPTOSIS Y NECROSIS

El análisis de la frecuencia de apoptosis se realizó con un número variable en cada grupo. Se estudiaron: 6 niños BN, 14 BNI, 9 DN2 y 5 DN3.

Después de adquirir los 10,000 eventos necesarios, el análisis se inició desplegando una gráfica de puntos (dot plot) de FSC (tamaño) contra SSC (complejidad) para marcar y seleccionar una primera región que identifica a los linfocitos totales. Posteriormente, el porcentaje de las células totales que se encuentran en necrosis y apoptosis se obtuvo graficando Anexina en el eje de las "X" y IP en el eje de las "Y" (Figura 16).

Los porcentajes de células totales ANEXINA+ e IP+ obtenidos para cada uno de los niños estudiados se presentan en Cuadro 4. El análisis de la frecuencia de apoptosis y necrosis total indica que:

Células ANEXINA+ e IP+

- La frecuencia de apoptosis (o células ANEXINA+) fue mayor que la necrosis (o células IP+) en todos los grupos.

Células ANEXINA+

- Los intervalos para las células en apoptosis fueron de 11.4 a 21.3% (Figura 17).
- El grupo de los niños BN presentó, en promedio, una menor frecuencia de apoptosis en comparación con el promedio obtenido para los otros grupos de niños BNI, DN2 y DN3 (11.4, 15.9, 13.4 y 21.3% respectivamente), lo anterior muestra una clara diferencia significativa al comparar el grupo de los BN con el de los DN3 (Figura 17).

Células IP+

- Los intervalos para las células en necrosis fueron de 0.2% en los BNI y los DN3 y de 0.4% para los BN y los DN2 (Figura 18).

APOPTOSIS Y NECROSIS

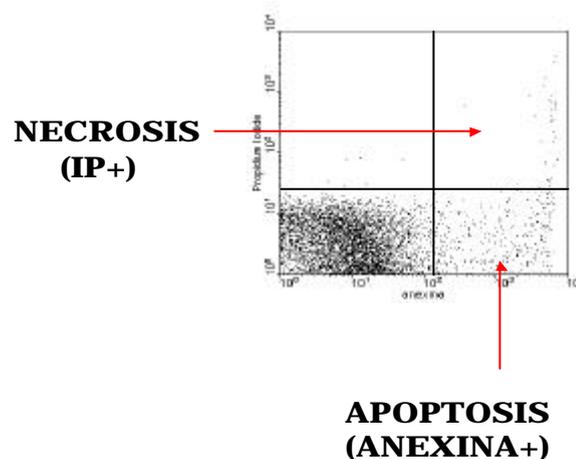


Figura 16. Gráfica de puntos para seleccionar la región de células totales en necrosis y apoptosis

Cuadro 4. Porcentajes de células totales en apoptosis y necrosis

GRUPO	NIÑO	NEC/IP+	APOP/ANEX+
BN			
	SVB	0.29	6.89
	CAC	1.20	8.93
	JZP	0.14	8.17
	EOA	0.06	11.98
	NRM	0.29	21.08
	ELG	0.13	11.44
PROM		0.35	11.42
INTERVALOS		0.06 - 1.20	6.89 - 21.08
ERROR. EST		0.17	2.34
BNI			
	AMC	0.05	7.64
	ARS	0.34	7.31
	ZBV	0.12	9.40
	JHE	0.38	8.57
	RJPS	0.39	24.74
	JASM	0.20	19.50
	FBE	0.05	25.12
	PVC	0.00	10.24
	SFM	0.15	11.27
	CJOH	0.45	21.81
	JRP	0.15	11.31
	MJS	0.02	23.59
	JGC	0.36	28.76
	OGR	0.00	21.79
PROM		0.20	15.92
INTERVALOS		0.00 - 0.45	7.64 - 28.76
ERROR. EST		0.04	2.14
DN2			
	RSL	0.00	6.39
	JAS	0.06	5.72
	HCPG	0.11	7.15
	ADSB	0.77	27.85
	NOV	0.14	18.09
	VBL	0.17	17.94
	MRG	0.04	12.99
	RHM	0.43	11.18
	ABS	0.34	8.34
PROM		0.42	13.41
INTERVALOS		0.00 - 0.77	5.72 - 27.85
ERROR. EST		0.20	3.50
DN3			
	ERS	0.37	15.79
	MJS	0.00	30.30
	BRV	0.21	22.94
	NMM	0.57	19.26
	CNAL	0.00	18.18
PROM		0.23	21.29
INTERVALOS		0.00 - 0.57	15.79 - 30.30
ERROR. EST		0.12	2.53

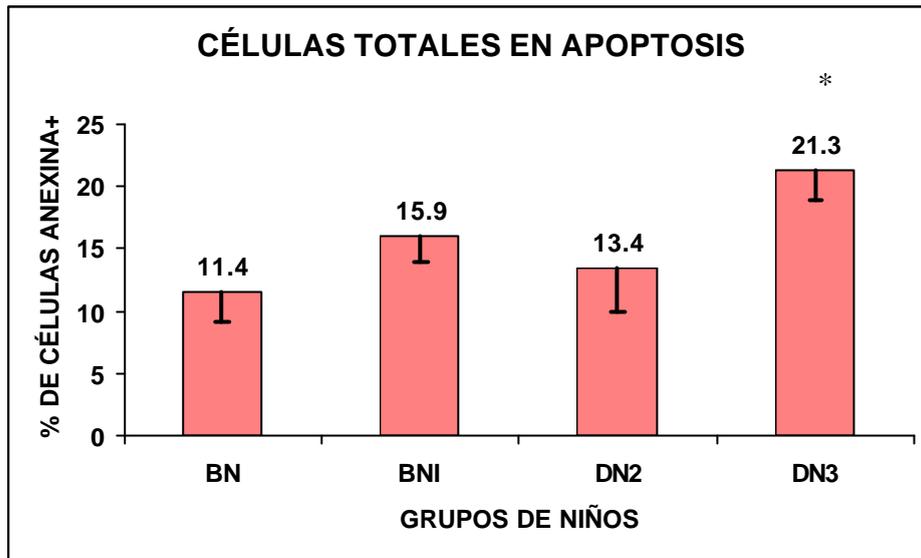


Figura 17. Porcentaje promedio de células totales en apoptosis (ANEXINA+), obtenido de 6 niños BN, 14 BNI, 9 DN2 y 5 DN3.

* Indica que hay diferencia significativa con relación al grupo de los BN.

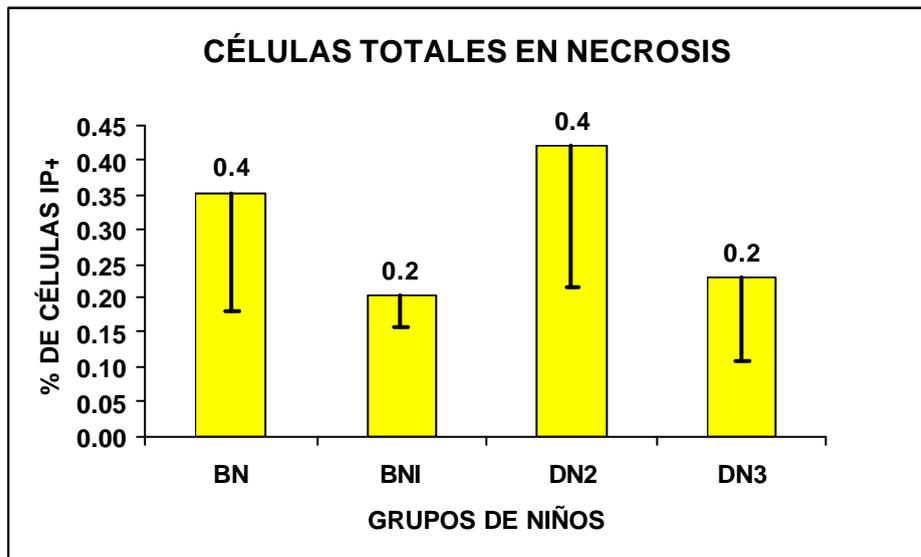


Figura 18. Porcentaje promedio de células totales en necrosis (IP+), obtenido de 6 niños BN, 14 BNI, 9 DN2 y 5 DN3.

3. FRECUENCIA DE APOPTOSIS EN CÉLULAS CD4+ Y CD8+

De la población de linfocitos ubicada por medio de la dispersión lateral y frontal de la luz (descrita en el apartado 1), se construyó una grafica de punto con los parámetros SSC en el eje de las "Y" y CD4 en el eje de las "X", para identificar los linfocitos CD4⁺ totales. A partir de esta grafica se seleccionó una segunda región que incluye solamente a las células CD4⁺. Considerando sólo estas células (CD4⁺) se desplegó una tercera gráfica de punto con las características: Anexina/FITC en el eje "X" y CD4/PerCP en el eje "Y". De esta forma se observan a las células CD4⁺ y Anexina⁺ en el cuadrante superior derecho de la gráfica. La representación de este análisis se muestra en la Figura 19. El mismo procedimiento se realizó para analizar las células CD8⁺ y Anexina⁺ (Figura 20).

Los porcentajes de células CD4⁺ y Anexina⁺ y células CD8⁺ y Anexina⁺ obtenido para cada uno de los niños estudiados se presentan en el Cuadro 5.

ANÁLISIS DE APOPTOSIS EN CÉLULAS CD4+

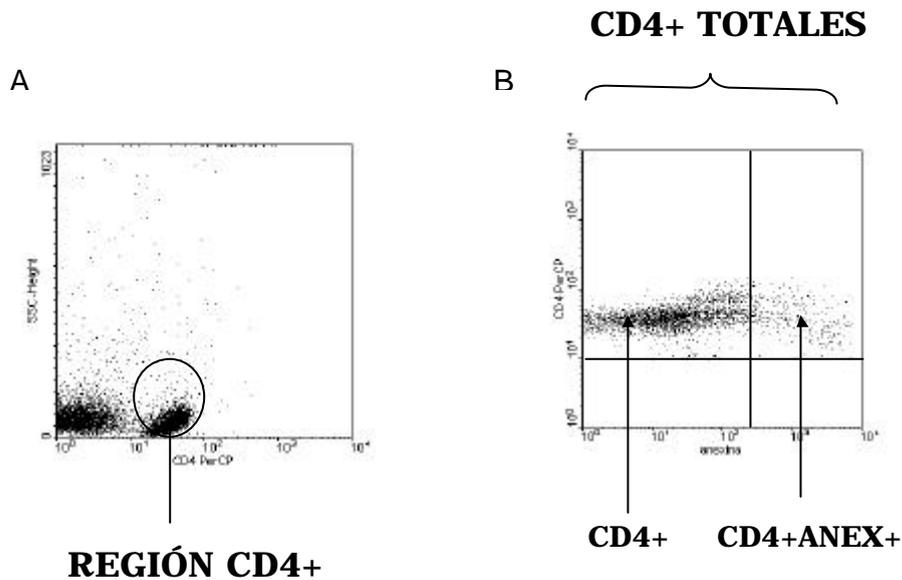


Figura 19. Región de células CD4⁺ (gráfica A) y Porcentaje de células CD4⁺ totales y CD4⁺ANEXINA⁺ (gráfica B).

Análisis de apoptosis en células CD8+

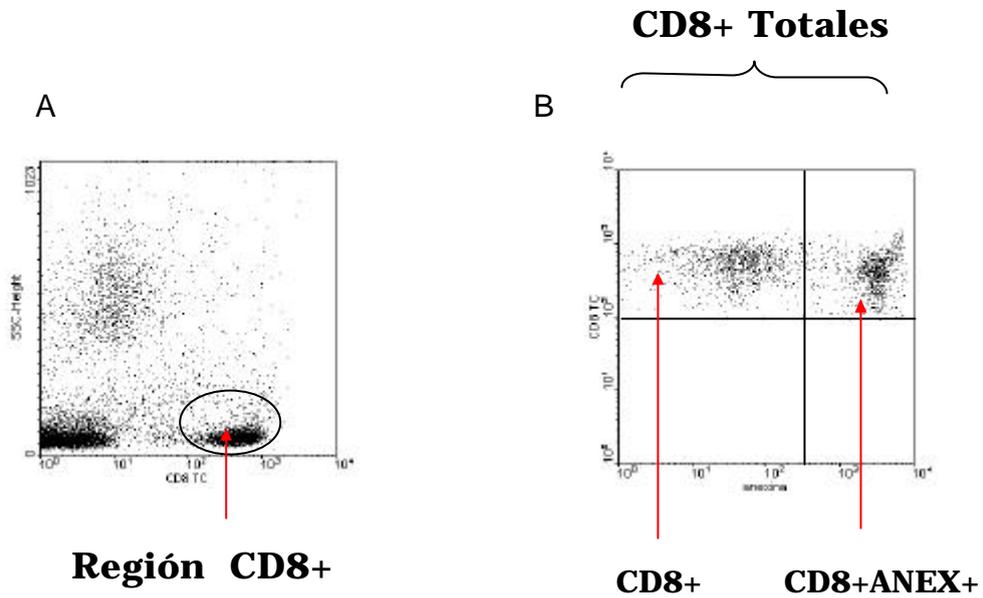


Figura 20. Región de células CD8⁺ (gráfica A) y porcentaje de células CD8⁺ totales y CD8⁺ANEXINA⁺ (gráfica B).

Cuadro 5. Porcentajes de células CD4⁺ y CD8⁺ANEX⁺

GRUPO	NIÑO	ANEX+CD4+	ANEX+CD8+
BN			
	SVB	8.05	21.51
	CAC	11.36	6.48
	JZP	8.10	9.61
	NRM	8.76	6.98
	JDPF	0.95	1.80
	JRG	1.60	4.44
	ORG	0.00	0.00
PROM		6.47	8.47
INTERVALOS		0.00 - 11.36	0.00 - 21.51
ERR. EST.		1.72	2.67
BNI			
	AMC	8.15	8.76
	ARS	7.35	11.15
	ZBV	5.11	7.34
	JHE	7.09	11.82
	RJPS	8.14	8.07
	JASM	6.67	12.55
	FBE	26.94	17.04
	PVC	10.70	16.67
	SFM	8.67	11.26
	CJOH	5.19	6.35
	JRP	2.08	22.01
	JGC	5.05	28.63
	OGR	19.95	27.14
PROM		9.31	14.52
INTERVALOS		2.08 - 26.94	6.35 - 28.63
ERR. EST.		1.87	2.04
DN2			
	RSL	8.31	15.93
	JAS	4.64	4.49
	HSPG	12.67	14.94
	ADSB	22.81	24.38
	NOV	11.4	15.47
	VBL	11.45	15.94
	MRG	10.58	11.98
	RHM	11.94	14.34
PROM		11.73	14.68
INTERVALOS		4.64 - 22.81	4.49 - 24.38
ERR. EST.		1.85	2.45
DN3			
	ERS	14.39	
	MJS	7.40	
	BRV	6.26	32.91
	NMM	7.62	35.73
	CNAL	18.18	35.93
PROM		10.77	34.86
INTERVALOS		7.40 - 18.18	32.91 - 35.92
ERR. EST.		2.34	0.97

Al analizar el porcentaje de células $CD4^+ANEXINA^+$ y $CD8^+ANEXINA^+$ se observa que:

CÉLULAS $CD4^+ANEXINA^+$

El porcentaje promedio de células $CD4^+ANEXINA^+$ fue menor en los BN (5.6%) en relación con los demás grupos, en los cuales se observó un incremento pero poca variabilidad (BNI 9.3%, DN2 11.7% y DN3 10.8%), sin embargo se encontró diferencia significativa entre los grupos de DN2 y BNI al compararlos con el grupo de los BN (Figura 21).

CÉLULAS $CD8^+ANEXINA^+$

Con respecto a las células $CD8^+ANEXINA^+$, los porcentajes promedio fueron, en general, mayores que los porcentajes de células $CD4^+ANEXINA^+$, dicha tendencia se mostró en todos los grupos (Figura 22).

En el grupo de los DN3 se registró el mayor porcentaje de células $CD8^+ANEX^+$ registrando un 34.9% seguido en forma descendente por los DN2, BNI y BN con 14.7, 14.5 y 7.3% respectivamente, además, al comparar el grupo de los niños DN3 con el de los BN, BNI y DN2 se observó una clara diferencia significativa, de igual forma al comparar los BN con los BNI (control de desnutrición) también se observó diferencia significativa (Figura 22).

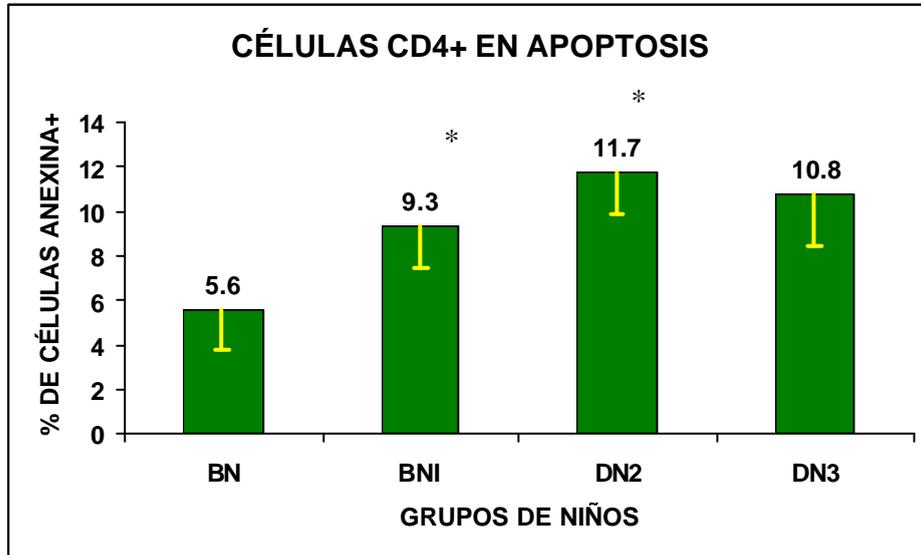


Figura 21. Porcentaje promedio de Células $CD4^+ANEX^+$, obtenido de 7 niños BN, 13 BNI, 9 DN2 y 5 DN3.

* Indica que hay diferencia significativa con relación al grupo de los BN.

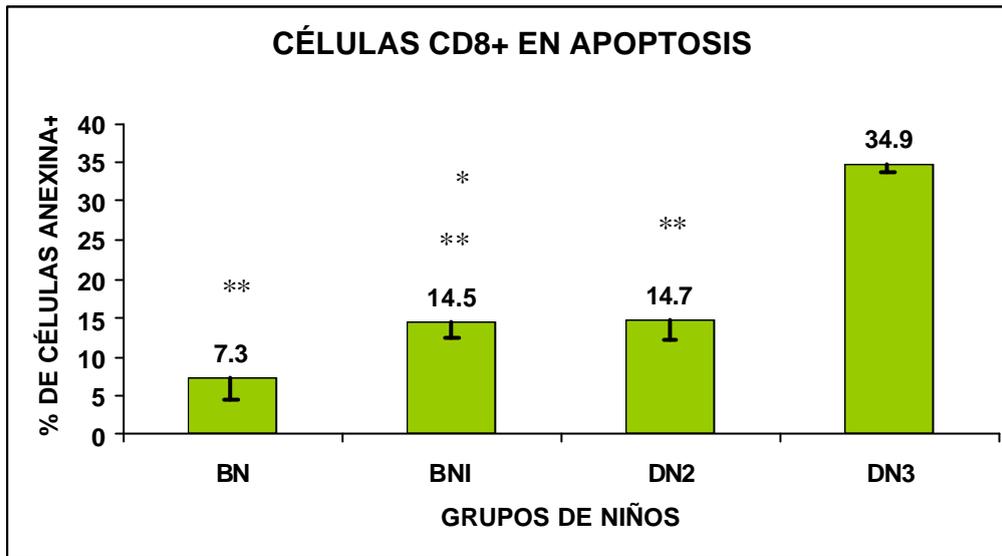


Figura 22. Porcentaje promedio de células CD8⁺ANEX⁺, obtenido de 7 niños BN, 13 BNI, 8 DN2 y 3DN3. * Indica que hay diferencia significativa con relación al grupo de los BN, ** indica que hay diferencia significativa con relación al grupo de los DN3.

4.- EXPRESIÓN DE CD95

Para analizar las células CD4⁺ y CD8⁺ que a su vez responden en forma positiva a CD95, se parte de la segunda región y del tercer Dotplot iniciales, pero en este caso se graficó en el eje de las "Y" CD4 ó CD8, según sea el caso y en el eje de las "X" a CD95, con esta gráfica se obtiene en los cuadrantes superiores derechos el porcentaje de células CD4⁺ y CD8⁺ que están respondiendo positivamente a CD95 (Figura 23). Los porcentajes individuales con pruebas estadísticas se muestran en el Cuadro 6.

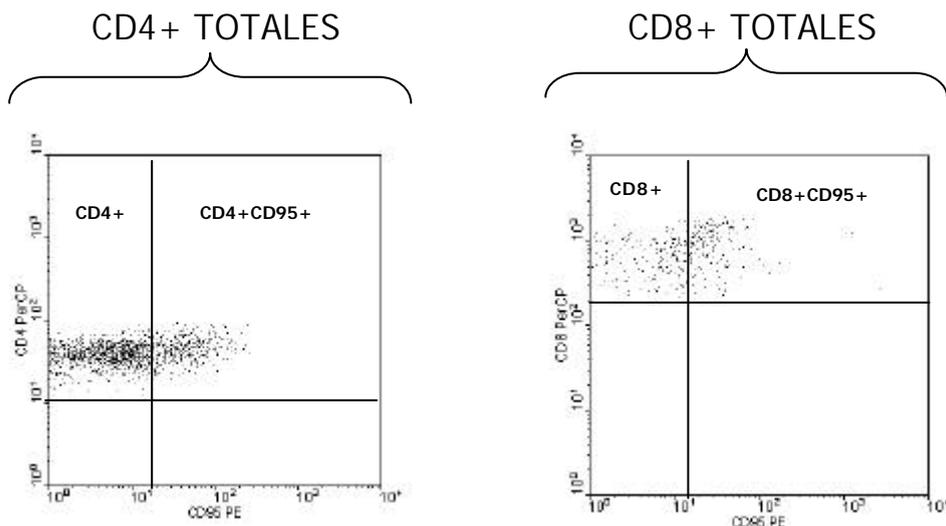


Figura 23. Gráficas de puntos que muestran las células CD95+

Cuadro 6. Porcentajes de células CD4+ y CD8+CD95+

GRUPO	NIÑO	CD95+CD4+	CD95+CD8+
BN			
	NRM	9.90	7.12
	JDPF	2.99	3.40
	JRG	1.59	3.35
	ORG	2.16	0.20
PROM		1.88	1.78
INTERVALOS		1.59 - 9.90	0.20 - 7.12
ERR. EST.		1.93	1.41
BNI			
	PVC	11.07	5.56
	SFM	8.50	3.15
	CJOH	3.17	1.81
	JRP	8.04	2.49
	JGC	11.72	11.22
	OGR	15.48	22.19
PROM		9.66	7.74
INTERVALOS		3.17 - 15.48	1.81 - 22.19
ERR. EST.		1.70	3.20
DN2			
	MRG	9.65	5.99
	RHM	7.07	4.39
	GHP	17.55	8.21
PROM		11.42	6.11
INTERVALOS		9.65 - 17.55	4.39 - 8.21
ERR. EST.		3.15	1.10
DN3			
	MJS	16.36	17.42
	BRV	39.37	15.34
	NMM	17.01	10.94
	CNAL	12.05	15.06
PROM		21.20	14.69
INTERVALOS		12.05 - 39.37	10.94 - 17.42
ERR. EST.		6.15	1.35

Las células que se encuentran en apoptosis son susceptibles a presentar marcadores de membrana como el CD95, el porcentaje de la expresión de esta molécula inductora de señales de muerte, debe estar relacionado con lo obtenido al cuantificar la frecuencia de apoptosis.

Los resultados del análisis de las células positivas a CD95 indican que:

CÉLULAS CD4⁺CD95⁺

- El grupo de BN registró el menor porcentaje de células CD4⁺CD95⁺ siendo este de 4.2 %.
- Los BNI y los DN2 mostraron un comportamiento similar en el porcentaje de células positivas a CD95 (9.7 % y 11.4% respectivamente). Sin embargo se encontró diferencia significativa al comparar el grupo de los BN y BNI con el de los DN3 (Figura 24).

- El grupo de los DN3 obtuvo el mayor porcentaje de células CD95⁺ en el subtipo celular CD4⁺ (21.2%) mostrando diferencia significativa al compararlos con el grupo de los BN y los BNI (Figura 24).

CÉLULAS CD8⁺CD95⁺

- Al igual que en el análisis de células CD4⁺CD95⁺, el grupo de BN registró el menor porcentaje de células CD8⁺CD95⁺ (3.5%), este mismo comportamiento lo siguieron el grupo de los BNI y DN con 7.7 y 6.1 % respectivamente al compararlos con los BN.
- El grupo de los DN3 obtuvo el mayor porcentaje de células en células CD8⁺ CD95⁺ en células CD8⁺CD95⁺ (Figura 25) mostrando diferencia significativa al compararlos con el grupo de los BN.

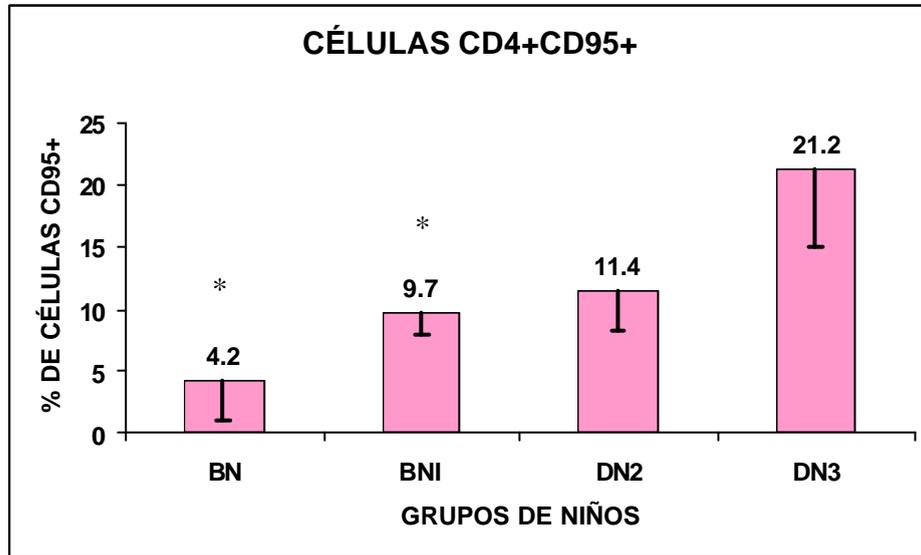


Figura 24. Porcentaje promedio de células CD4⁺ y CD95⁺, obtenidos de 4 niños BN, 6 BNI, 3 DN2 y 4 DN3

* Indica que hay diferencia significativa con relación al grupo de los DN3.

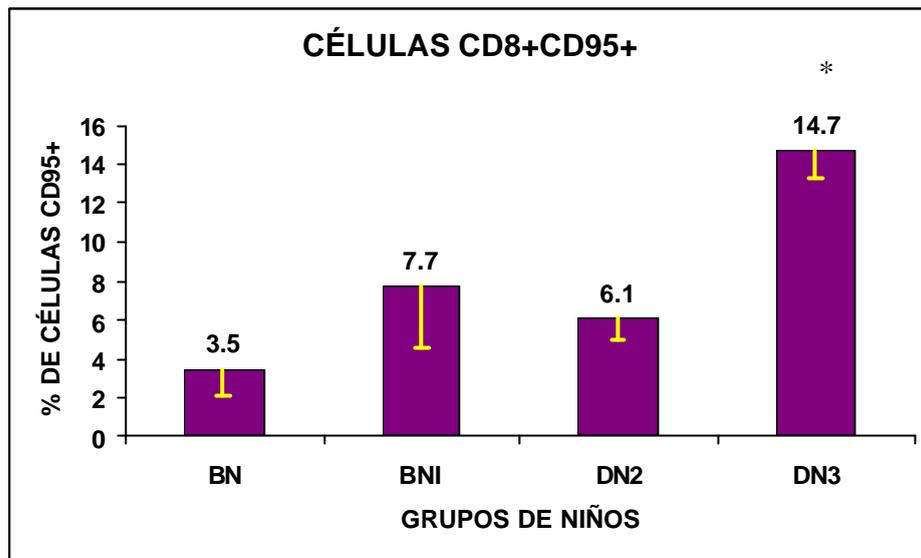


Figura 25. Porcentaje promedio de células CD8⁺ y CD95⁺, obtenidos de 4 niños BN, 6 BNI, 3 DN2 y 4 DN3.

* Indica que hay diferencia significativa con relación al grupo de los BN, BNI y DN2

VIII. DISCUSIÓN

1) FRECUENCIA DE APOPTOSIS Y NECROSIS TOTAL

La desnutrición ya sea ocasionada por proteínas, minerales o vitaminas afecta los componentes linfoides y epitelial del timo lo cual se refleja como cambios en el microambiente y posteriormente en una atrofia de este órgano debida a una disminución de los timocitos. Después de la atrofia del timo, disminuye la producción de hormonas tímicas, críticas para la diferenciación de los linfocitos T, especialmente en la desnutrición calórico proteica y deficiencia de zinc (McMurray 1984). La dieta deficiente (sea moderada o severa) de nutrientes, altera extremadamente la respuesta inmunológica mediada por células (McMurray 1984).

La atrofia tímica y la linfopenia, son marcadores inmunológicos de muchas formas de desnutrición (Fraker y col., 2004). Un defecto en la diferenciación y maduración de los linfocitos, puede verse reflejado en el número de estas células en sangre periférica, por lo que podría haber una alteración en el número de los linfocitos T y sus subtipos. La disminución en la celularidad del timo, es inducida por apoptosis, afectando particularmente a los linfocitos inmaduros.

La apoptosis o muerte celular programada ocurre bajo condiciones fisiológicas, es un proceso que requiere de la participación activa de la célula para el mecanismo de suicidio de la misma, está regulado por un programa genético intrínseco. Uno de los estímulos más importantes es el descontrol nutricional

debido a su profundo impacto en el desarrollo, crecimiento, función inmunológica y la salud (Fraker y col., 2004 y Sen., 1992). La apoptosis ha sido implicada como un importante mediador en la inmunosupresión observada en estados severos de enfermedad (Rivadeneira y col., 2001).

Considerando lo anterior, es prudente decir que, un mejor entendimiento en la relación entre deficiencia nutricional y procesos apoptóticos podrían ayudar a aclarar algunos efectos a largo plazo de la desnutrición (Prentice, 1999).

En este trabajo, como primer punto, se analizó la frecuencia de apoptosis y necrosis totales en linfocitos de sangre periférica de niños BN, BNI, DN2 y DN3 con infecciones asociadas de tipo bacteriano, excepto en los BN. Los resultados demuestran que la frecuencia de apoptosis total es hasta veinte veces mayor que la frecuencia de necrosis total, dicha tendencia se mantuvo en todos los grupos de estudio. Al realizar el análisis por grupo, se encontró que el grupo de los BN presentó la menor frecuencia de apoptosis comparado con los BNI, DN2 y DN3 ($p < 0.05$). En el grupo de los DN3, la frecuencia de apoptosis fue la más alta lo cual, comparado con lo obtenido en el grupo control de niños BN, muestra una clara diferencia significativa. Por otro lado, comparando los DN3 con el grupo de los BNI que es el grupo control para descartar a la infección como inductora de la alta frecuencia de apoptosis, el porcentaje de células ANEX+ sigue siendo mayor en los DN3, lo que nos hace pensar que, es la desnutrición por si misma la que está originando la alta frecuencia de apoptosis y no el estado infeccioso.

Uno de los primeros trabajos que relaciona la frecuencia de apoptosis con desnutrición es el realizado por Ortiz y colaboradores (2001), en el cual observaron incremento de la apoptosis espontánea en timocitos de ratas con desnutrición grave en comparación con la observada en ratas bien nutridas.

La desnutrición afecta diferentes tipos de células y tejidos, Nodera y col. (2001) encontraron altas frecuencias de apoptosis en diferentes tejidos de rata con dietas deficientes en zinc. Estos investigadores demuestran que en tejido de testículo, timo y piel, la apoptosis fue mayor comparada a lo encontrado en las ratas que sí consumieron zinc; en el tejido de riñón, se vio que la muerte celular por apoptosis se mantuvo dependiente de la cantidad de zinc ingerida y en tejido de esófago no se encontró una relación entre la frecuencia de apoptosis y la ingesta de zinc.

Por otro lado, Bodiga y col. (2005) encontraron que la privación crónica de proteínas o vitaminas incrementa la apoptosis de células del epitelio intestinal en ratas, ellos demuestran que la restricción de proteínas y vitaminas pero no la restricción de alimento, incrementó significativamente la apoptosis de células del epitelio intestinal y sólo la restricción de vitaminas también afectó la estructura y función de las vellosidades del intestino. Del mismo modo, Rivadeneira y col. (2001) encontraron que, ratones con desnutrición calórico proteica, registran

porcentajes mayores de apoptosis en macrófagos del peritoneo que los porcentajes encontrados en el grupo control.

También previamente se demostró que en ratones con deficiencia de zinc, la apoptosis fue aumentada de 50 a 300% en células pre-T (CD4+CD8+) comparados con el grupo control de ratones con dieta no carente de zinc (King y col., 2003).

La alta frecuencia de apoptosis encontrada en este estudio podría ser el resultado de varios eventos originados por la desnutrición. Primero, la atrofia del timo y la alteración de su microambiente, impediría la maduración y posterior diferenciación de los linfocitos tanto en el timo como en el torrente sanguíneo. Segundo, los linfocitos inmaduros no producirían las citocinas necesarias para la activación de otros linfocitos ni de células implicadas en iniciar la respuesta inmunológica como serían los linfocitos T CD4+ y TCD8+, sino que serían sometidos a un proceso de selección que los llevaría a la muerte celular por apoptosis por no cumplir con los requisitos de una célula funcional. Tercero, la falta de linfocitos funcionales o el exceso de linfocitos en proceso de muerte celular en el torrente sanguíneo, originarían una ineficiente respuesta inmunológica y una mayor susceptibilidad a contraer infecciones. Finalmente, en las células en apoptosis seguramente estarán sobre expresados genes apoptóticos como *c-myc* o genes específicos de señales de muerte celular como sería el gen inductor para la producción del ligando de fas (*fas-L*). La expresión de productos de genes involucrados en el proceso de muerte celular por apoptosis ya ha sido reportado (Sen, 1992).

2) FRECUENCIA DE APOPTOSIS EN CÉLULAS CD4+ Y CD8+

En ratas desnutridas durante la lactancia se ha encontrado que hay una disminución en la maduración de células T en tejido linfoide asociado al intestino, así como una disminución en el número de células CD4⁺ y CD8⁺. En 1994 investigadores encontraron una relación entre el porcentaje relativo de células T inmaduras en sangre y un estado moderado de desnutrición (Catherine 1996).

Otros elementos esenciales en la formación de una adecuada respuesta inmunológica son las citocinas y moléculas coestimuladoras. Se ha observado que en niños desnutridos estas moléculas no son sintetizadas de manera normal lo cual reduce la capacidad de activación de los linfocitos T, esto a su vez origina una inapropiada respuesta inmunológica y por lo tanto una mayor susceptibilidad a infecciones en los niños (Rodríguez y col., 2005).

Además, la alteración en la producción de citocinas no permitiría la diferenciación celular de los linfocitos CD4⁺ y CD8⁺. Las células Th1 producen principalmente IL-2, INF γ y linfotoxinas y las Th2 producen IL-4, IL-6 e IL 10. Por otro lado, las células CD8⁺ de tipo 1 producen IL-2 e INF γ y las de tipo 2

producen IL-4, IL-5 e IL-10, estas y otras citocinas producidas por las APC, son necesarias para formar la respuesta inmunológica (Mosmann y col., 1996). Por su función, tanto las células CD4⁺ como las CD8⁺ son de crucial importancia durante una respuesta inmunológica ya que las células CD4⁺ están especializadas en activar a las células efectoras o células citotóxicas, las células Th1, activan macrófagos para que destruyan agentes patógenos intracelulares, las células Th2 activan células B para que produzcan anticuerpos para combatir a organismos extracelulares y por su parte, los linfocitos T CD8⁺ se encargan de aniquilar células infectadas por virus (Janeway y col., 2000).

Algunos de los primeros eventos de la muerte celular por apoptosis como es la externalización de la fosfatidil serina pueden ser aprovechados para la cuantificación de este evento con ayuda del uso de anticuerpos monoclonales y fluorocromos, de esta forma, pudimos determinar el porcentaje de células CD4⁺ y CD8⁺ANEX⁺.

El bajo porcentaje de células CD4⁺ANEX⁺ encontrado en el grupo de los BN confirma en parte su buen esta nutricional, en los grupos restantes el porcentaje de células (CD4⁺ANEX⁺) fue mayor que en los BN lo cual podría ser debido a la desnutrición o al proceso infeccioso. Al analizar este tipo celular en los BNI y DN2 y compararlos con los BN se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) ya que en el caso de los DN2, el porcentaje de células CD4⁺ANEX⁺ fue dos veces más que en los BN. Por su parte, el grupo de los BNI también mostró una diferencia significativa al compararlo con el grupo de los BN, esto último probablemente debido al proceso infeccioso similar al que estuviesen presentando los DN2.

Por otra parte, al analizar el porcentajes de células CD8⁺ANEX⁺ se observó que en general, los porcentajes promedio de este subtipo de células fueron mayores que los de células CD4⁺ANEX⁺, conservándose esta tendencia en todos los grupos. El grupo de los DN3 registró el mayor porcentaje de células CD8⁺ANEX⁺, seguido en forma descendente por los DN2, BNI y BN. En este caso se observó diferencia significativa ($p < 0.05$) en los BN, BNI y los DN2 con respecto al grupo de los DN3., con lo anterior se sustenta la suposición de que la desnutrición es la responsable de la alta frecuencia de apoptosis.

Al comparar el grupo control de los BN con los BNI, también se encontró diferencia significativa entre los grupos, en el porcentaje promedio de células TCD8⁺ y ANEXINA⁺. Lo anterior hace suponer que, en este caso, el proceso infeccioso podría ser el responsable, de la alta frecuencia de apoptosis en este subtipo celular. En casos con inmunodeficiencia variable común (CVID por sus siglas en inglés) se ha registrado alta frecuencia de apoptosis espontánea en células TCD4 así como elevada expresión de CD95 comparadas con las encontradas en organismos sanos (Iglesias y col., 1999), este padecimiento presenta síntomas tales como hipogamaglobulinemia, infecciones recurrentes y

alteración en la producción de anticuerpos, algunos de los cuales se presentan también en organismos desnutridos.

En niños desnutridos y con infecciones de tipo bacteriano se han encontrado alteraciones en el número de linfocitos T y B. La proporción disminuida tanto de linfocitos totales como $CD4^+$ y $CD8^+$ podría ser debida principalmente a la presencia de infecciones, mientras que la incapacidad para incrementar la proporción de linfocitos B, se encuentra asociada a la desnutrición (Nájera y col., 2004).

La alta frecuencia de apoptosis o disminución de los diferentes subtipos de linfocitos en el torrente sanguíneo podría estar siendo el responsable del deterioro en el sistema inmunológico y esto podría no sólo deberse a la disminución en el número de linfocitos específicamente de los $TCD4^+$ (Dai y col., 1998) sino también o principalmente a la fisiología alterada de estos (González y col., 1997).

3) EXPRESIÓN DE CD95

La molécula de superficie CD95 o Fas es un indicador específico de señalización de muerte celular por apoptosis por medio de la vía de activación de caspasas y se utiliza para descartar cualquier otra vía de señalización de muerte celular.

Anteriormente a este trabajo, Barg y colaboradores (2004), encontraron una alta frecuencia de apoptosis en niños nacidos con bajo peso detectada mediante los porcentajes de células positivas a Fas.

Al analizar las células positivas a este marcador (CD95) se observó que el grupo control de BN registró el menor porcentaje de células tanto $CD4^+$ como $CD8^+CD95^+$. Los BNI y los DN2, se incrementaron en relación a los BN. El grupo de los DN3 obtuvo el mayor porcentaje de células $CD95^+$ en ambos subtipos celulares. Se registró diferencia significativa entre los BN y los BNI con respecto a los DN3 en el análisis de células $CD4^+CD95^+$ y entre los BN con respecto a los DN3 en el análisis de células $CD8^+CD95^+$. Lo anterior coincide con la información obtenida al analizar las células en apoptosis (positivas a anexina) en estos subtipos celulares lo cual nos muestra una relación directa entre el grado de desnutrición y la frecuencia de apoptosis. Considerando lo obtenido en los grupos de niños BNI se puede decir que es la desnutrición y no la presencia de infecciones, el principal inductor de esta alta frecuencia de apoptosis.

Se ha encontrado que la desnutrición tiene efectos adversos sobre diferentes tipos celulares, sin embargo aún no se conoce cómo repercuten en el desarrollo y la salud posterior del organismo, ni cuales son los factores principales relacionados con las alteraciones observadas (Ortiz y col., 2006).

Considerando que la desnutrición trae problemas no solo de tipo nutricional sino políticos y sociales, se propone que se continúen realizando estudios en esta área utilizando técnicas como las aquí empleadas y con otro tipo de ensayos para contar con mayor información relacionada con los efectos asociados a la desnutrición a nivel celular y genético

IX. CONCLUSIÓN

La alta frecuencia de apoptosis en el número de células T maduras en sangre periférica, podrían impedir que éstas células se activen y lleven a cabo su función, esto originaría una inadecuada formación de la respuesta inmunológica en los niños desnutridos lo cual disminuye la capacidad de estos individuos para responder a una infección.

En este trabajo se comprobó que el grado de desnutrición en niños está relacionado con una mayor frecuencia de apoptosis de linfocitos TCD4⁺ y TCD8⁺ cuantificada por medio de la expresión de moléculas inductoras de muerte como el CD95. Por lo tanto, la alteración en el número de las células responsables de formar una adecuada respuesta inmunológica, se ve reflejada en una mayor susceptibilidad a contraer infecciones en los niños desnutridos.

Se encontró que existe una relación directa entre el grado de desnutrición, la frecuencia de apoptosis y la expresión de CD95 en los subtipos celulares CD4⁺ y CD8⁺. El grupo de los niños con el mayor grado de desnutrición (DN3) mostró la mayor frecuencia de apoptosis de leucocitos además presentaron la mayor frecuencia de apoptosis en células CD8⁺ así como la mayor expresión de CD95 en células CD4⁺ y CD8⁺, por su parte, los DN2 tuvieron la mayor frecuencia de apoptosis en células CD4⁺.

Los porcentajes de células en apoptosis y expresión de CD95 encontrados en el grupo de los BNI fueron menores que en los DN2 y los DN3 pero fueron mayores que en los BN, lo cual permitió considerar directamente a la desnutrición como la responsable de la alta frecuencia de apoptosis por medio de la expresión de CD95.

X. BIBLIOGRAFÍA

Alfaro EM, García CC y Dueñas AG. (2000). Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. *Rev Inst Mex Cancerol.* 46:275-280.

Alnemri, ES., Livingston, D.J., Nicholson, D.W., Salvesen, G., Thornberry, N.A., Wong, W.W., and Yuan, J. (1996). Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell* 87:171.

Ávila CA, Shamah L.T, Galindo G C, Rodríguez H G y Heredia L M. (1998). La desnutrición infantil en el medio rural mexicano. *Salud Pública Mex.* 40:150-160.

Barg E, Gasiorowski K, Brokos B, Swiedrych and Skórkowska K. (2004). A high frequency of apoptosis was found in cultures of lymphocytes isolated from the venous blood of children born with a low birth weight. *Cell Mol Biol Lett.* 9:135-143.

Betancourt, M, y Ortiz R . (1991). Efectos de la desnutrición severa en el nivel citogenético. *Ciencia.* 42: 367-373.

Bodiga VL, Biondala S, Putcha U, Subramaniam K and Manchala R. (2005). Chronic low intake of protein or vitamins increases the intestinal epithelial cell apoptosis in Wistar/NIN rats. *Nutrition,* 21:949-60.

Borrelli P, Mariano M and Borojevic R. (1995). Protein malnutrition: effect on myeloid cell production and mobilization into inflammatory reactions in mice. *Nutr Res* 15:1477-1481

Chandra RK. (1991). Nutrition and immunity lessons from past and new insights into the future. *Am J Clin Nutr.* 53:1087-1101.

Chevalier P, Sevilla R, Zalles L, Sejas E, Belmonte G, Parent G and Jambon B. (1996). Immuno-nutritional recovery of children with severe malnutrition. *Sante* 6:201-208.

Dai G, Phalen S and McMurray N. (1998). Nutritional modulation of host responses to mycobacteria. *Fronti Biosci,* 110-122.

Daniel PS y Abba IT. (1993). *Inmunología básica y clínica.* Ed. Manual Moderno, México D.F, capítulos, 3, 5, 7 y 16.

Gómez P L, Girón T J y Briones E C. (2003). La desnutrición y sus consecuencias sobre el metabolismo intermedio. *Rev Fac Med UNAM,* 46:32-36

García-Tamayo F. (1997). Fundamentos de inmunología. Fac de Quim UNAM. México Primera edición, 35-384.

Gómez F. (2003). Desnutrición. Salud Pública de México. 45, Suplemento 4:S576-S582.

Gómez F, Ramos-Galván R, Frenk S, Cravioto J, Chávez R and Vázquez J. (1956). Mortality in second and third degree malnutrition. J Trop Pediat. London. 2:77-83.

González C, Rodríguez L, Bonilla E, Betancourt M, Siller N, Zumano E and Ortiz R. (1997). Electrophoretic analysis of plasmatic and lymphocyte secreted proteins in malnourished children. Med Sci Res 25:643-646.

González C, Nájera O, Cortés E, Betancourt M, Toledo G, Zumano E, López L and Ortiz R. (2002). Susceptibility to DNA Damage Induced by Antibiotics in Lymphocytes From Malnourished Children. Terat Carcinog Mutag 22:147-158.

Guevara RM y Castellanos MR, Robinson RR, Vázquez RL. (2002). El sistema inmune en los estados de salud y enfermedad. MEDISAN 6:60-68.

Icaza J. S and Béhar M. (1981). Nutrición. Segunda edición. McGraw-Hill Interamericana, México D. F. 99-123.

Iglesias J, Matamoros N, Raga S, Ferrer JM and Mila J. (1999). CD95 expression and function on lymphocyte subpopulations in common variable immunodeficiency (CVID); related to increased apoptosis. Clin Exp Immunol 117:138-146.

Janeway CA, Travers P, Walport M y Capra D. (2000). El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. Edit. Masson, Barcelona 115-136.

Jellife D. (1985). Nutrición infantil en países en desarrollo. Edit. Limusa, México D.F, 95-126

King LE, Osati-Ashtiani F and Fraker PJ. (2002). Apoptosis plays a distinct role in the loss of presursors lymphocytes during zinc deficiency in mice. J Nutr. 132:974-979.

Lesourd BM and Mazari L (1997) Inmune responses during recovery from protein-energy malnutrition. Clini Nutri 16(Suppl1):37-46.

Lyra FS, Madi K, Maeda CT and Savino W. (1993). Thymic extacellular matrix in human malnutrition. J Pathol 171:231-236.

McMurray DN. (1984). Cell-mediated immunity in nutritional deficiency. *Prog Food Nutr Sci*, 883:193-228.

Manocha. (1972). Malnutrition and retarded human development. Publish. C. Thomas. N. Y. 350.

Michael DJ, Miguel W and Martin CR. (1997). Programmed Cell Death in Animal Development. *Cell*, 88:347-354.

Miyawaki T, Uehara T, Nibu R, Tsuji T, Yachie A, Yonehara S and Taniguchi N. (1992). Differential expression of apoptosis-related Fas antigen on lymphocytes subpopulations in human peripheral blood. *J Immunol* 149:3753-3758.

Moreno AE, Cuéllar GC y González DA. (2000). Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. *Cancerología*. 46: 275-280.

Mosmann RT and Subash S. (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*. 142:24-33.

Nájera O, González C, Toledo G, López Land Ortiz R. (2004). Flow Cytometry Study of Lymphocyte Subsets in Malnourished and Well-Nourished Children with Bacterial Infections. *Clin Diag Lab Immunol* 11: 577-580.

Nodera M, Yanagisawa H and Wada O. (2001). Increased apoptosis in a variety of tissues of zinc-deficient rats. *Life Sci*, 24:1639-1649.

Ortiz R, Cortés E, Pérez L, Cortés L, González C, Rodríguez E y Betancourt M. (1999). Desnutrición experimental por competencia de alimento durante la lactancia y su efecto sobre la fórmula leucocitaria en sangre periférica. *Rev Hispanoamericana*. 4:33-39.

Ortiz R, Cortés L, González M. H, Gómez JL, González C and Cortés E. (2001). Flow cytometric analysis of spontaneous and dexamethasone-induced apoptosis in thymocytes from severely malnourished rats. *Brit J Nutr* 86: 545-548.

Ortiz R, Rodríguez L, Cortés E, Nájera O, Medina H y González C. (2006). Estudios sobre el material Genético en Desnutrición. Capítulo en el libro: Tópicos de Genética. Editores: Sociedad Mexicana de Genética - Univeridad Autónoma del Estado de México. (En Prensa).

Ormerod MG. (1994). *Flow Cytometry*. Oxford University Press, EUA.

Peña M and Bacallao J. (2002). Malnutrition and Poverty. *Annu Rev Nutr*, 22:241-53

Peterson EJ and Koretzky GA. (1998). Signal transduction in T lymphocytes. *Clin Exp Rheumatol*, 17:107-114.

Prentice MA. (1999). The thymus: a barometer of malnutrition. *Br J Nutr* 81:345-347.

Ramírez RC, Carracedo JA, Moreno CA y Guerra FP. (1999). Apoptosis y enfermedad. *Alergol Immunol Clin*, 14:367-374.

Redmond HP, Shou J, Kelly CJ, Schreiber S, Miller E, Leon P and Daly JM (1991) Immunosuppressive mechanisms in protein-calorie malnutrition. *Surgery*, 110:311-317.

Rivadeneira DE, Grobmyer SR, Naama HA, Mackvill PJ, Mestre JR, Stapleton PP and Daly JM. (2001). Malnutrition –induced macrophage apoptosis. *Surgery*, 129:617-625.

Rodríguez CL, González C, Flores L, Jiménez ZL, Graniel J and Ortiz R. (2005). Assessment by Flow Cytometry of Cytokine Production in Malnourished Children. *Clin and Diag Lab Immunol*, 12: 502-507.

Rojas O. (1996). *Inmunología*, Edit. Médica Panamericana. Cap. 3, 4 y 5 México D.F.

Scaffidi C, Kirchhoff S, Krammer PH and Peter ME. (1999). Apoptosis signaling in lymphocytes. *Curr Opin Immunol* 11:277-285.

Sen S. (1992). Programmed cell death: concept, mechanism and control. *Biol Rev Camb Philos Soc*. 67:287-319.

Shenkin A., Cedarblad G, Elia M and Isaksson B. (1995). Laboratory assessment of protein-energy status. *Clin Chim. Acta* 253:S5-S59.

Simpson JR and Hoffman-Boetz L. (1993). Nutritional deficiencies and immunoregulatory cytokines. In: *Nutrient modulation of the immune response*. Ed: Dunningham-Rundles S. New York. Marcel Dekker Inc. New York, NY. 31-45.

Vega-Franco L. (1999). Hitos conceptuales en la historia de la desnutrición proteico-energética, *Salud pública de México*, 41: 328-333.

Waterlow JC. (1961). Oxidative phosphorylation in the liver of normal and malnourished human infants. *Proc. R Soc. Lond. B Biol Sci*. 155:96-114.