

**EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS CD45RO (Células de Memoria)
Y CD95 (Inductora de Apoptosis) EN LINFOCITOS T HUMANOS
DURANTE LA VIDA**



HERNEY FELIPE GUTIÉRREZ FALLA

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
POPAYÁN
2004**

**EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS CD45RO (Células de Memoria)
Y CD95 (Inductora de Apoptosis) EN LINFOCITOS T HUMANOS
DURANTE LA VIDA**



HERNEY FELIPE GUTIÉRREZ FALLA

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
POPAYÁN
2004**

**EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS CD45RO (Células de Memoria)
Y CD95 (Inductora de Apoptosis) EN LINFOCITOS T HUMANOS
DURANTE LA VIDA**



Herney Felipe Gutiérrez Falla

Trabajo de grado presentado como requisito parcial
Para optar al título de Biólogo. Con énfasis en Genética

Director

Julio César Klinger Hernández

MD. Especialista en Medicina Interna Ms. Sc. En Inmunología

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA
POPAYÁN
2004**

Nota de aceptación

Director. Julio César Klinger Hernández
MD. Especialista en Medicina Interna Ms. Sc. en Inmunología

Jurado

Jurado

Popayán, 28 de Agosto de 2003

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	
1. JUSTIFICACIÓN	3
2. OBJETIVOS	4
2.1 GENERAL	4
2.2 ESPECÍFICOS	4
3. MARCO REFERENCIAL	5
3.1 ANTECEDENTES EN LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS CD45RO Y CD95	5
3.1.1 Proteínas CD45RA Y CD45RO	5
3.1.2 Proteína CD95	7
4. COMPONENTES DEL SISTEMA INMUNE	8
4.1 ORIGEN DE LAS CÉLULAS DE DEFENSA	9
5. SELECCIÓN CLONAL	12
6. MEMORIA INMUNE	13
7. PROTEÍNA CD45	15
7.1 ACCIÓN DE LA PROTEÍNA CD45	17
7.2 LINFOCITOS T VÍRGENES CD45RA+	17
7.3 LINFOCITOS T MEMORIA CD45RO+	18
8. HOMEOSTASIS CELULAR	19
9. APOPTOSIS O MUERTE CELULAR PROGRAMADA	20
9.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LA APOPTOSIS	21
9.2 APOPTOSIS Y NECROSIS	22
10. SEÑALES EXTRACELULARES	23
10.1 COMUNICACIÓN INTERCELULAR	23
10.2 SEÑALES DE MUERTE CELULAR	24
11. RECEPTOR CD95	25
11.1 MUERTE CELULAR INDUCIDA POR ACTIVACIÓN	27
11.2 PROTEÍNAS ADAPTADORAS	29
12. RECEPTOR RFNT-1	30
13. MUTACIONES EN CD95	32
14. EJECUCIÓN DE APOPTOSIS	32
15. MITOCONDRIA Y APOPTOSIS	33
16. CASPASAS	35
16.1 CASCADAS DE ACTIVACIÓN	36
17. GENÉTICA Y APOPTOSIS	40
17.1 PROTEÍNA p53	41
17.2 PROTEÍNA Myc	42
17.3 RECEPTOR CD95 Y CÁNCER	43
17.4 PROTEÍNAS Bcl-2	44
18. CITOMETRÍA DE FLUJO	45
18.1 DISPERSIÓN FRONTAL (FSC)	46
18.2 DISPERSIÓN LATERAL (SSC)	46
18.3 FLUORESCENCIA	47
18.4 CONTROLES NEGATIVOS	48
18.5 SISTEMAS EN CITOMETRÍA DE FLUJO	49

18.6 APLICACIONES CLÍNICAS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO	50
19. HIPÓTESIS	51
20. DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS	52
21. SELECCIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO	53
21.1 CRITERIOS DE SELECCIÓN	53
21.2 CRITERIOS DE INCLUSIÓN	53
21.3 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN	53
22. TIPIFICACIÓN INMUNOLÓGICA DE LAS MOLÉCULAS CD45RO Y CD95	55
23. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	57
23.1 ANÁLISIS DE VARIANZA	57
23.2 CORRELACIONES	57
23.3 CORRELACIÓN LINEAL	57
24. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	58
24.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GRUPO DE ESTUDIO	58
24.2 DESARROLLO Y ESTADO NUTRICIONAL NORMALES	62
24.3 NIÑOS SANOS RECIÉN NACIDOS	62
24.4 CRECIMIENTO Y DESARROLLO NORMAL NIÑOS DE 5 Y 13 AÑOS	63
24.5 ESTADO NUTRICIONAL	64
24.6 HABITOS ALIMENTICIOS	65
24.7 HÁBITOS DEPORTIVOS	67
24.8 NIVELES DE ESTRÉS	67
24.9 HALLAZGOS CELULARES	69
24.9.1 Conteo de leucocitos totales	69
24.9.2 Conteo diferencial de leucocitos	70
25. PORCENTAJES DE EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS SUPERFICIALES CD95 Y CD45RO	71
25.1 ANÁLISIS DE VARIANZA	71
25.2 ANOVA UNIVARIANTE	72
25.3 CORRELACIONES PARAMÉTRICAS Y NO PARAMÉTRICAS	74
25.4 PROTEÍNA CD95	74
25.5 PROTEÍNA CD45RO	76
26. CORRELACIÓN LINEAL	77
26.1 EXPRESIÓN DE CD95	77
26.2 EXPRESIÓN DE CD45RO	79
27. ANÁLISIS DE FLUORESCENCIAS	80
27.1 PRUEBA DE ESTADÍSTICA KOLMOGOROV- SMIRNOV (KS)	80
27.2 PROMEDIO DE DIFERENCIAS (D)	81
28. CONCLUSIONES	84
BIBLIOGRAFÍA	85
ANEXOS	90

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Hematopoiesis	11
Figura 2. Selección clonal	13
Figura 3. Memoria inmune	14
Figura 4. Empalme alternativo del gen CD45	16
Figura 5. Estructura tridimensional proteína CD45	17
Figura 6. Comunicación intracelular	23
Figura 7. Región codificadora, proteína CD95 (Fas/APO-1) humana	25
Figura 8. Cascada de activación del receptor CD95	26
Figura 9. Modelo de expresión de CD95-L, inducción de apoptosis en células blanco	28
Figura 10. Cascadas apoptóticas intracelulares	31
Figura 11. Complejo apoptosoma en mamíferos	34
Figura 12. Zimógeno o forma inactiva de las caspasas	36
Figura 13. Activación de caspasas de ejecución	38
Figura 14. Estrategias de destrucción celular de las caspasas	39
Figura 15. Respuesta celular ante un daño severo en el ADN	40
Figura 16. Señales que causan daños severos a una célula activan apoptosis	43
Figura 17. Dispersión de luz láser por una célula	45
Figura 18. Dispersión frontal (FSC) y lateral (SSC) del rayo láser	47
Figura 19. Fluorescencias tipo CD3-FITC y CD4-PE	48
Figura 20. Control negativo-gammaglobulina hiperinmune	48
Figura 21. Sistemas integrados en citometría de flujo	50
Figura 22. Frecuencias de edad	59
Figura 23. Proporciones de sexo	59
Figura 24. Procedencia	60
Figura 25. Nivel de escolaridad	61
Figura 26. Alimentos más frecuentes en la dieta de la población	66
Figura 27. Respuestas sobre niveles de estrés	69
Figura 28. Variabilidad de expresión proteína CD95 entre categorías de edad	75
Figura 29. Correlación lineal entre la edad y la expresión de la proteína CD95	78
Figura 30. Correlación lineal positiva entre la edad y la expresión de la proteína CD45RO	79
Figura 31. Prueba estadística Kolmogorov-Smirnov, basada en histogramas de fluorescencias	83

LISTA DE TABLAS

	Pág
Tabla 1. Selección clonal	13
Tabla 2. Características linfocitos vírgenes (CD45RA+) y de memoria (CD45RO+)	19
Tabla 3. Señales de activación de apoptosis	24
Tabla 4. Activación de apoptosis por CD95 y RFNT-1	30
Tabla 5. Proteínas Bcl-2 reguladoras de apoptosis	44
Tabla 6. Longitud de onda de diferentes fluorocromos	47
Tabla 7. Características de la población en estudio	52
Tabla 8. Categorías formadas según la edad	58
Tabla 9. Características generales de la población	61
Tabla 10. Peso y talla – niños sanos recién nacidos	62
Tabla 11. Peso y talla – niños de 5 y 13 años	63
Tabla 12. Índice de masa corporal (IMC)	64
Tabla 13. Índice de masa corporal – personas mayores de 25 años	65
Tabla 14. Alimentos incluidos en la dieta	66
Tabla 15. Hábitos deportivos	67
Tabla 16. Respuestas – cuestionario sobre niveles de estrés	68
Tabla 17. Conteo de leucocitos totales	70
Tabla 18. Porcentajes absolutos de leucocitos	70
Tabla 23. Índices de correlación lineal – proteínas CD95 y CD45RO	77
Tabla 24. Línea de tendencia – proteína CD95	78
Tabla 25. Línea de tendencia – proteína CD45RO	80
Tabla 26. Promedios diferencias (D) prueba Kolmogorov – Smirnov	81

LISTA DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 1. ANOVA por cada factor	73
Cuadro 2. ANOVA univariante	73
Cuadro 3. Correlación paramétrica – Pearson	76
Cuadro 4. Correlación no paramétrica – Spearman	77

LISTA DE FOTOGRAFÍAS

	Pág.
Foto1. Cámara de flujo laminar	56
Foto 2. Citómetro de flujo	56

INTRODUCCIÓN

El Sistema Inmune específico desarrolla memoria para responder más rápida y eficientemente ante un segundo reto de un microbio o antígeno extraño al organismo. Los linfocitos T y B “vírgenes” se diferencian, proliferan y convierten en células con memoria específica por el estímulo de las células presentadoras de antígenos (APC). Ello induce cambios en la expresión genética, modificando la función y morfología celular (Young *et al*, 1997), uno de esos cambios ocurre en la proteína de superficie celular CD45: los linfocitos T vírgenes expresan la isoforma CD45RA y los linfocitos de memoria expresan la forma CD45RO¹.

Las células T y B de memoria (CD45RO+) aumentan la eficacia de la respuesta inmune, proliferando al encontrarse por segunda vez un antígeno.

El aumento en la tasa de división linfocitaria se regula por dos mecanismos: selección positiva, donde se estimula la proliferación de los linfocitos capaces de reconocer antígenos y selección negativa en la que las células, principalmente las autorreactivas, se eliminan sistemáticamente por apoptosis (el 90% de linfocitos proliferados desaparecen por apoptosis).^{2 3}

¹ ABUL, K. A; Lichtman, A. H and Pober, J. S. *Inmunología Celular y Molecular*. 3^{ra} ed. Interamericana. 1998. p. 3–15.

² ALBERTS, B. et al.. *Molecular Biology of the Cell*. 3 ed. E. U. A: Garland Publishing. 1994.

³ ANDERSEN, P. and Smedegaard, B. CD4+ T-cell subsets that mediate immunological memory to *Micobacterium tuberculosis* infection in mice. En: *Infection and Immunity*. Vol. 68, No. 621-629. 2000.

Apoptosis significa “muerte celular programada”, en la que el núcleo celular se condensa y fragmenta, la membrana citoplasmática forma vesículas y la célula apoptótica se fagocita sin que se libere su contenido, evitando generar inflamación dañina para el organismo^{4 5}

La apoptosis es necesaria para preservar la homeóstasis celular y el normal desarrollo de los tejidos, controlando el número de células que durante las etapas de organogénesis forman un órgano específico. La apoptosis es generada por estímulos fisiológicos y se regula por receptores de la membrana celular, la interacción de las proteínas CD95 y su Ligando CD95-L es el mecanismo promotor de apoptosis mejor comprendido en el sistema inmune.

La proteína de superficie transmembranal CD95 (Fas/Apo-1) pertenece a la familia de receptores para el Factor de Necrosis Tumoral (RFNT) y se expresa constitutivamente en la mayoría de líneas celulares T, B activadas por un antígeno.⁶

Las proteínas CD45 y CD95 son de reciente caracterización, este estudio pretende analizar los porcentajes de células T positivas para CD45RO y CD95 en personas sanas durante el transcurso de la vida, tratando de determinar los valores normales, lo que es fundamental para futuros estudios conducentes a observar como se alteran estos valores en salud y enfermedad humanas.

⁴ AUTRAN B, Carcelain G. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4 [sup+] T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. En: Science. Vol. 277, No 5322. p. 112–116. 1997.

⁵ BARYSHNIKOV Y, Polosukhina E. R, Zabortina T. N, Lazareva N. I, et al. Fas (APO-1/CD95) Antigen: New Activation Marker for Evaluation of the Immune Status. En: Russ J Immunol. Vol. 2, No 2; p. 115–120. 1997.

⁶ BOLDRINI L, Faviana P, Gisfredi S, Di Quirico S. et al. Identification of Fas (APO-1/CD95) and p53 mutations in non-small cancer lung cancer. En: International Journal of Oncology. Vol. 20, p.155–159. 2002

1. JUSTIFICACIÓN

Las proteínas de superficie CD45RO y CD95(FAS/APO-1) expresadas en linfocitos T humanos se han descrito y caracterizado recientemente y están directamente relacionadas con la génesis de diferentes enfermedades, por lo tanto es importante realizar estudios que determinen sus niveles basales de expresión en una población caucana de individuos sanos; para en futuros estudios observar y analizar el comportamiento de estas moléculas en exceso y déficit en individuos enfermos.

2. OBJETIVOS

2.1 GENERAL

Observar el comportamiento de las proteínas CD45RO y CD95(FAS/APO-1) en linfocitos T humanos en una población caucana sana de diferentes grupos étnicos.

2.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Aplicar técnicas de Citometría de Flujo, para estudiar el comportamiento de las proteínas CD45RO y CD95(FAS/APO-1) en linfocitos T humanos.
- ✓ Establecer parámetros de normalidad de las proteínas CD45RO y CD95(FAS/APO-1) en linfocitos T de personas sanas.
- ✓ Estudiar la tendencia de las proteínas CD45RO y CD95(FAS/APO-1) en linfocitos T humanos durante rangos progresivos de edad.
- ✓ Construir una curva de comportamiento de las proteínas CD45RO y CD95(FAS/APO-1) presentes en linfocitos T humanos.

3. MARCO REFERENCIAL

3.1 ANTECEDENTES EN LA EXPRESIÓN DE LAS PROTEÍNAS CD45RO Y CD95 (FAS/APO-1)

3.1.1 Proteínas CD45RA y CD45RO. Al estudiar el desarrollo del sistema inmune humano, en fetos y tejidos linfoides de adultos siguiendo la expresión de varios marcadores moleculares de poblaciones leucocitarias; mostrando que en las primeras semanas de la maduración tímica del feto, se activan las células T periféricas. La molécula CD95 se expresa en niveles más altos en los linfocitos T CD45RA+ del feto que en los tejidos linfoides del adulto, además se observa un elevado número de linfocitos T CD45RO+ en el feto (población CD95-/CD45RO+) (Meunch *et al*, 2003).

Chheda *et al*, 1996, analizaron la expresión cuantitativa de las proteínas CD45RA y CD45RO en linfocitos T colaboradores CD4+ y efectoros CD8+ en sangre de personas adultas y recién nacidos sanos, mostrando un porcentaje de expresión de la proteína CD45RO en células CD4+ de 72% en los adultos y de 58% en los recién nacidos.

En un estudio diseñado para estudiar la proliferación de células T CD4+ de individuos VIH+ sometidos a terapias antirretrovirales, se empleó como control a un grupo de personas sanas, quienes presentaron un nivel de expresión normal de linfocitos T CD4+ de memoria (CD4+/CD45RO+) de $55\pm 9\%$, y un porcentaje de linfocitos T CD4+ vírgenes (CD4+/CD45RA+) de $96\pm 3\%$ (Autran *et al*, 1997).

Para estudiar si los linfocitos T colaboradores CD4+ de pacientes con asma, presentaban diferencias en la expresión de las proteínas CD45RO y CD45RA, se usaron como control los niveles de expresión de estas moléculas en personas sanas, mostrando un $23.9\pm 4.69\%$ de expresión de la proteína CD45RO y $19.41\pm 5.99\%$ de la proteína CD45RA. (Sánchez-Guerrero Villagos *et al*, 1998).

kuss *et al*, 2003, estudiando la expresión de las isoformas de las proteínas superficiales CD45RA y CD45RO en linfocitos T efectores CD8+ de células escamosas de carcinomas de cabeza y cuello, usaron como control normal el nivel de expresión de un grupo formado por 45 personas sanas, mostrando un porcentaje de expresión para las células (CD8+/CD45RA+) de 67% (24–80%) y para las células (CD8+/CD45RO+) de 37% (20–75%).

Estudios realizados en personas VIH+ (Chinen *et al*, 2002), han mostrado que el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) infecta principalmente a los linfocitos T CD4+ de memoria (CD4+/CD45RO+), estimulándolos permanentemente y ayudando a conservar normal sus conteos celulares; la disminución de las células T es más drástica en los linfocitos T CD4+ vírgenes (CD4+/CD45RA+), esta disminución se debe principalmente a la inducción de apoptosis en las células T vírgenes (CD4+/CD45RA+) infectadas y no infectadas.

3.1.2 Proteína CD95(FAS/APO-1). En un estudio realizado para evaluar los cambios en la expresión de las moléculas CD95 (APO1/Fas) y CD45RO en linfocitos T de sangre periférica de 148 personas saludables de diferentes edades (usando desde sangre de cordón umbilical hasta ancianos de 102 años), se mostró que la expresión de las moléculas CD95 y CD45RO aumenta con la edad. La expresión de CD95 en linfocitos T CD4+ también aumenta con la edad, mientras que en los linfocitos T CD8+ la expresión de CD95 en todas las edades tendió a ser igual. Además se encontró que la expresión de la proteína CD95 se incrementa progresivamente con la edad. (Potestio *et al*, 1999).

4. COMPONENTES DEL SISTEMA INMUNE

El sistema inmune tiene dos componentes:

- 1) Inmunidad Innata o Inespecífica.
- 2) Inmunidad Adquirida o Específica, subdividida a su vez en dos grandes ramas funcionales:
 - a) Inmunidad Celular: Dirigida contra antígenos insolubles, células complejas y gérmenes de crecimiento intracelular.
 - b) Inmunidad Humoral: Efectuada por inmunoglobulinas secretadas por linfocitos B o células plasmáticas y dirigida contra antígenos solubles (toxinas) y gérmenes de crecimiento extracelular.

Estos componentes del SI se intercomunican y regulan por dos mecanismos:

- a) Contacto directo intercelular específico e inespecífico (interacción de receptores celulares)
- b) Señales químicas solubles (Citoquinas y Quimosinas)⁷

4.1 ORIGEN DE LAS CÉLULAS DE DEFENSA

El sistema innato formado por macrófagos, neutrófilos, monocitos y células dendríticas no posee memoria, cuando un microbio o antígeno penetra las barreras naturales del organismo es captado o fagocitado por los macrófagos quienes los destruyen y procesan los desechos microbianos para luego presentarlos como antígenos al sistema inmune específico que posee

⁷ DANIAL, P. S; Abba, I. T. y Tristram, G. P. Inmunología Básica y Clínica. 3 ed. El manual Moderno, 1998. p. 147-161.

memoria, comandado por los linfocitos T ayudadores (CD4+).⁸ Todas las células sanguíneas incluidas los eritrocitos, plaquetas y células blancas del sistema inmune (leucocitos), se originan en la médula ósea a partir de células totipotenciales o pluripotenciales, después los leucocitos migran a vigilar los tejidos periféricos circulando entre la sangre y vasos linfáticos.

Las células pluripotenciales que generan el sistema inmune producen dos linajes celulares:

- A. El progenitor mieloide: Produce las células del sistema inmune inespecífico: monocitos, neutrófilos, basófilos, eosinófilos y células dendríticas
- B. El progenitor linfoide: Origina las células del sistema inmune específico (linfocitos T y B) Los linfocitos T identificados por expresar la proteína CD3 efectúan la inmunidad celular y adicionalmente regulan la inmunidad específica ayudando o suprimiendo a la inmunidad humoral.(Ver Figura 1)

Los linfocitos T se subdividen en dos grupos identificados por los receptores de superficie celular CD4 y CD8, funcionalmente los linfocitos CD4 se llaman T ayudadores (Th) mientras que los linfocitos T CD8 son citotóxicos y/o supresores (Tsc).⁹

⁸ ABUL. Op. cit., p.5.

⁹ DANIAL. Op. cit., p.150.

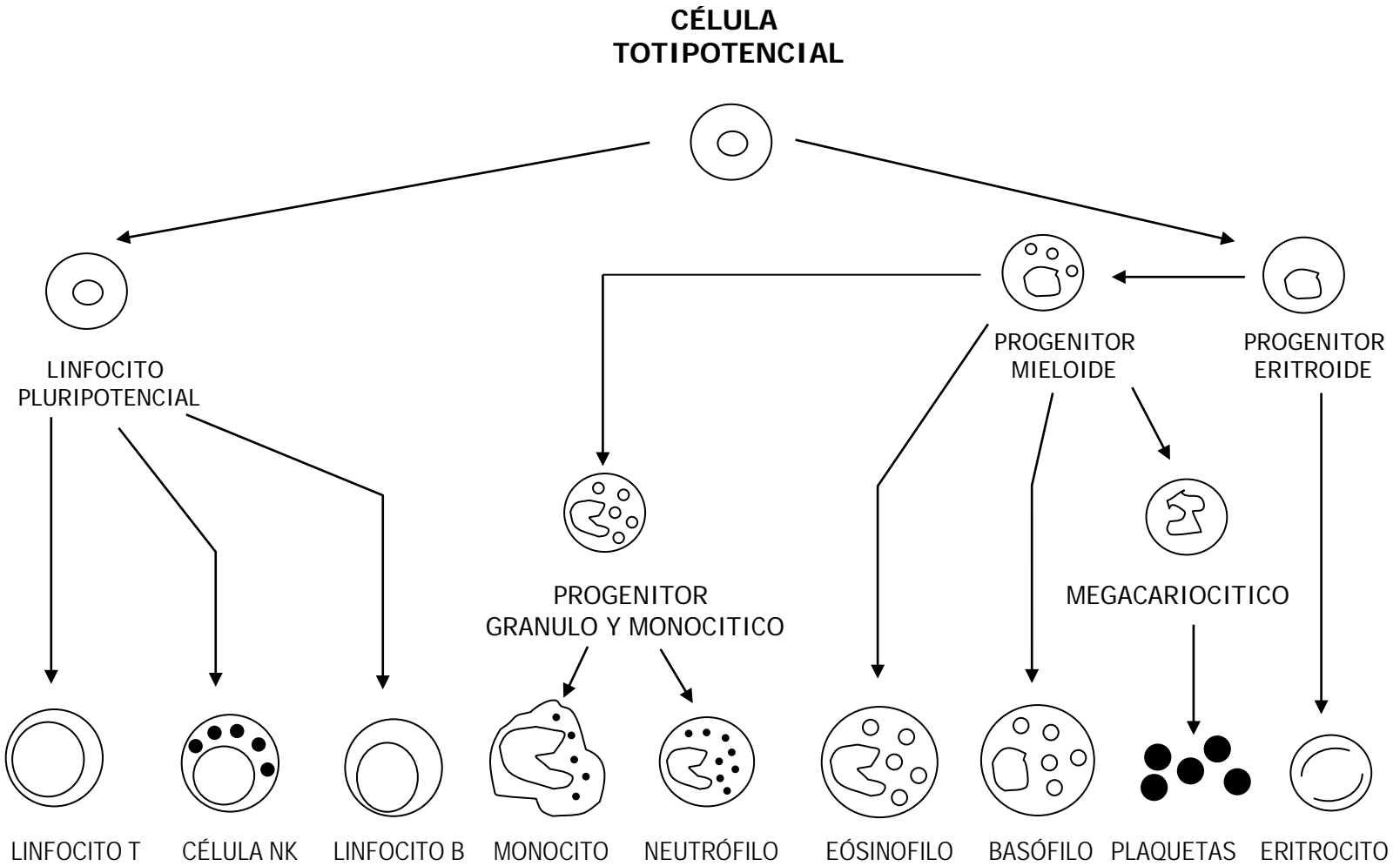


Figura 1. Hematopoyesis

5. SELECCIÓN CLONAL

El sistema inmune reconoce una gran variedad de antígenos ambientales por receptores celulares de los linfocitos T y B (TCR y BCR), cada linfocito tiene un receptor de antígenos (TCR), planteándose que en cada persona o animal existe una gran diversidad de TCRs que constituyen una especie de biblioteca o repertorio inmunológico, esta diversidad se explica por la teoría de la selección clonal planteada por Sir McFarlane Burnet (1957), que postula que un antígeno dado selecciona la clona de linfocitos que va a responder específicamente contra ese antígeno.⁷

Inicialmente el TCR de un linfocito nuevo o “vírgen” generado en los órganos linfoides primarios es “promiscuo” porque reconoce de 15 a 20 formas antigénicas diferentes, si un antígeno es fijado por el TCR de una célula T o B se producen rearrreglos y mutaciones en el gen que codifica el TCR para permitir mayor afinidad en la interacción antígeno–TCR, adiestrando a la célula para responder exclusivamente contra ese antígeno, después esa célula prolifera y forma una clona de células idénticas que responden contra ese antígeno.

La selección clonal es la principal causa de la memoria inmune: la exposición a un antígeno “esculpe y pule” la población de linfocitos, para que puedan responder con rapidez y vigor al reencuentro con el mismo antígeno (Ver Tabla 1). Los linfocitos de memoria pueden sobrevivir por largos periodos de tiempo (20 años o más) sin la estimulación de un antígeno mientras que los linfocitos vírgenes tienen periodos de vida cortos de solo semanas.⁸

⁷ ABUL. Op. cit., p. 132.

⁸ ALBERTS. Op. cit., p. 150

Tabla 1. Selección clonal

Hipótesis de la selección clonal
Cada linfocito produce un solo tipo de receptor celular.
La unión entre una molécula extraña (antígeno) y un receptor celular induce división celular.
Los linfocitos activados expresan receptores celulares idénticos a los de su célula madre.
En estado tempranos de desarrollo celular se eliminan las células con receptores que reconocen moléculas propias.

* ABUL. Op. cit., p.250.

6. MEMORIA INMUNE

Los microorganismos infecciosos al entrar al cuerpo se dividen rápidamente, para controlar esta proliferación se activa la respuesta inmune primaria, donde las células del sistema inmune se dividen progresivamente (aumentando sus conteos celulares hasta 1000 veces, en pocos días), estos niveles de activación bajan al controlar las infecciones. La respuesta inmune secundaria se activa cuando el organismo después de un tiempo (semanas, meses o años) se reinfecta con el mismo antígeno, esta respuesta es más intensa y rápida.⁹

La respuesta primaria demora cinco días en activarse y las células vírgenes se dividen constantemente diferenciándose en:

- 1) Células activadas: Ante el encuentro con un antígeno forman grupos con receptores celulares idénticos (selección clonal)
- 2) Células de memoria: Solo inician respuestas inmunes al reencontrarse con un antígeno (Ver Figura 2).

⁹ SPRENT Jonathan, Tough David F. T cell death and memory. En: Science. Vol. 293, No. 5528 (jul. 2001); p. 245-249.

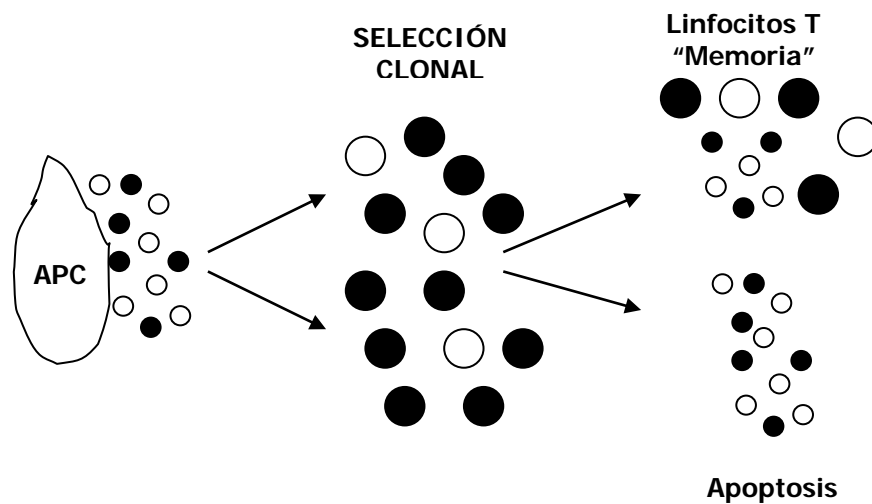


Figura 2. Memoria inmune

7. PROTEÍNA CD45

Los linfocitos T inmaduros son muy difíciles de diferenciar morfológicamente, para poder distinguir entre las células T vírgenes y las de memoria, se estudia la expresión de proteínas de superficie que permitan su clasificación certera y se ha desarrollado un sistema de nomenclatura, que fija a cada proteína códigos específicos por sus propiedades físicas y funciones biológicas; en este sistema primero se nombran las iniciales CD (grupo de diferenciación o Cluster Differentiation) seguidas por un número único de identificación, por ejemplo: CD45, CD45RA y CD45RO.¹⁰ La familia de la proteína CD45 proviene de un gen con 34 exones, tres de los cuales producen hasta ocho ARN-mensajeros diferentes (llamados A, B y C) y ocho proteínas distintas, estas proteínas tienen dominios de diferente tamaño y composición.

En los seres humanos, la mayor parte de las células T no estimuladas o vírgenes, expresan una isoforma de 200 a 220 Kd de la proteína CD45 que contiene un segmento codificado por un exón llamado **A**, que puede ser reconocido por anticuerpos específicos (proteína CD45RA), mientras que las células T memoria activadas por un antígeno, expresan una proteína de 180 Kd en la que el exón A no existe (proteína CD45RO); sin embargo esta diferencia no es absoluta y se han observado poblaciones celulares con los dos tipos de marcadores (CD45RA+/CD45RO+).¹¹

¹⁰ DANIAL. Op. cit., p. 147-161.

Cuando una célula vírgen se encuentra con un antígeno se activa y reacciona específicamente contra este pasando a ser célula de memoria, perdiendo el marcador CD45RA y expresando el marcador CD45RO (Ver Figura 3).¹²

¹¹ ELLIOTT, W. H. and Elliott, D. C. Biochemistry and Molecular Biology. 3th ed. U. S.A: Oxford University Press.1997.

¹² ABUL. Op. cit., p. 10.

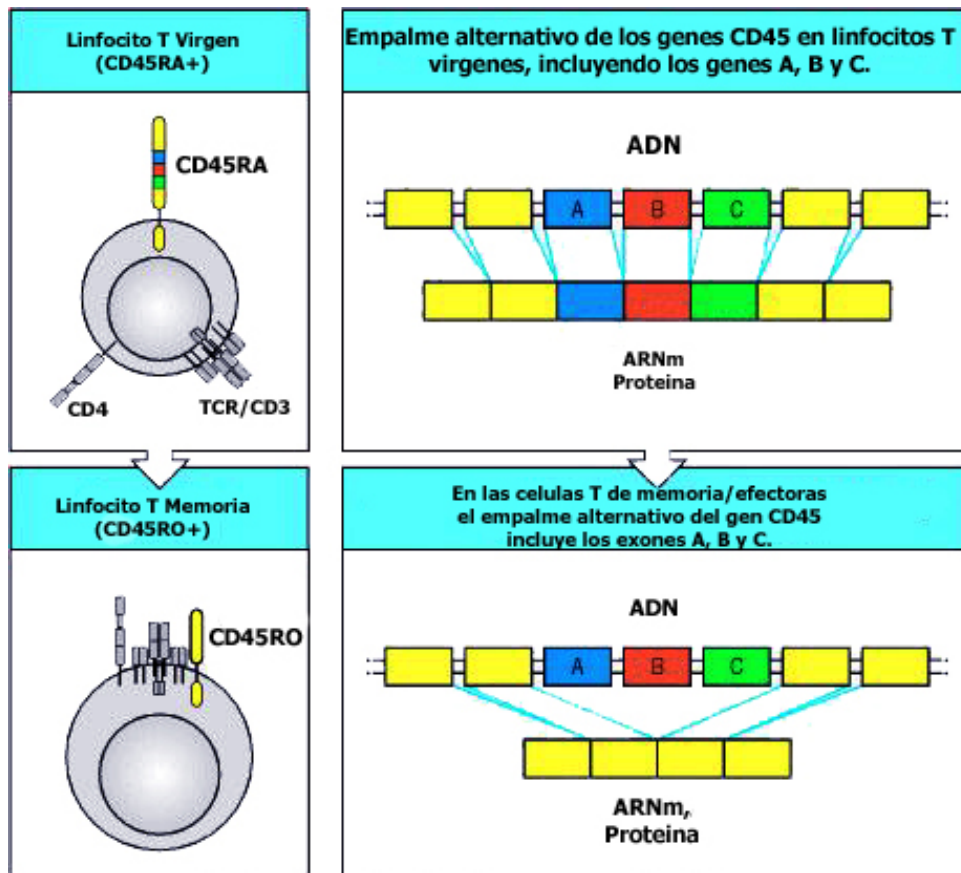


Figura 3. Empalme alternativo del gen CD45

7.1 ACCIÓN DE LA PROTEÍNA CD45

La proteína CD45 tiene un gran dominio citoplasmático muy conservado, las señales extracelulares producidas por un antígeno activan este dominio, eliminando grupos fosfato de proteínas que contengan en su estructura el aminoácido tirosina (dominio con actividad tirosina fosfatasa). La proteína CD45 controla la activación de las células T, al eliminar grupos fosfato de tirosina en proteínas intracelulares específicas, activando procesos de división celular.¹³

¹³ ABUL. Op. cit., p. 45.

7.2 LINFOCITOS T VÍRGENES CD45RA+

Los linfocitos vírgenes (CD45RA+), formados en el timo tienen la capacidad de reconocer diferentes antígenos y circulan continuamente entre la sangre y los órganos linfoides secundarios (bazo, amígdalas, nódulos linfáticos, entre otros) donde se recogen los antígenos presentes en los tejidos periféricos y las células vírgenes se unen a un antígeno específico.¹⁴

7.3 LINFOCITOS T MEMORIA CD45RO+

La circulación de las células T de memoria cubre los tejidos linfáticos y no linfáticos (mucosas respiratorias y gastrointestinales) por donde los antígenos entran más fácil al organismo y a los que migran constantemente las células T memoria.

Los linfocitos vírgenes y memoria necesitan diferentes estímulos para sobrevivir y activarse:

1. Los linfocitos vírgenes deben estar en contacto permanente con las células presentadoras de antígeno (APC).
2. Los linfocitos de memoria responden más rápidamente frente a un antígeno, porque se activan al responder a factores químicos disueltos en la sangre (Citoquinas) (Ver Tabla 2).¹⁵

¹⁴ DANIAL. Op. cit., p. 50.

¹⁵ SPRENT. Op. cit., p. 245–249

Tabla 2. Características linfocitos vírgenes (CD45RA+) y de memoria (CD45RO+).

Linfocitos	Células vírgenes (CD45RA+)	Células de memoria (CD45RO+)
Linfocitos T		
Migración	Ganglios linfáticos	Tejidos periféricos – Lugares de inflamación
Producción de Interleuquinas	IL-2	IL-4, IL-5, IL-13, IFN- γ
Tiempo de vida media	Semanas	30 años o más
Tipo de proteína superficial CD45	CD45RA	CD45RO
Tamaños relativos de CD45 (Kd)	205 – 220 Kd	180 Kd
Respuesta inmune	Primaria	Secundaria
División celular	Tardía	Temprana
Linfocitos B		
Inmunoglobulina (Ig) de superficie	IgM – IgD	IgG
Afinidad de la Ig producida	Baja	Relativamente alta

* ABUL. Op. cit., p. 212.

8. HOMEÓSTASIS CELULAR

Para los organismos multicelulares es vital controlar los procesos de división celular. Las células somática defectuosas o que hayan cumplido sus funciones biológicas, deben ser eliminadas de tal forma que no sea traumático para el organismo para esto, existe un mecanismo de muerte celular controlada llamado apoptosis.

En la homeóstasis de un organismo se activan diferentes procesos bioquímicos que controlan diferentes funciones biológicas. La apoptosis tiene como función principal mantener un balance entre las poblaciones celulares que se dividen y las que mueren. (Diariamente se producen 10 billones de nuevas células que remplazar a las muertas)^{16 17} En el sistema inmune, las células que controlan agentes infecciosos se dividen ampliamente; si este gran número de células sobrevive en el organismo se pueden congestionar los órganos linfoides y alterar futuras respuestas, para controlar este exceso celular más del 90% de ellas mueren por apoptosis.

¹⁶ INSUASTY, M. B. Apoptosis: Un Nuevo Rumbo para la Investigación Biomédica. En: Revista Facultad Ciencias de la Salud. Universidad del Cauca. Popayán: Vol.3, No 1(mar. 2001); p. 27–35.

¹⁷ SPRENT. Op. cit., p. 245–249.

9. APOPTOSIS O MUERTE CELULAR PROGRAMADA

La muerte celular programada organiza la forma del embrión de los organismos multicelulares, elimina tejidos y partes ancestrales que no tienen ninguna función para las especies, como la cola del embrión humano o las branquias del renacuajo. La muerte celular forma las patas de aves y mamíferos eliminando las membranas que unen los dedos, produce los orificios del tubo digestivo, ayuda a formar los riñones, remodela huesos, cartílagos y participa en la diferenciación sexual. La apoptosis es una forma activa de muerte celular que produce la desintegración ordenada de células dañadas o con su función biológica cumplida, teniendo un papel fundamental en el desarrollo normal y homeóstasis de los tejidos.^{18 19} El sistema inmune participa en la toxicidad celular, la eliminación de linfocitos inmaduros y de células infectadas por microorganismos o virus. (Herpes virus, virus del papiloma humano).

Defectos en la activación de la apoptosis pueden desarrollar algunas enfermedades como: Cáncer, desordenes autoinmunes, SIDA y procesos neurodegenerativos: Enfermedad de Alzheimer.

9.1 CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS DE LA APOPTOSIS

Las células apoptóticas tienen rasgos morfológicos característicos:

- 1- Contracción celular:
 - Pérdida del contacto superficial entre células vecinas
 - Pérdida de estructuras membranales especializadas: microvellocidades, desmósomas.

- 2- Condensación de la cromatina:
 - Condensación y degradación de la cromatina (Picnosis)
 - Desintegración de organelas celulares
 - Pérdida de poros nucleares
 - Fragmentación del núcleo (Cariorraxis)

¹⁸ EVAN, G. and Littlewood, T. A. Matter of Life and Cell Death. En: Science. Vol.281, No 5381(aug. 1998); p. 1317–1322.

¹⁹ INSUASTY. Op. cit., p. 27–35.

- 3- Contracción de la membrana citoplasmática y formación de cuerpos apoptóticos que contienen organelas y fragmentos nucleares.
- 4- Fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por células vecinas y macrófagos.

9.2 APOPTOSIS Y NECROSIS

La necrosis y apoptosis se diferencian en muchos aspectos:

La necrosis es un fenómeno pasivo producido por cambios severos en el ambiente celular (exposición a agentes tóxicos), en el que las células rompen su membrana citoplasmática liberando enzimas que activan inflamaciones locales y dañan tejidos cercanos. Mientras que la apoptosis es un fenómeno activo controlado por energía en forma de ATP y regulado genéticamente, que actúa sobre células individuales o líneas celulares específicas, además la membrana citoplasmática de la célula conserva su función, manteniendo aisladas las organelas y fragmentos nucleares dentro de los cuerpos apoptóticos.^{20 21}

²⁰ INSUASTY. Op cit., p. 27–35.

²¹ CARSOR. Op cit., 1998.

10. SEÑALES EXTRACELULARES

10.1 COMUNICACIÓN INTERCELULAR

La comunicación celular es fundamental para mantener un control y equilibrio sobre el desarrollo de tejidos y órganos al controlar las tasas de división celular.

En este sistema las células se comunican a través de proteínas y pequeñas moléculas llamadas ligandos, por ejemplo: CD95-L ó Fas-L.

Las proteínas o ligandos se unen a receptores celulares específicos, estimulando la expresión de señales bioquímicas en el citoplasma celular que regulan la activación y represión de genes específicos.

Generalmente los receptores celulares se dividen en una parte externa (dominio extracelular), una parte central que atraviesa una o varias veces la membrana plasmática y una parte interna (dominio intracelular).²²

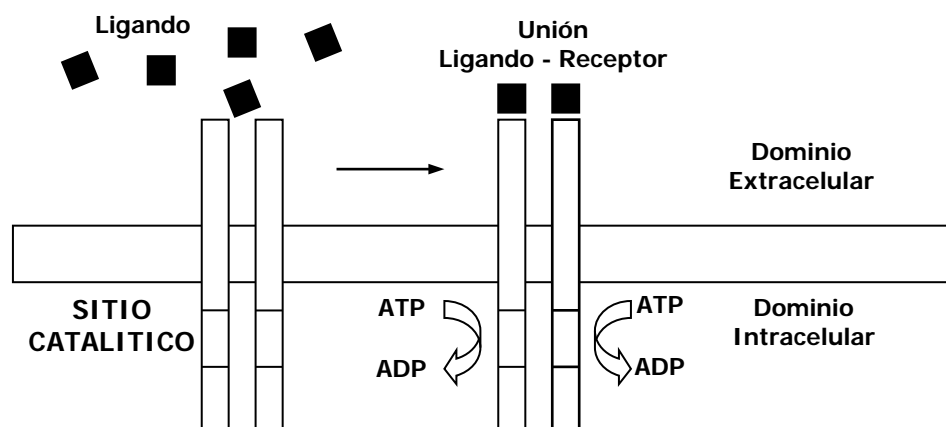


Figura 4. Comunicación intracelular.

²² ELLIOTT. Op. cit., p.60.

10.2 SEÑALES DE MUERTE CELULAR

La unión de las proteínas de comunicación celular a receptores específicos, activa cascadas de respuestas intracelulares que terminan con la desintegración de la célula básicamente de dos maneras:

1. Actividad quinasa específica: En estas cascadas apoptóticas, enzimas específicas agregan fósforo inorgánico a sitios en la estructura de los dominios citoplasmáticos que contengan tirosina, serina o treonina.
2. Autofosforilación: Cuando un ligando se pega a un receptor celular que provoca apoptosis, el dominio intracelular (dominio de muerte) se une iniciando su actividad cinasa dependiente de tirosina (Ver Tabla 3).

Tabla 3. Señales de activación de apoptosis

Mecanismos	Agentes	Tipo de señal	Caspasa activadas	Modo de acción
1. Ambientales	Radiaciones ionizantes (UV) Agentes tóxicos	Intracelular	Procaspasa 9 Iniciadora	Produce daños en la membrana mitocondrial y liberación al citoplasma de Citocromo C
2. Proteínas transmembranales	Receptor del Factor de Necrosis Tumoral	Extracelular	Procaspasa 8 Iniciadora	Activación de cascadas apoptóticas
3. Señales de supervivencia	Hormonas Factores de crecimiento celular Citoquinas	Extracelular	Procaspasa 8 Iniciadora	A concentraciones bajas, se detienen las tasas de división celular
4. Células	Linfocitos T citotóxicos	Extracelular Intracelular	Procaspasas 8 y 9 Iniciadoras	Activación de cascadas apoptóticas - Liberación de perforinas que forman poros celulares - Liberación de proteínas de unión a receptores celulares tipo: (CD95)
5. Cambios bioquímicos (Activación enzimática)	Endonucleasas de restricción Proteasas de cisteína	Intracelular	Procaspasa 9 Iniciadora	- Aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática - Fragmentación de ADN

* ABUL. Op. cit., p. 55.

11. RECEPTOR CD95(FAS/APO-1)

Los receptores de muerte pertenecen a la gran familia del receptor del Factor de Necrosis Tumoral (**RFNT**) y se caracterizan por tener dominios extracelulares ricos en cisteína y secuencias citoplasmáticas homólogas llamadas Dominios de muerte.

Los receptores de muerte celular mejor caracterizados son el CD95 también llamado Fas o Apo-1 y el receptor RFNT-1 también llamado p55 o CD120A y sus proteínas ligando son: CD95-L y linfotóxina- α respectivamente.

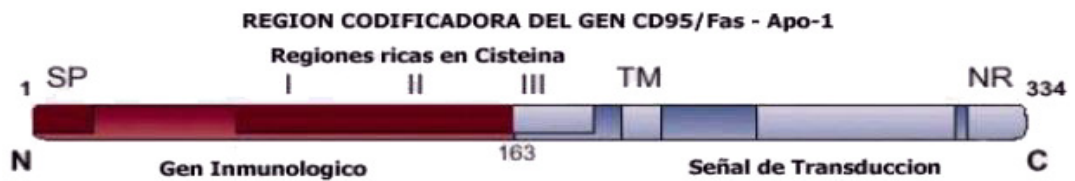


Figura 5. Región codificadora, proteína CD95(Fas/APO-1) humana.

La apoptosis se regula por una proteína transmembranal de superficie llamada CD95 con un peso molecular de 4.500 Kd que se expresa en muchas células normales como los linfocitos B y T activados y en células neoplásicas.²³

²³ DANIAL. Op. cit., p. 147-161

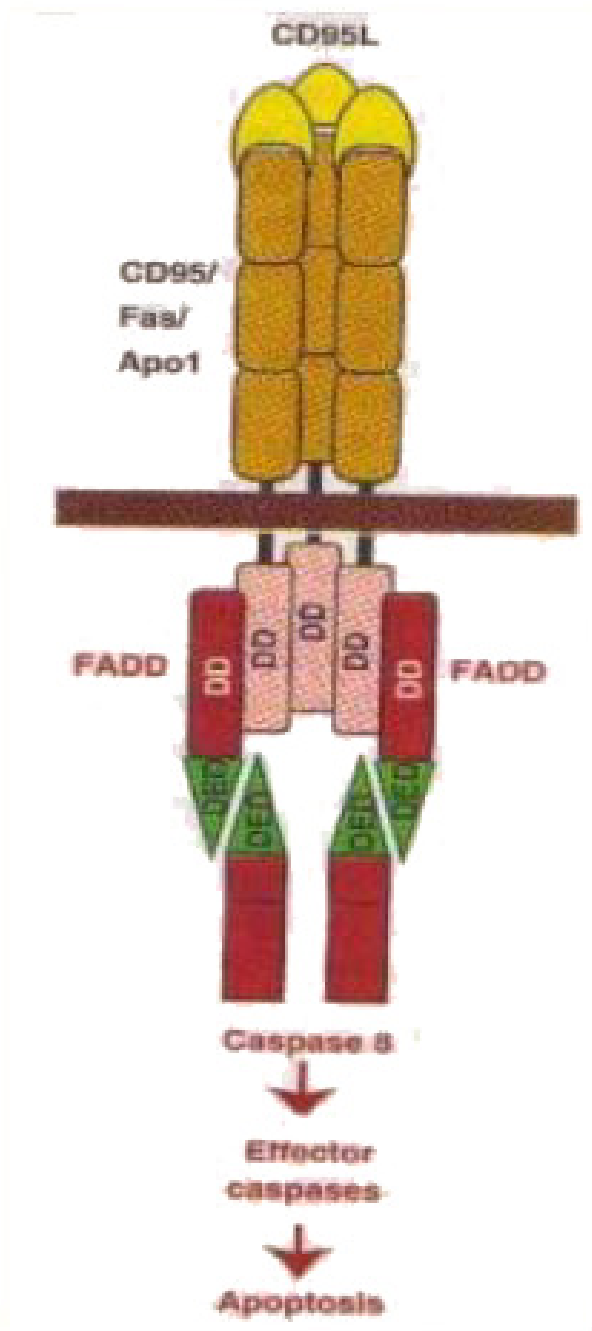


Figura 6. Cascada de activación del receptor CD95.²⁴

²⁴ ASHKENAZI, A. and Dixit, M. V. Death Receptors: Signaling and Modulation. En: Science. Vol. 281, No 5381(aug. 1998); p. 1317–1322.

11.1 MUERTE CELULAR INDUCIDA POR ACTIVACIÓN

La región extracelular de la proteína CD95 se une a una proteína trimerica que actúa como ligando llamada CD95-L. Los linfocitos B, T y otros tipos celulares expresan constitutivamente el receptor CD95 y sus niveles aumentan por el estímulo de un antígeno, mientras que la expresión del ligando CD95-L se limita a los linfocitos B y T activados.^{25 26}

Los procesos apoptóticos se activan cuando las células que expresan el receptor CD95 se une a su ligando CD95-L, esta unión produce la trimerización de la proteína CD95 y la activación de una cascada enzimática que terminan desintegrando a la célula.

Otra función importante de la apoptosis es mantener más o menos constante la cantidad de linfocitos durante la vida eliminando a:

1. Linfocitos que no reconocen antígenos (selección negativa)
2. Linfocitos vírgenes que nunca se unen a un antígeno.
3. Linfocitos que no estén expuestos a cantidades suficientes de factores de crecimiento: "Todas las células de mamíferos, se destruyen a sí mismas cuando se les priva de contacto con otras, sin importar si vienen de un embrión, de un joven o de un adulto".
4. En el sistema inmune, los linfocitos T citotóxicos eliminan las células infectadas por virus, bacterias o con daños severos en su información genética (células cancerosas) básicamente de dos formas:
 - A.** Secretan compuestos químicos (perforinas) que desintegran las células al formar poros en su membrana plasmática.
 - B.** Expresan altos niveles de la proteína CD95-L provocando apoptosis en las células que expresan el receptor CD95.^{27 28}

²⁵ ABUL. Op. cit., p. 80.

²⁶ DANIAL. Op. cit., p. 147-161.

²⁷ INSUASTY. Op cit., p. 27-35.

²⁸ ALBERTS. Op cit., p. 75.

En ciertos tejidos como los ojos, testículos y el sistema nervioso central (tejidos inmunitarios privilegiados), la expresión constitutiva del ligando CD95-L previene que estos tejidos sufran daños al inducir apoptosis en los linfocitos que se unan a esta proteína evitando que se inicien respuestas inmunes locales (Ver Figura 7)

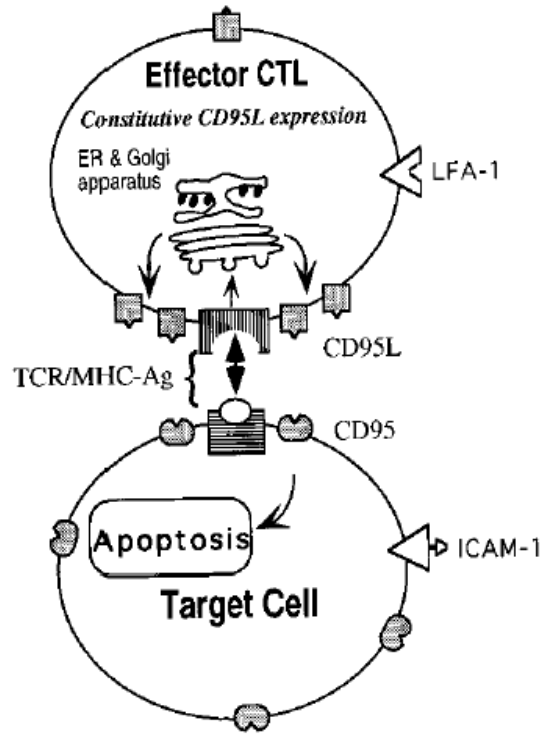


Figura 7. Modelo de expresión de CD95-L, inducción de apoptosis en célula blanco.²⁹

11.2 PROTEÍNAS ADAPTADORAS

Las señales que producen muerte celular se integran en un programa apoptótico regulado por un grupo de proteínas capaces de activar cascadas enzimáticas proteolíticas que desintegran moléculas como la actina (constituyente del citóesqueleto) o el Citocromo-C (Cyto-C) que interviene en la respiración mitocondrial; condenando a muerte líneas celulares fundamentales para procesos biológicos como la división celular.

Dependiendo del tipo de señal que activa la maquinaria apoptótica estos dominios se dividen en:

1. Dominios de muerte asociados a receptores transmembranales:

Cuando el ligando CD95-L se enlaza a su receptor CD95 expresado por la célula que va a morir, la proteína FADD (Proteína Asociada a FAS/CD95 con Dominio Letal) se trimeriza y une a múltiples moléculas de la Procaspasa-8 modificando su estructura y activándolas, iniciando una serie de reacciones en cadena que degradan proteínas citoplasmáticas y nucleares como el ADN.³⁰

2. Dominios de muerte activados por daños intracelulares:

Diferentes agentes tóxicos pueden dañar la membrana mitocondrial y provocar que Cyto-C se libere al citoplasma, activando la proteína APAF-1 (Factor Proapoptótico Activador de Proteasas) que se une a la caspasa-9 y degrada proteínas celulares.³¹

²⁹ LI, J. *et al.* The regulation of CD95 Ligand Expression and Function in CTL. *En: The Journal of Immunology*. Vol. 161(jun. 1998); p. 3943-3949.

³⁰ INSUASTY. *Op cit.*, p. 27-35.

³¹ GRIFFITHS, J. F. *et al.* *Genética Moderna*. Madrid: Mc Graw-Hill. 1999.

12. RECEPTOR RFNT-1

El Factor de Necrosis Tumoral (FNT) es una proteína secretada por los macrófagos y linfocitos T activados para controlar una infección, cuando el receptor RFNT-1 se une a su ligando FNT se activa la transcripción de factores reguladores de la expresión de proteínas inflamatorias. A diferencia del receptor CD95 el RFNT-1, induce apoptosis celular regulando la actividad de proteínas que controlan la expresión de genes fundamentales para la célula, mientras que el receptor CD95 provoca apoptosis regulando la actividad de proteasas específicas (Ver Tabla 4).

El Factor de Necrosis Tumoral produce la trimerización del receptor RFNT-1, induciendo la unión a los dominios de muerte de la proteína FADD y la activación de la caspasa-8 que regula la expresión de factores genéticos que inducen apoptosis celular.³²

Tabla 4. Activación de apoptosis por CD95(FAS/APO-1) y RFNT-1

Receptor	Células secretoras	Ligando	Molécula activada	Caspasa activada	Dominios de muerte
CD95	Linfocitos T activados	CD95-L	Proteasas con actividad quinasa específica	Caspasa – 8	FADD DED
RFNT-1	Linfocitos T activados y Macrófagos	FNT	Proteínas reguladoras genéticas	Caspasa – 8	FADD

*ASHKENAZI. Op cit., p. 1317-1322.

13. MUTACIONES EN CD95(FAS/APO-1)

Las mutaciones en las regiones codificantes del receptor de muerte CD95 que alteren su expresión y función, causan enfermedades autoinmunes caracterizadas por la acumulación masiva de células T autorreactivas. El Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune (SLA), es una enfermedad producida por mutaciones en los dominios de muerte como el factor FADD y se caracteriza por la acumulación de linfocitos que dañan los tejidos propios.

³² Lbid, p. 1317-1322.

Diversos estudios sugieren que existe la delección en un único gen que afecta la expresión la proteína CD95, provocando que los linfocitos T no respondan a los mecanismos normales de control de muerte celular.^{33 34}

14. EJECUCIÓN DE APOPTOSIS

Las cascadas bioquímicas que producen apoptosis fragmentan proteínas fundamentales para la estabilidad celular, las proteínas del citóesqueleto y del núcleo celular sufren hidrólisis por la acción de las caspasas de ejecución. Los cuerpos apoptóticos se producen por la formación de enlaces cruzados entre proteínas citoplasmáticas, volviendo a la membrana celular muy resistente evitando que las organelas celulares y fragmentos nucleares se liberen a los espacios extracelulares.³⁵

³³ BOLDRINI. Op. cit., p. 155–159.

³⁴ MÜLLER, Martina. *et al.* The role of p53 and the CD95 (APO-1/Fas) death system in chemotherapy-induced apoptosis. En: European Cytokine Network. Vol. 9, No. 4 (dec. 1998); p. 685–686.

³⁵ INSUASTY. Op cit., p. 27–35.

15. MITOCONDRIA Y APOPTOSIS

El desarrollo evolutivo de las células eucarióticas, se caracterizó por la formación de asociaciones que aumentaban las probabilidades de sobrevivencia y ofrecían beneficios para las bacterias asociadas: como la posibilidad de explotar la energía producida por el oxígeno desarrollado en la atmósfera primitiva (respiración aeróbica), el cual era tóxico para la mayoría de las formas de vida. Como resultado de esta asociación endosimbiótica se formó la mitocondria, este origen endosimbiótico de la mitocondria y la evolución de la respiración aeróbica, determinó que la apoptosis sea un proceso dependiente de energía.

Las células están sometidas a muchos agentes ambientales capaces de dañar la membrana mitocondrial, como estrés oxidativo (hipoxia), radiación ultravioleta, y la sobreexpresión de proteínas como c-Myc y Bax.³⁶

La apoptosis producida por daños en la mitocondria se debe a la alteración de tres mecanismos básicos:

1. Ruptura del transporte de electrones, de la fosforilación oxidativa y de la producción de Adenosin Trifosfato (ATP)
2. Activación de proteínas activadoras de caspasas.
3. Alteración del potencial celular de Oxido-Reducción.

Una consecuencia de los daños en el transporte de electrones es la caída en la producción de energía en forma de ATP. Durante la apoptosis el Citocromo-C se libera de la membrana mitocondrial al citoplasma, activando proteasas como la caspasa-9 produciendo la desintegración bioquímica de la célula. El Citocromo-C citoplasmático, forma en los vertebrados junto a la proteína Apaf-1 y la caspasa-9 el complejo llamado Apoptosoma, capaz de matar a la célula dañada (Ver Figura 8).

³⁶ GREEN, D. R and Reed, J. C. Mitochondria and Apoptosis. En: Science. Vol. 281, No. 5381(aug. 1998); p. 1309-1312.

16. CASPASAS

Los programas de ejecución apoptóticos, se regulan por un grupo de enzimas capaces de destruir a otras proteínas (proteasas). Estas moléculas están constituidas por grandes cantidades de cisteína que al activarse rompen los enlaces peptídicos de las proteínas a las que se unen (cortando residuos de aspartato específicos)

En una célula normal, las caspasas se encuentran como precursores enzimáticos inactivos o zimógenos, la activación de un zimógeno se produce por cortes proteolíticos y reorganizaciones estructurales. Las caspasas son enzimas similares en sus secuencias de aminoácidos, estructura y especificidad además todas tienen tres dominios: un dominio aminoterminal NH₂, una subunidad larga de aproximadamente 20 Kd y una pequeña de 10 Kd (Ver Figura 9).^{38 39}

³⁸ THORNBERRY, N. A and Lazebnik, Y. Caspases: Enemies Within. En: Science. Vol. 281, No.5381(aug. 1998); p.1312–1316.

³⁹ ABUL. Op. cit., p. 41.

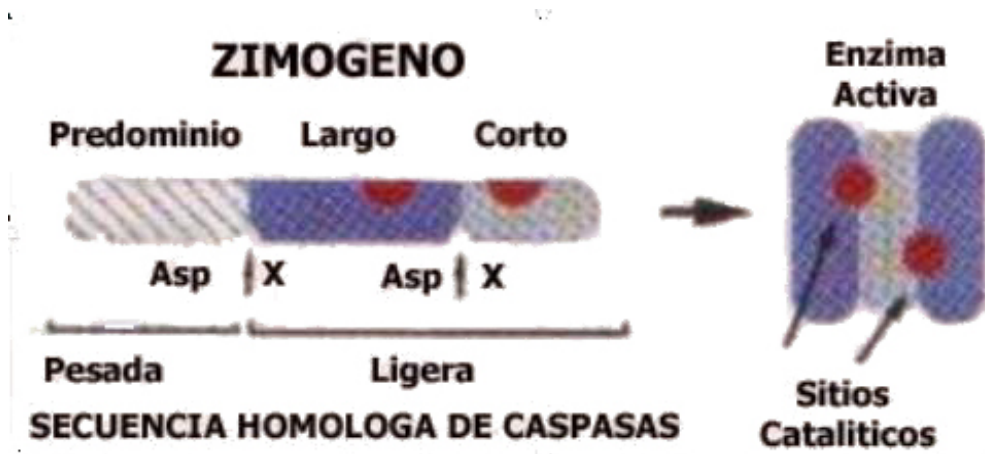


Figura 9. Zimógeno o forma inactiva de las caspasas.⁴⁰

16.1 CASCADAS DE ACTIVACIÓN

Las caspasas se activan como respuesta a dos tipos de estímulos:

1. Estímulos externos: La disminución en la concentración de hormonas y factores de crecimiento activan señales que inducen apoptosis.
2. Estímulos internos: Los daños celulares producidos por agentes tóxicos, radicales libres y radiaciones ionizantes tipo ultravioleta, provocan daños en la estructura mitocondrial y liberación al citoplasma de Cyto-C esencial en la respiración mitocondrial, activando cascadas apoptóticas.

Las caspasas se dividen en iniciadoras y ejecutoras, las iniciadoras se activan por proteólisis como respuesta a señales producidas por otras proteínas; al activarse las caspasas iniciadoras actúan sobre las ejecutoras activándolas en forma de cascada, cortando proteínas importantes para la célula, como endonucleasas que degradan el ADN nuclear y proteínas que desorganizan los filamentos de actina del citoesqueleto celular cambiando la morfología normal de la célula (Ver Figura 10).⁴¹

⁴⁰ Lbid, p. 1312–1316.

⁴¹ Lbid, p. 1312–1316.

Caspasa ejecutora inactiva (zimógeno)

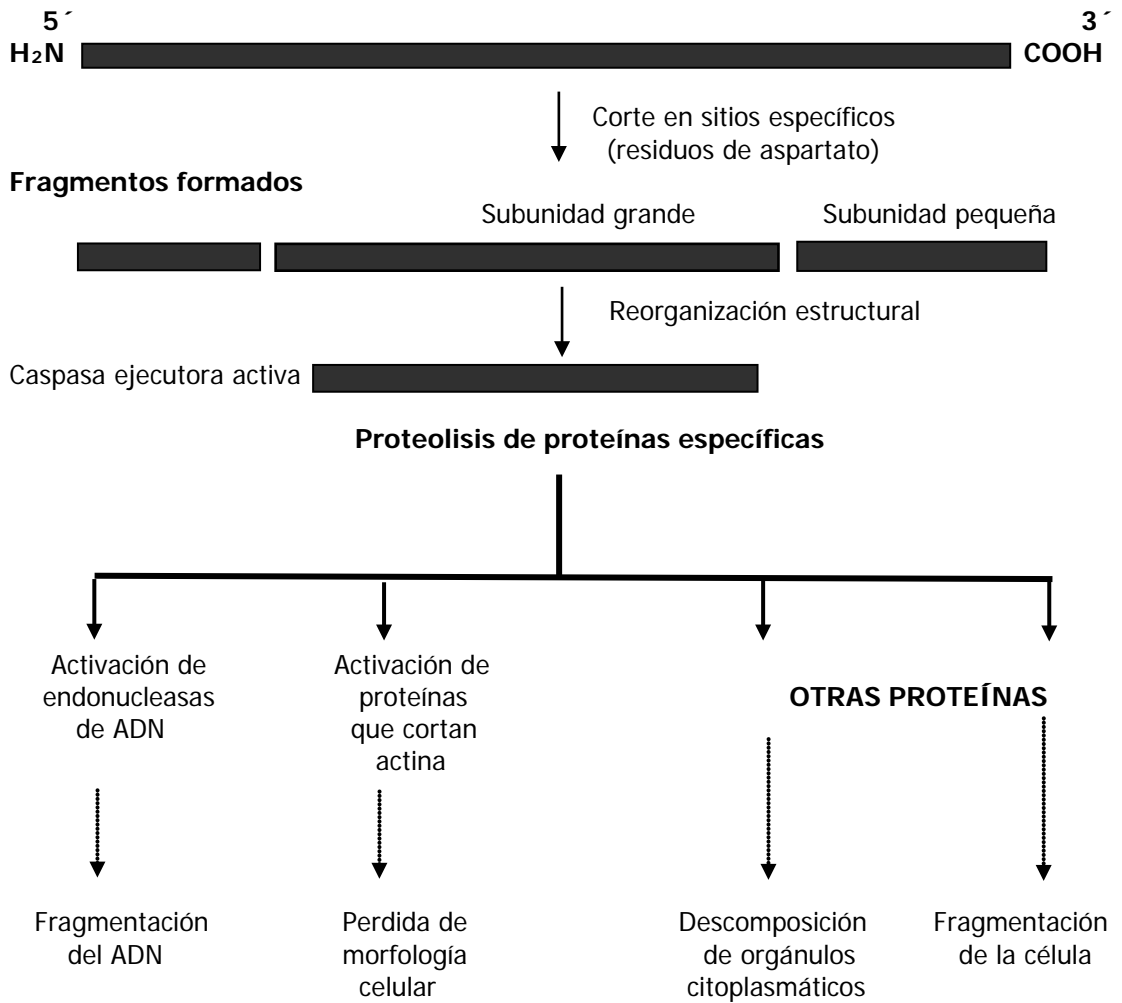


Figura 10. Activación de caspasas de ejecución.⁴²

⁴² ELLIOTT. Op. cit., p. 120.

Las caspasas destruyen una célula a través de tres estrategias:

1. Activan proteínas apoptóticas
2. Destruyen estructuras celulares
3. Alteran la función de proteínas reguladoras, cortando sus sitios catalíticos aumentando o disminuyendo su actividad (Ver Figura 11)

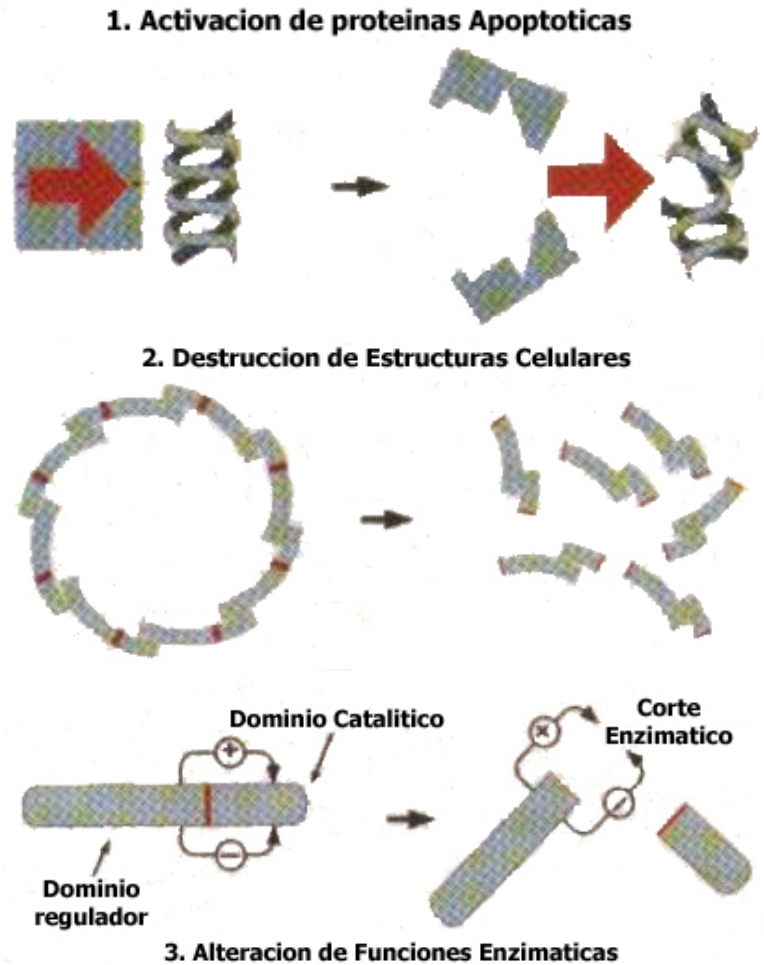


Figura 11. Estrategias de destrucción celular de las caspasas.⁴³

⁴³ THORBERRY. Op. cit., p. 1312–1316.

17. GENÉTICA Y APOPTOSIS

En los organismos multicelulares se ejerce un control estricto sobre los mecanismos de reparación de daños en el ADN. El mal funcionamiento de estos sistemas de vigilancia provoca la proliferación incontrolada de células anormales desarrollándose diversos tipos de cáncer.

Ante un daño en el ADN se activan tres procesos básicos de respuesta:

1. Reparación de daños leves y severos.
2. Detención de los ciclos de división celular.
3. Apoptosis (Ver Figura 12).

En los mamíferos el sistema de reparación más eficiente es el que involucra la respuesta de las proteínas cinasas dependientes de ciclinas (Cdk).

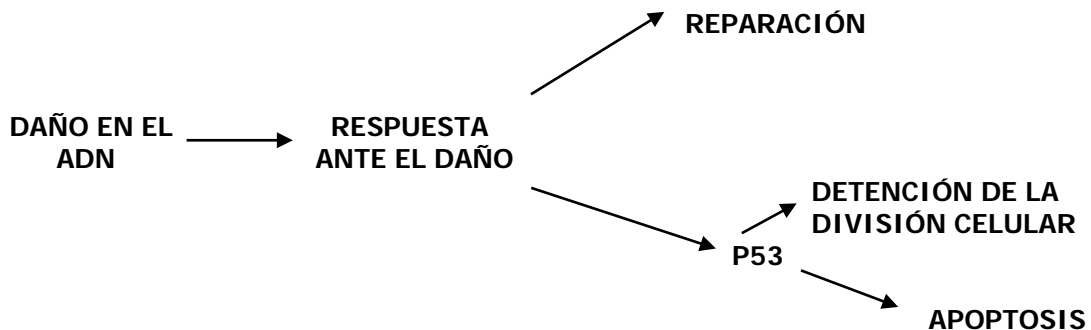


Figura 12. Respuesta celular ante un daño severo en el ADN. ⁴⁴

⁴⁴ EVAN, G. and Littlewood, T. A Matter of Life and Cell Death. En: Science. Vol.281, No 5381(aug. 1998); p. 1317-1322.

17.1 PROTEÍNA p53

La proteína p53 supresora de tumores, es un factor que regula la transcripción genética y en una célula normal se expresa en bajos niveles. Los daños severos en el ADN por lo general producen la fosforilación de esta proteína, activándola y deteniendo el ciclo celular evitando la proliferación de células anormales. Esta proteína también se activa por daños diferentes a los que sufre el ADN, como la falta de metabolitos, daño físico, exceso de calor (Shock térmico), hipoxia y la expresión de oncogenes como el *Myc* y el *E1A*. La proteína p53 es un guardián de la estabilidad del ADN, las células con daños severos en la función de esta proteína, aumentan sus tasas de mutación permitiendo la división incontrolada de células dañadas produciéndose enfermedades como el cáncer.

Una de las causas del desarrollo de tumores en humanos es la alteración funcional del gen supresor de procesos cancerosos p53, además se ha identificado que mutaciones en p53, disminuyen las tasas de transcripción de la proteína CD95 produciendo resistencia a agentes inductores de apoptosis y a drogas anticancerosas. p53, además detiene el ciclo celular en células expuestas a agentes dañinos del ADN, en la fase G1 para reparar los daños, si la reparación no es posible, se induce la apoptosis de estas células.

En infecciones por virus tipo adenovirus, las proteínas víricas que regulan la replicación, como la *E1-B* se une a proteínas mutadas que se encuentran en células tumorales. En una célula normal, la proteína *p53* inhibe la replicación viral al impedir su unión a la proteína *E1-B*.⁴⁵

17.2 PROTEÍNA Myc

El gen *c-Myc* pertenece a una familia de genes expresados en mamíferos, que codifican las proteínas *Myc* (*Oncoproteínas*), relacionadas con procesos cancerígenos y que además actúan induciendo apoptosis. Alteraciones en la expresión de este gen inducen diferentes tipos de cáncer, alterando los ciclos de división de las células cancerosas. Los procesos moleculares de proliferación y muerte celular, a pesar de tener funciones opuestas usan las mismas proteínas, como la *Myc* capaz de actuar en la división celular e inducir muerte celular por apoptosis.

⁴⁵ Lbid, p. 1317–1322.

Las proteínas *c-Myc*, alteran los procesos moleculares del ciclo de división celular, básicamente de dos formas:

1. Su sobreexpresión provoca que las células sufran repetidas divisiones, esta gran actividad mitótica induce errores en los sitios de control del ciclo celular (Checkpoints), generando muchas células con daños en su ADN.
2. Se unen a las moléculas que controlan las fases intermedias del ciclo celular, como las proteínas Ciclinas dependientes de Cinasas (CdK) provocando que las células no se dividan y sufran apoptosis.

Las células cancerosas se caracterizan por tener una gran capacidad de divisiones, esta alteración se deben a los daños estructurales que sufre la proteína *Rb*, encargada de controlar la expresión de genes necesarios para el avance de la fase G1 a la S del ciclo celular.⁴⁶

17.3 RECEPTOR CD95 Y CÁNCER

La inducción de apoptosis por activación del receptor CD95, se produce por diferentes agentes, como el daño en el ADN o la expresión de oncogenes (*c-Myc*), iniciando una cascada de eventos intracelulares, como la formación del Apoptosoma que desintegran proteínas estructurales esenciales (Ver Figura 13)

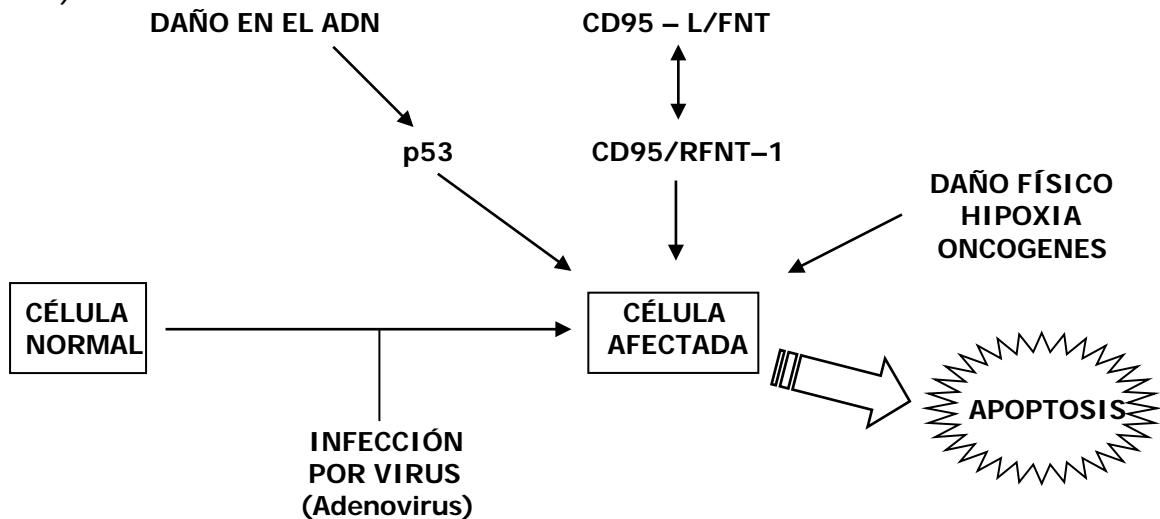


Figura 13. Señales que causan daños severos a una célula activan apoptosis.⁴⁷

⁴⁶ ALBERTS. Op. cit., p. 215.

⁴⁷ EVAN. Op. cit., p. 1317-1322.

17.4 PROTEÍNAS Bcl-2

La familia *Bcl-2*, esta formada por varias proteínas que regulan la apoptosis, especialmente en linfocitos. La sobreexpresión de la proteína *bcl-2* suprime la muerte celular al impedir que las células que la expresan entren en división celular.

La proteína *Bcl-x* presenta dos polimorfismos, la forma "larga" *Bcl-xL* y la forma "corta" *Bcl-xs*; la forma *Bcl-xs* junto a la proteína Bax conforman un complejo que estimula la muerte celular al inducir a las células a entrar más rápido al ciclo celular(Ver Tabla 5).

Tabla 5. Proteínas Bcl-2 reguladoras de apoptosis

Familia de proteínas Bcl-2	
Antiapoptoticas	Proapoptoticas
Bcl-2, Bcl-xL	Bax
Mcl-1	Bcl-xs
A-1	Bak
Bhrf-1 (Virus EPSTEIN-BAR)	Bik
CED-9 (C. elegans)	Bad
P35 (BACULOVIRUS)	

Los niveles de expresión de las proteínas *Bcl-2* y *Bcl-xL* durante las etapas de maduración de los linfocitos determinan la susceptibilidad a la apoptosis, así la alta expresión de *Bcl-2* o *Bcl-xL* aumenta la supervivencia de los linfocitos y la respuesta de anticuerpos; y el bloqueo en la expresión de *Bcl-2* y *Bcl-xL* aumentan las tasas de muerte de linfocitos inmaduros. Se ha postulado que la larga vida de los linfocitos de memoria puede deberse a la expresión constitutiva de *Bcl-2* o *Bcl-xL*, pero esta hipótesis no se ha probado.⁴⁸

⁴⁸ ADAMS, J. M and Cory, Z. The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. En: Science. Vol. 281, No. 5381(aug. 1998); p. 1322-1326.

18. CITOMETRÍA DE FLUJO

La citometría de Flujo es una técnica basada en el análisis individualizado de células o partículas en suspensión frente a una fuente de luz, recogiendo la dispersión de luz generada por las células y los compuestos fluorescentes unidos a ellas para procesar la información en un sistema digital (ordenador). La citometría puede medir el tamaño relativo de una célula, la granulocidad o complejidad interna y la intensidad relativa de una fluorescencia.

Esta técnica detecta como una célula interactúa con la luz de un rayo láser, generando información sobre la dispersión de la luz producida por la célula y el tipo de fluorescencia que emite (Ver Figura 14).⁴⁹

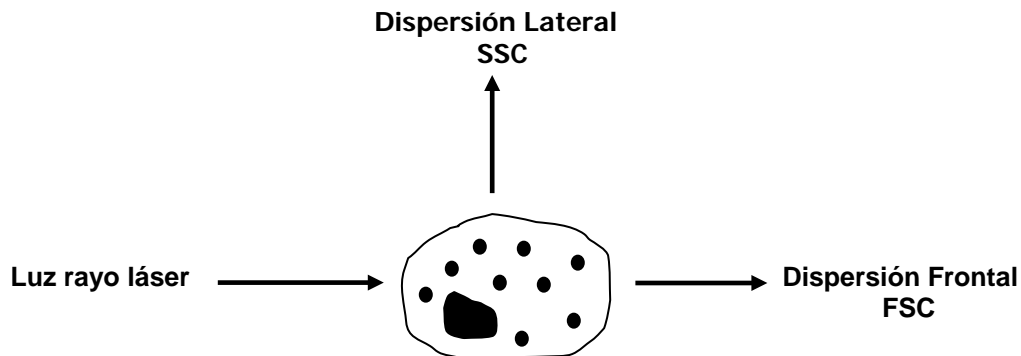


Figura 14. Dispersión de luz láser por una célula

18.1 DISPERSIÓN FRONTAL (FSC)

- La difracción o luz dispersada por el contorno de las partículas es proporcional al tamaño de la célula y se recogen en ángulos entre 0.5° y 2° respecto a la luz incidente.

⁴⁹ ESTADOS UNIDOS. CELLQuest Software Reference Manual. Becton Dickinson and Company. 1997. p.193–195.

- La refracción, producida por el cambio en el índice de refracción de las células respecto al medio se relaciona con la estructura interna de la célula y se recoge en ángulos entre 2° y 15°.
- Las señales de dispersión y refracción son recogidas en detectores de dispersión frontal–Forward Scatter (Ver Figura 15)

18.2 DISPERSIÓN LATERAL (SSC)

- La reflexión de la luz y la refracción forma grandes ángulos (90°) respecto a la luz incidente.
- Es proporcional a la granulocidad o complejidad interna de la célula.
- La información producida se recoge en detectores de dispersión lateral–Side Scatter (Ver Figura 15).⁵⁰

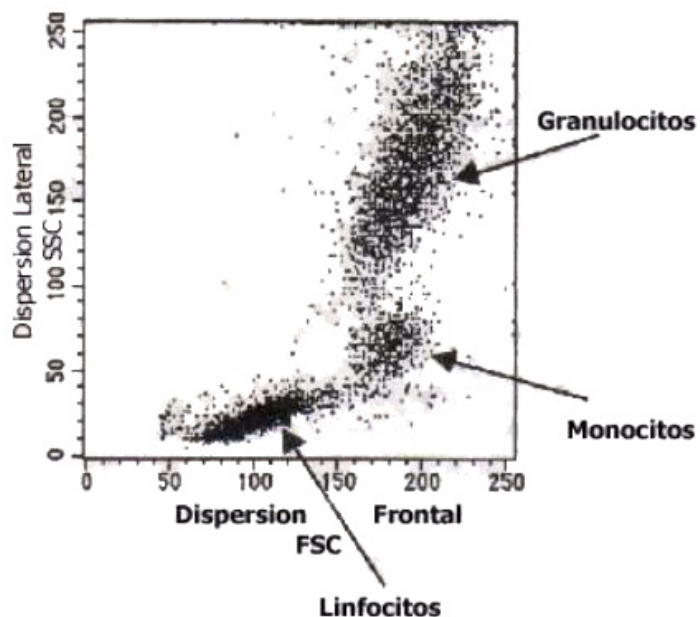


Figura 15. Dispersión frontal (FSC) y lateral (SSC) del rayo láser

⁵⁰ Lbid, p. 193.

18.3 FLUORESCENCIA

Además de las características físicas celulares, también se pueden valorar las propiedades bioquímicas de las células, a través de la dispersión de luz de fluorocromos o compuestos fluorescentes unidos a ellas. Los fluorocromos son compuestos que absorben luz a partir de una determinada longitud de onda y emite fotones a un nivel energético inferior (mayor longitud de onda). En citometría de flujo los anticuerpos monoclonales más utilizados son la Fluoresceína, Ficoeritrina, Peridín–Clorofila y Ficoeritrina–Cianina 5 (Ver Tabla 6)

Tabla 6. Longitud de onda fluorocromos usados en citometría de flujo⁵¹

Fluorocromo	Longitud de onda emitida
Fluoresceína (FITC)	519 nm
Ficoeritrina (PE)	578 nm
Peridín–Clorofila (PerCP)	675 nm
Ficoeritrina–Cianina 5 (PECy5)	670 nm

18.4 SISTEMAS EN CITOMETRÍA DE FLUJO

Un citómetro de flujo se componen de tres partes:

1. **Sistemas de Fluidos:** El sistema hidráulico busca que las células o partículas en suspensión pasen individualmente frente a la fuente de luz y que permanezcan en el centro del fluido.
2. **Sistemas Ópticos:** Después que las células pasan frente a la fuente de luz, se producen la dispersión de la luz incidente y la emisión de fluorescencias. Estas longitudes de onda se conducen por un sistema de lentes y filtros hacia detectores específicos.

La excitación óptica, se produce por un rayo de luz láser.

La detección óptica, se debe a espejos y filtros ópticos que enfocan las longitudes de onda a sus detectores ópticos de fluorescencia

3. **Sistemas Electrónicos:** Luego que el sistema óptico ha clasificado las señales producidas por las células al chocar con el láser, son detectadas por sensores que transforman la luz en pulsos eléctricos y valores digitales para procesarlos por sistemas informáticos. (Ver Figura 21).⁵²

⁵¹ Lbid, p. .194.

⁵² Lbid, p. 195.

18.5 APLICACIONES CLÍNICAS DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO

La Inmunofenotipificación de leucocitos consiste en clasificar células por la presencia de antígenos en su superficie celular, la que se determina por el uso de anticuerpos contra esos antígenos. Por ejemplo: una célula es positiva para el antígeno CD4 si forma un complejo con un anticuerpo monoclonal conjugado con un fluorocromo, que emite una fluorescencia al ser excitado por la luz del rayo láser clasificando a la célula como CD4+. Además, la célula puede ser expuesta a dos anticuerpos monoclonales conjugados con diferentes fluorocromos, que emiten dos longitudes de onda distintas, esta Inmunofenotipificación a dos colores permite la caracterización simultánea de dos sitios de antígenos separados en cada célula.⁵³

⁵³ COLIGAN, J. E. *et al.* CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY. U.S.A: John Wiley & Sons, 1995.

19. HIPÓTESIS

La expresión genética de la proteína superficial CD95(FAS/APO-1) (inductora de apoptosis) en linfocitos T humanos de individuos sanos aumenta con la edad al igual que la expresión de la proteína CD45RO (marcador de células T de memoria).

20. DISEÑO EXPERIMENTAL Y MÉTODOS

20.1 TIPO DE ESTUDIO

Estudio descriptivo, de corte transversal con grupos etáreos específicos.

20.2 SELECCIÓN DE LA POBLACIÓN DE ESTUDIO

Población formada por treinta y cuatro personas de diferentes grupos etáreos (desde recién nacidos hasta personas mayores de sesenta años), sin antecedentes patológicos importantes, habitantes de la ciudad de Popayán

20.3 CRITERIOS DE INCLUSIÓN

- ❖ Personas saludables sin patologías graves durante su vida.
- ❖ Recién nacidos de madres sanas.

20.4 CRITERIOS DE EXCLUSIÓN

- ❖ Haber estado hospitalizado(a) antes de la toma de sangre.
- ❖ Haber padecido enfermedades virales severas en los seis meses previos a la toma de sangre o con antecedentes patológicos graves.
- ❖ Consumo habitual de medicamentos, alcohol o cigarrillo.
- ❖ Niveles elevados de estrés.

Las personas seleccionadas para el estudio, respondieron un cuestionario (Ver Anexo A), diseñado para conocer su estado de salud, sexo, historia familiar, estado nutricional, niveles de estrés, tipo de dieta y hábitos deportivos, además firmaron un consentimiento voluntario, que explicaba la importancia y los objetivos del estudio, luego las muestras de sangre de cada persona se procesaron en el laboratorio de Inmunología y Enfermedades Infecciosas de la Universidad del Cauca.

21. TIPIFICACIÓN INMUNOLÓGICA DE LAS MOLÉCULAS CD45RO Y CD95 (FAS/APO-1)

5,0 mL de sangre total fresca de cada persona se usaron en un leucograma buscando estudiar las distintas poblaciones celulares y descartar alteraciones en su fórmula leucocitaria.

A 25,0 μ L de las muestras de sangre periférica se les adicionó 10,0 μ L de cada anticuerpo monoclonal, así:

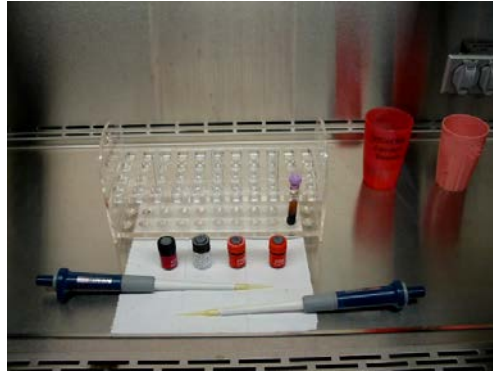
Tubo 1: Gammaglobulina Hiperimmune: usada como control negativo de fluorescencia.

Tubo 2: PerCP-ANTI HUMAN-CD3 / PE-ANTI HUMAN-CD45RO: usados para identificar linfocitos T y células T de memoria.

Tubo 3: PerCP-ANTI HUMAN-CD3 / PE-ANTI HUMAN-CD95 (FAS/APO-1): usados para identificar linfocitos T y células T en apoptosis.

Posteriormente cada tubo se llevó a Vórtex por 5 segundos y se incubó a temperatura ambiente ($\pm 24^{\circ}\text{C}$) por 20 minutos, se agregaron 450 μ L de solución lisante de eritrocitos (FACSLysing, Becton & Dickinson), se mezcló con Vórtex por 10 segundos, se incubó de nuevo a temperatura ambiente por 5 minutos, se centrifugó a 2500 revoluciones por minuto (rpm) y se descartó el sobrenadante, se resuspendió hasta 1,0 mL con solución salina fosfatada (PBS) 1X, se centrifugó de nuevo a 2500 rpm y se descartó el sobrenadante, las muestras obtenidas se resuspendieron en 500 μ L de PBS.

El botón celular obtenido se llevó al Citómetro de Flujo FACSCalibur (Becton & Dickinson. San José. Ca. U.S.A) para su análisis mediante el software CELLQuest, o se conservó a 4°C en la oscuridad por 24 o 48 horas



Fotografía 1. Cámara de flujo laminar



Fotografía 2. Citómetro de Flujo FACSCalibur, soportado en un sistema Power Mac G4

22. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

22.1 ANÁLISIS DE VARIANZA

El análisis univariable de ANOVA se aplicó para determinar la influencia de la edad sobre la expresión de las proteínas CD45RO y CD95 (FAS/APO-1).

22.2 CORRELACIONES

Para establecer si existe correlación entre la edad y la expresión de las proteínas CD45RO y CD95(FAS/APO-1), se utilizó el índice de correlación paramétrico de **Pearson** y el no paramétrico de **Spearman**.

22.3 CORRELACIÓN LINEAL

Para identificar si existe correlación lineal entre la edad y la expresión de las proteínas CD45RO y CD95(FAS/APO-1) se aplicó el coeficiente de correlación de **Pearson**.

Las pruebas estadísticas aplicadas se analizaron mediante el Software SPSS para Windows. Se consideraron como significativas las diferencias relacionadas con valores de probabilidad de **p** iguales o menores a **0.05**. Los datos se presentan como media más o menos la desviación estándar.

23. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

23.1 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GRUPO DE ESTUDIO

La población de estudio incluyó a treinta y cuatro personas saludables, seleccionadas según los criterios de inclusión y exclusión descritos anteriormente agrupadas en cuatro categorías de edad.

La edad media de la población fue veintiún años (rango: 1 a 41 años), la mayoría de las personas (29.5%) tenían entre 5 y 13 años de edad (Ver Tabla 8)

Tabla 7. Categorías formadas según la edad

Categorías	Rango de edad*	N (%)
1	0 – 5.33	8 (23.5)
2	5.75 – 13	10 (29.5)
3	13.14 – 38	8 (23.5)
4	42 – 69	8 (23.5)
		N = 34 (100%)

* Rangos establecidos mediante el software SPSS

Al analizar las proporciones entre hombre y mujeres, se observa que los hombres representan el 68% de la población y las mujeres representan el 32% (Ver Tabla 9)

Tabla 8. Características generales de la población

Características	N (%)
1. SEXO	
Mujeres	11 (32)
Hombres	23 (68)
2. EDAD (años)^a	
0 – 5.33	8 (23.5)
5.75 – 13.0	10 (29.5)
13.14 – 38	8 (23.5)
42 – 69	8 (23.5)
Media ± Ds	20.85 ± 20.34
3. PROCEDENCIA	
Rural	3 (8)
Urbana	31 (92)

a= Rangos de edad determinados por el software SPSS

Ds = Desviación estándar

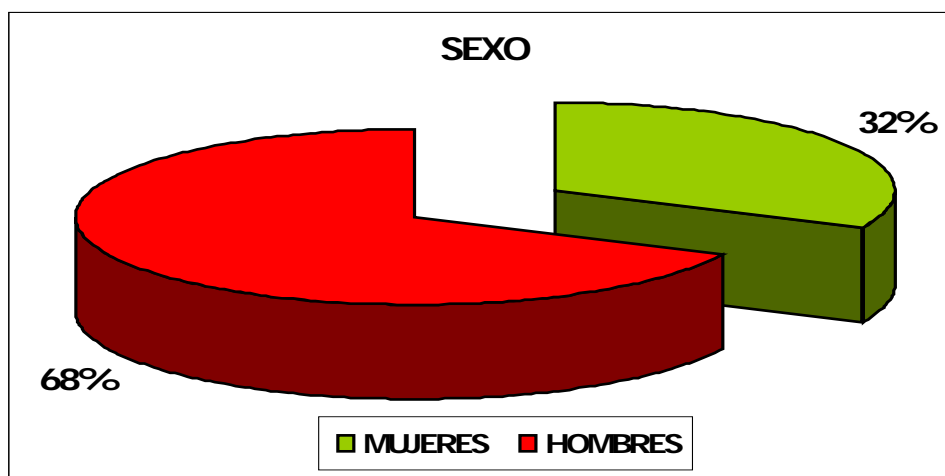


Figura 16. Proporciones entre sexos

El análisis de las encuestas muestra que la población vivía en zonas geográficas similares, ya que el 92% de las personas encuestadas procedían de las zonas urbanas de Popayán y solamente tres (equivalentes al 8% de la población) procedían de la cabecera municipal (específicamente de Piendamó, Tunía y Cajibío)

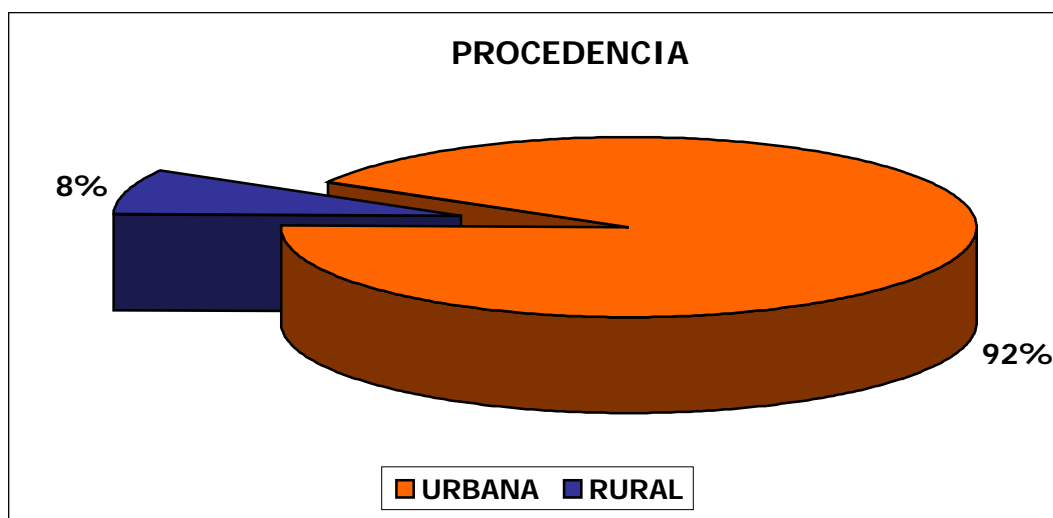


Figura 17. Procedencia.

23.2 DESARROLLO Y ESTADO NUTRICIONAL

Para garantizar el buen estado de salud de las personas incluidas en el estudio, se aplicaron diferentes pruebas y se tomaron como normales rangos de talla y peso reportados en cuadros usados en programas de control de desarrollo en entidades de salud, para los niños menores de trece años se utilizó como control el Cuadro Crecimiento–Pondo Estatural del Instituto Colombiano de Bienestar Familiar (I.C.B.F) (Ministerio de Salud, INSTITUTO COLOMBIANO DE BIENESTAR FAMILIAR, Subdirección de prevención, 2000), y para las personas mayores de veinticinco años se usó el Índice de Masa Corporal (IMC) publicado por la Organización Mundial de la Salud (Disponible en Internet: <<http://www.zonadiet.com/tablas/bmi.htm>> ©1999-2000 Zonadiet)

23.3 RECIÉN NACIDOS SANOS

Los recién nacidos, tuvieron un peso y talla característicos de un recién nacido sano; ya que su peso medio fue 3.5 ± 0.2 Kg (rango normal: 3–4Kg) y su talla 52 ± 0.009 cm (rango normal: 50–60cm) (Ver Tabla 10). Además al estudiar las historias clínicas de las cinco madres escogidas (previa autorización), no se encontró ninguna complicación producida por virus o infecciones bacterianas durante el embarazo y todas cumplieron con los programas normales de control prenatal.

Tabla 9. Peso y talla – niños sanos recién nacidos

N	Peso (Kg) Media \pm Ds	Rango normal	Talla (Cm) Media \pm Ds	Rango normal
5	3.5 ± 0.2	3 – 4	52 ± 0.009	50 – 60

Ds = Desviación estándar

23.4 CRECIMIENTO Y DESARROLLO NORMAL NIÑOS DE 5 Y 13 AÑOS

Para los niños de 5 y 13 años, se tomó como referencia el Cuadro Crecimiento–Pondo Estatural de 5 a 18 años publicado por el Ministerio de salud y el Instituto Colombiano de Bienestar Familiar (I.C.B.F) (Ministerio de Salud, INSTITUTO COLOMBIANO DE BIENESTAR FAMILIAR, Subdirección de prevención, 2000), usado para controlar el desarrollo normal de los niños entre 5 y 13 años inscritos en los programas de promoción y prevención del Hospital del Norte, Saludcoop y del Real Colegio San Francisco de Asís de la ciudad de Popayán.

Los niños de 5 años de edad (equivalentes al 26.5% de la población), presentaban un desarrollo y crecimiento normal, ya que su peso y talla estaban dentro de los rangos normales, peso medio 21.5 ± 2 Kg (rango normal: 15–23Kg), talla media 117.3 ± 0.03 cm (rango normal: 102–119cm) (Ver Tabla 11)

Los seis niños de 13 años (correspondientes al 18% de la población), también mostraron esta misma tendencia, peso medio 45.5 ± 4 Kg (rango normal: 37–55Kg), talla media 157 ± 0.03 cm (rango normal: 141–171cm) (Ver Tabla 11)

Tabla 10. Peso y talla – niños de 5 y 13 años

Edad (Años)	N	Peso (Kg) Media \pm Ds	Peso normal ^a Media \pm Ds	Talla (Cm) Media \pm Ds	Talla normal ^b Media \pm Ds
5	9	21.5 ± 2	19 ± 4	117.3 ± 0.03	110 ± 8
13	6	45.5 ± 4	46 ± 9	157 ± 0.03	156 ± 15

^{ab} = Valores normales reportados: Cuadro Crecimiento–Pondo Estatural de 5 a 18 años
 * Ministerio de Salud, Instituto Colombiano de Bienestar Familiar (ICBF), Subdirección de Prevención
 Ds = Desviación estándar

23.5 ESTADO NUTRICIONAL

El cuadro de Índice de Masa Corporal (IMC), publicado por la Organización Mundial de la Salud (Disponible en Internet: <<http://www.zonadiet.com/tablas/bmi.htm>> ©1999-2000Zonadiet), esta diseñado para determinar si una persona por su tamaño físico esta por debajo, dentro o excedida de su peso normal.

La ecuación matemática usada es:

$$\text{IMC} = \text{PESO ACTUAL}/(\text{ALTURA})^2$$

Donde: Peso actual expresado en Kilogramos (Kg)

Altura expresada en Metros (Mt)

Lo recomendado para un estado nutricional bueno, es que el valor del IMC se encuentre entre 20 y 25.

Tabla 11. Índice de masa corporal (IMC)

Valor mínimo	Diagnóstico	Valor máximo
< de 16	Deficiencia nutricional en 3 ^{ER} grado	16
16	Deficiencia nutricional en 2 ^{DO} grado	17
17	Deficiencia nutricional en 1 ^{ER} grado	18.5
18.5	Bajo peso	20
20	Normal	25
25	Sobrepeso	30
30	Obesidad	35
35	Obesidad marcada	40
40	Obesidad mórbida	> de 40

* Disponible en Internet: <<http://www.zonadiet.com/tablas/bmi.htm>> ©1999-2000 Zonadiet>

Este índice se aplicó a un grupo de catorce personas (correspondientes al 41% de la población), seleccionadas por su edad (mayores de 25 años, ya que esta prueba se aplica a personas mayores de 20 años), quienes presentaron un promedio de 22 a 24 en su I.M.C, mostrando que estas personas presentaban un adecuado estado de salud, ya que un individuo sano presenta un rango entre 20 y 25. (Ver Tabla 13).

Tabla 12. Índice de Masa Corporal – personas mayores de 25 años

I.M.C.	
Media ± Ds	Rango normal
(N=14)	
24 ± 2	20 – 25

Ds = Desviación estándar

23.6 HÁBITOS ALIMENTICIOS

El buen estado de salud de una persona se regula directamente por el tipo de alimento que consume, una dieta equilibrada suministra al organismo todas las sustancias necesarias para mantener un crecimiento normal y una reparación eficiente de los tejidos dañados. Una alimentación balanceada debe contener proteínas, grasas, carbohidratos, vitaminas, minerales y agua; además la cantidad de alimento debe ser la suficiente para cumplir con las necesidades energéticas del organismo.

(Disponible Internet: <http://www.drscope.com/privados/pac/pediatria/pal2/va_loraci.htm>)

Para conocer el balance en la dieta de todas las personas del estudio, se les preguntó el tipo de alimentos y el número de veces que los ingerían al día. Las respuestas a las encuestas muestran que todas las personas decían incluir en su dieta frutas, el 94% consumían carne, el 85% comían verduras, el 76% y 74% consumían cereales y arroz respectivamente, mientras que los alimentos menos consumidos eran las pastas (solamente el 47% de las personas las consumían) y sólo 12 personas (equivalentes al 35%) comían fritos (Ver Tabla 14). En general los alimentos incluidos en la dieta de la población eran balanceados y en promedio las personas consumían tres porciones de alimento al día.

Tabla 13. Alimentos incluidos en la dieta

Número comidas al día	Tipo de alimento consumido habitualmente N (%)						
	Frutas	Carne	Verduras	Cereales	Arroz	Pastas	Fritos
3	34 (100)	32 (94)	29 (85)	26 (76)	25 (74)	16 (47)	12 (35)

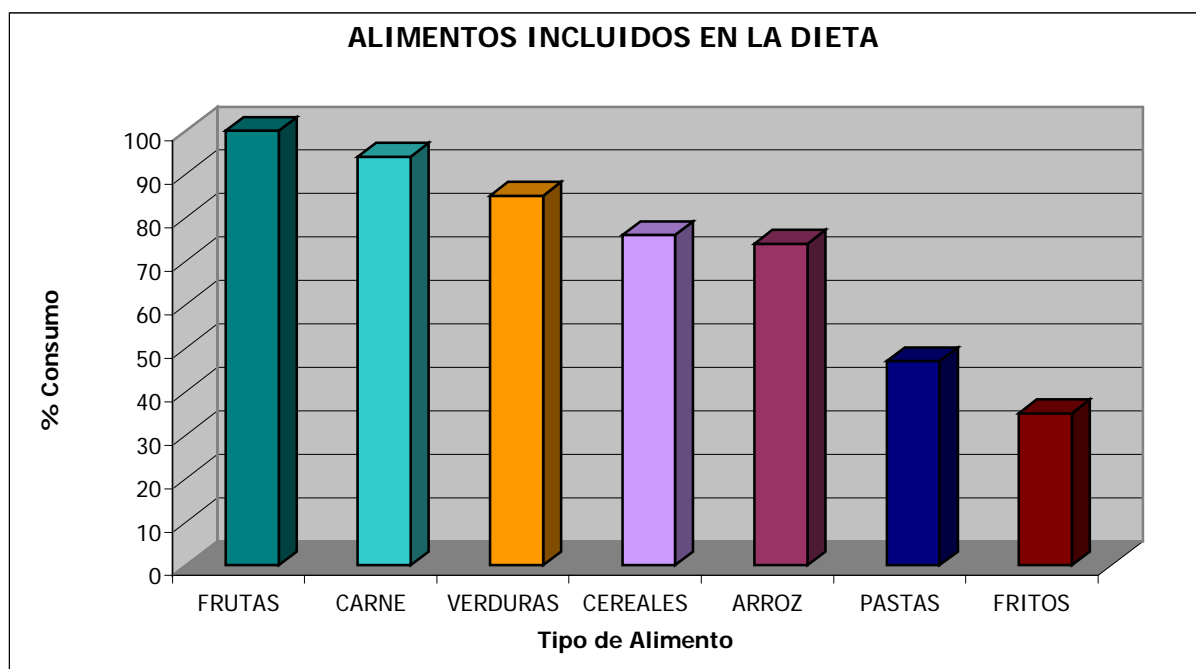


Figura 18. Alimentos más frecuentes en la dieta de la población.

23.7 HÁBITOS DEPORTIVOS

De las treinta y cuatro personas incluidas en el estudio, 11 de ellas (equivalentes al 32%) practicaban regularmente al menos un deporte (natación, fútbol, ciclomontañismo o atletismo), este grupo estaba formado por estudiantes, profesores y administrativos de la Universidad del Cauca, quienes tenían una edad media de treinta y cinco años (rango: 25 a 43 años), estas personas llevaban en promedio doce años practicando un deporte y siete de ellas (equivalentes al 64% de este grupo) por lo general lo hacían dos veces a la semana, dedicando mínimo dos horas a cada sesión de práctica (Ver Tabla 15). Estos datos muestran que este grupo de personas eran regulares en sus rutinas deportivas y que llevaban muchos años practicándolas.

Tabla 14. Hábitos deportivos

N	Edad (Años) Media \pm Ds	Años práctica	Número sesiones Media \pm Ds	Horas por sesión	Intensidad N (%)	
					Diaria	Semanal
11	34.5 \pm 9	12	3 \pm 2	2 \pm 0.6	4 (36)	7 (64)

Ds = Desviación estándar

23.8 NIVELES DE ESTRÉS

Estudios como el de Yin *et al*, 2000, muestran que la tensión fisiológica y el estrés físico pueden aumentar o suprimir el sistema inmune en humanos y animales, además el estrés induce cambios en la expresión de la molécula CD95 y disminuye el número total de linfocitos, aumentando la susceptibilidad a diferentes enfermedades; por esto fue muy importante asegurar que las personas incluidas en el estudio tuvieran niveles bajos de estrés, para lo cual se diseñó un cuestionario de trece preguntas para conocer los niveles habituales de estrés de un grupo formado por catorce personas (equivalentes al 41% de la población) quienes se seleccionaron por su edad (mayores de 25 años), actividad laboral y académica, no se incluyeron en este grupo a los niños recién nacidos, ni a los de cinco y trece años por considerar que ellos no sufren de estrés elevado.

Al analizar los resultados, se observó que el 87% de las respuestas fueron negativas y solamente el 13% fueron positivas; estos resultados muestran que las personas encuestadas tenían niveles muy bajos de estrés y poca probabilidad de presentar alguna enfermedad relacionada con este, como deficiencias inmunes (conteos bajos de leucocitos), alteraciones cardíacas, alergias, infecciones respiratorias o por hongos (micosis) y alteraciones gastrointestinales (ulceras) (Ver Tabla 16).

Tabla 15. Respuestas – cuestionario sobre niveles de estrés

Preguntas	Respuestas	
	SI	NO
1. ¿Se siente cansado(a) aunque haya dormido suficiente?	3 (21)	11 (79)
2. ¿Se siente frustrado (a) al tener que realizar sus labores diarias?	1 (7)	13 (93)
3. ¿Se siente de mal genio, irritado (a) o impaciente por pequeños inconvenientes?	2 (14)	12 (86)
4. ¿Tiende a sentirse enfermo(a)?	0 (0)	14 (100)
5. ¿Está comiendo más o menos, o tomando más tinto de lo usual?	2 (14)	12 (86)
6. ¿La comunicación con su jefe, compañeros, amigos o familia es conflictiva?	1 (7)	13 (93)
7. ¿Se le olvidan las cosas?	7 (50)	7 (50)
8. ¿Tiene dificultad en concentrarse?	2 (14)	12 (86)
9. ¿Se siente aburrido(a)?	1 (7)	13 (93)
10. ¿Siente tensión muscular en el cuello, la espalda y cintura?	1 (7)	13 (93)
11. ¿Le duele la cabeza y siente presión en el pecho?	1 (7)	13 (93)
12. ¿Se duerme pensando en sus problemas o en lo que hay que hacer mañana?	1 (7)	13 (93)
13. ¿Se desahoga llorando o hablando con un amigo (a) sobre lo que le aqueja?	2 (14)	12 (86)
Porcentajes	13%	87%



Figura 19. Respuestas sobre niveles de estrés

23.9 HALLAZGOS CELULARES

23.9.1 Conteo de leucocitos totales. En general los conteos de leucocitos totales de cada persona, muestran valores normales. Para disminuir la variabilidad en los conteos, las muestras se agruparon por rangos de edad (Ver Tabla 17). Al analizar la Tabla 17 se observa que las personas que regularmente practicaban al menos un deporte, presentan una leve leucocitosis, hallazgo coincide con los resultados de Kratz *et al*, 2002, donde se estudio la influencia de la actividad deportiva sobre los conteos celulares totales y se encontró una leve leucocitosis en participantes de maratones.

Tabla 16. Conteo de leucocitos totales

Edad (Años)	N	Conteo absoluto (Cel/mL) Media ± Ds	Rango normal
Recién nacidos	5	12.380 ± 2.913	10.000 – 16.000
5	9	6.544 ± 1.800	5.000 – 10.000
13	6	6.617 ± 2.174	5.000 – 10.000
25	6	5.660 ± 1.242	5.000 – 10.000
40	5	7.317 ± 2.770	5.000 – 10.000
> 60	3	5.533 ± 1.823	3.500 – 10.000

Ds = Desviación estándar

23.9.2 Conteo diferencial de leucocitos. Los conteos diferenciales de leucocitos, también muestran que en general la población presentaba porcentajes normales de leucocitos polimorfonucleares, monocitos y eosinófilos. Los porcentajes de linfocitos presentaban un ligero aumento, con valores entre 29.3% y 51.3% (rango normal: 20%-40%), este aumento se debió a la leucocitosis encontrada en las personas que practicaban deporte (Ver Tabla 18)

Tabla 17. Porcentajes absolutos de leucocitos

Células	Porcentaje Media \pm Ds	Rango normal
POLIMORFONUCLEARES	50.4 \pm 12%	40% - 70%
LINFOCITOS	40.3 \pm 11%	20% - 40%
MONOCITOS	4.9 \pm 3%	0% - 10%
EOSINÓFILOS	5.5 \pm 5%	0% - 6%

Ds = Desviación estándar

24. PORCENTAJES DE EXPRESIÓN PROTEÍNAS SUPERFICIALES CD45RO Y CD95(FAS/APO-1)

La expresión de las proteínas CD45RO y CD95(FAS/APO-1) se analizaron por persona, a través de un inmunofenotipo.

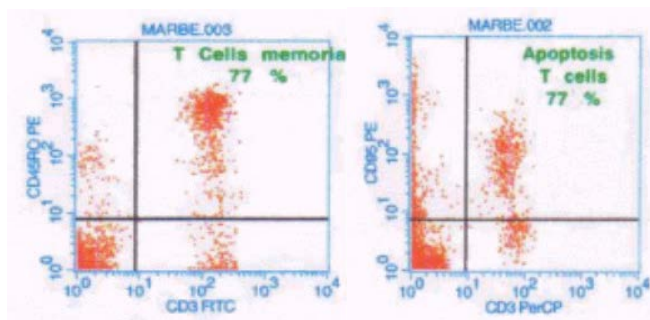


Figura 20. Expresión proteínas CD45RO-PE y CD95-PE(FAS/APO-1).

Para determinar la influencia de la edad sobre la expresión de las proteínas CD45RO y CD95, se utilizó el análisis de varianza (ANOVA de una vía), y para establecer el tipo de relación entre la edad y la expresión de estas proteínas, se usaron los coeficientes de relación de Pearson (Correlación lineal) y de Spearman.

24.1 ANÁLISIS DE VARIANZA

Al analizar los porcentajes de expresión de la proteína CD45RO se obtuvo un valor medio de $58 \pm 16\%$ en los linfocitos T estudiados, mientras que el valor medio de expresión de CD95(FAS/APO-1) fue $71 \pm 14\%$ (Ver Cuadro 1).

Aunque en este estudio no se analizaron las subpoblaciones de linfocitos T CD4+, los promedios de expresión de la proteína CD45RO coincide con las publicaciones de Austran *et al*, 1997, donde se reporta un promedio de $55 \pm 19\%$ en la expresión de esta proteína en linfocitos T CD4+ de personas sanas, y con los datos obtenidos por Chheda *et al*, 1996, donde el porcentaje promedio de expresión reportado en personas sanas es de $55 \pm 9\%$.

Cuadro 1. ANOVA por cada factor

Descriptivo

	N	Media	Desviación típica	Error típico	Intervalo de confianza la media al 95%		Mínimo	Máximo
					Límite inferior	Límite superior		
Expresión CD95	1	,7363	,22652	,08009	,5469	,9256	,28	,99
	2	,6600	,09165	,02898	,5964	,7256	,48	,78
	3	,6975	,12372	,04374	,5941	,8009	,54	,88
	4	,7413	,11740	,04151	,6431	,8394	,54	,91
	Total	34	,7059	,14328	,02457	,6559	,7559	,28
Expresión CD45RO	1	,4313	,19313	,06828	,2698	,5927	,16	,68
	2	,5810	,09837	,03111	,5106	,6514	,46	,76
	3	,6013	,12933	,04573	,4931	,7094	,40	,73
	4	,7012	,07279	,02573	,6404	,7621	,57	,77
	Total	34	,5788	,15575	,02671	,5245	,6332	,16

24.2 ANOVA UNIVARIANTE

Al aplicar el análisis estadístico ANOVA univariable, se puede determinar que la edad influye sobre la expresión de la proteína CD45RO, ya que se muestra una diferencia altamente significativa ($p < 0.05$) en los porcentajes de expresión de esta proteína entre los grupos de edad formados ($F=5.936$, $p=0.003$). Esta misma prueba muestra que la edad no influye sobre la expresión de la proteína CD95, ya que no se encontró una diferencia

estadísticamente significativa ($P>0.05$) en los porcentajes de expresión de esta proteína entre los grupos de edad. ($F=0.611$, $p=0.613$) (Ver Cuadro 2)

Cuadro 2. **ANOVA** univariante

ANOVA

		Suma cuadrados	gl*	Media cuadrática	F**	Sig.***
Expresión CD95	Inter-	,039	3	,013	,611	,613
	Intra-	,638	30	,021		
	Total	,677	33			
Expresión CD45RO	Inter-	,298	3	,099	5,936	,003
	Intra-	,502	30	,017		
	Total	,801	33			

* gl=Grados de libertad

** F= Probabilidad

*** Sig= Significancia

24.3 CORRELACIONES PARAMÉTRICAS Y NO PARAMÉTRICAS

24.4 PROTEÍNA CD45RO

Mediante las pruebas paramétricas de **Pearson** y no paramétrica de **Spearman**, se puede determinar que existe una relación directa entre la edad y la expresión de la proteína CD45RO (**Correlación de pearson=0.61, p=0.000; Correlación de Spearman=0.652, p=0.000**) (Ver Cuadros 3 y 4). Esta tendencia concuerda con los datos publicados por Sánchez-Guerrero *et al*, 1999, en los que se reporta un aumento en las células T de memoria (CD45RO+) con la edad y con los estudios de Kuss *et al*, 2003 y Potestio *et al*, 1999, donde se muestra un incremento en los linfocitos T CD8 de memoria (CD8+/CD45RO+) con la edad. Además los datos obtenidos no coinciden con los publicados por Meuch *et al*, 2003, donde se reporta un aumento de linfocitos T de memoria (CD45RO+) en fetos humanos, ya que la mayor expresión de esta proteína se encontró en las personas mayores de 60 años.

24.5 PROTEÍNA CD95(FAS/APO-1)

Al aplicar estas mismas pruebas de correlación a los porcentajes de expresión de la proteína CD95, se observa que no existe una relación directa entre la edad y la expresión de esta proteína (**Correlación de Pearson=0.115, p=0.517; Correlación de Spearman=0.107 p=0.547**) (Ver Cuadros 3 y 4), esta tendencia se debe a que la variabilidad de la primera categoría de edad formada contiene las otras variabilidades de las categorías de edad (Ver Figura 21).

Cuadro 3. Correlación paramétrica–Pearson.

		EDAD
Expresión CD95	Correlación de Pearson	,115
	Significancia	,517
	N	34
Expresión CD45RO	Correlación de Pearson	,61
	Significancia	,00
	N	34

Cuadro 4. Correlación no paramétrica – Spearman

Correlación

			EDAD
Rho de Spearman	Expresión CD95	Coeficiente correlación	,107
		Significancia.	,547
		N	34
	Expresión CD45RO	Coeficiente correlación	,652
		Significancia	,000
		N	34

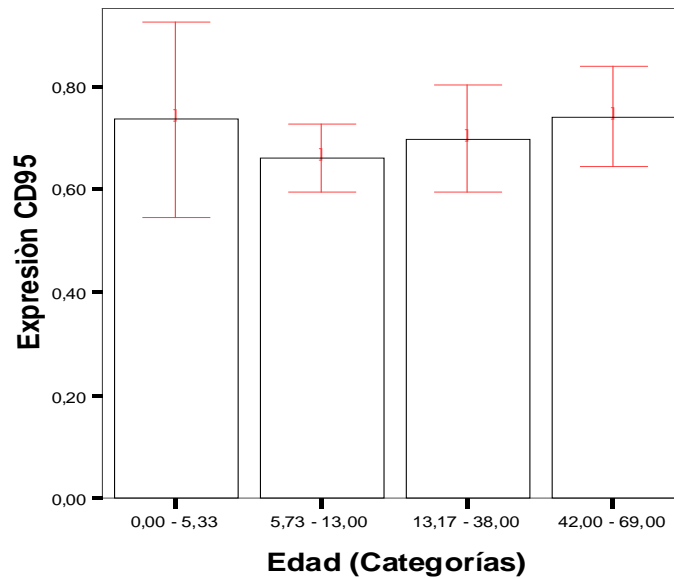


Figura 21. Variabilidad de expresión proteína CD95(FAS/APO-1) entre categorías de edad

25 CORRELACIÓN LINEAL

El análisis mediante la prueba de correlación lineal permite identificar el grado de asociación entre la edad y la expresión de las proteínas CD45RO y CD95(FAS/APO-1).

25.1 EXPRESIÓN PROTEÍNA CD45RO

El índice de correlación lineal entre la edad y la expresión de la proteína CD45RO, permite determinar que existe una relación lineal positiva entre la edad y la expresión de esta (**F=19.23, p=0.000**) (Ver Tabla 19)

Tabla 18. Índices de correlación lineal – proteínas CD45RO y CD95

Dependent	Mth	Rsq*	d.f.	F**	Sigf***	b0	b1
CD45RO	LIN	,375	32	19,23	,000	,4810	,0047
CD95	LIN	,013	32	,43	,517	,6752	,0008

* F=Probabilidad

**Sigf=Significancia

*Rsq=Coficiente Pearson

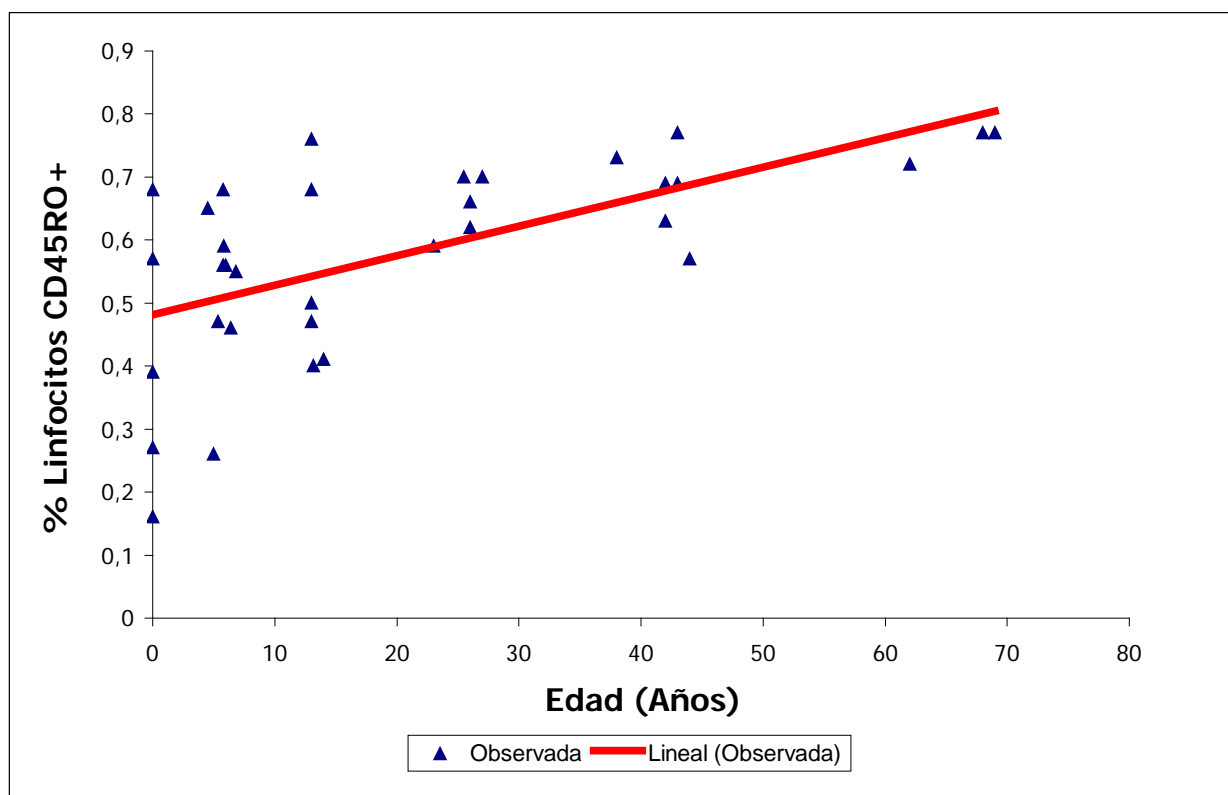


Figura 22. Correlación lineal positiva entre la edad y la expresión de la proteína CD45RO.

El análisis de correlación indica que la variabilidad observada en la expresión de la proteína CD45RO dependen en un 37.5% de la variabilidad de la edad. (Ver Tabla 20), este grado de asociación se debe a que se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los porcentajes de expresión entre las categorías de edad. Estos resultados coinciden con los datos publicados por Potestio *et al*, 1999, donde se demuestra que los porcentajes de expresión de linfocitos T de memoria (CD45RO+) aumenta con la edad, demostrando que estas células adquieren una “experiencia inmunológica” durante el desarrollo y crecimiento humano, que determina el cambio del fenotipo “virgen” al de “memoria” en los linfocitos T, estos hallazgos también coinciden con las publicaciones de Sánchez-Guerrero *et al*, 1998 y Kuss *et al*, 2003, donde se reporta la misma tendencia encontrada.

Tabla 19. Línea de tendencia – proteína CD45RO

$$Y = 0,481 + 0,0047x$$

$$P = 0.000$$

$$R^2 = 0,375$$

Y= Expresión proteína CD45RO
X= Edad

25.2 EXPRESIÓN PROTEÍNA CD95

El índice de correlación lineal entre la edad y la expresión de la proteína CD95, permite determinar (Ver Tabla 19)

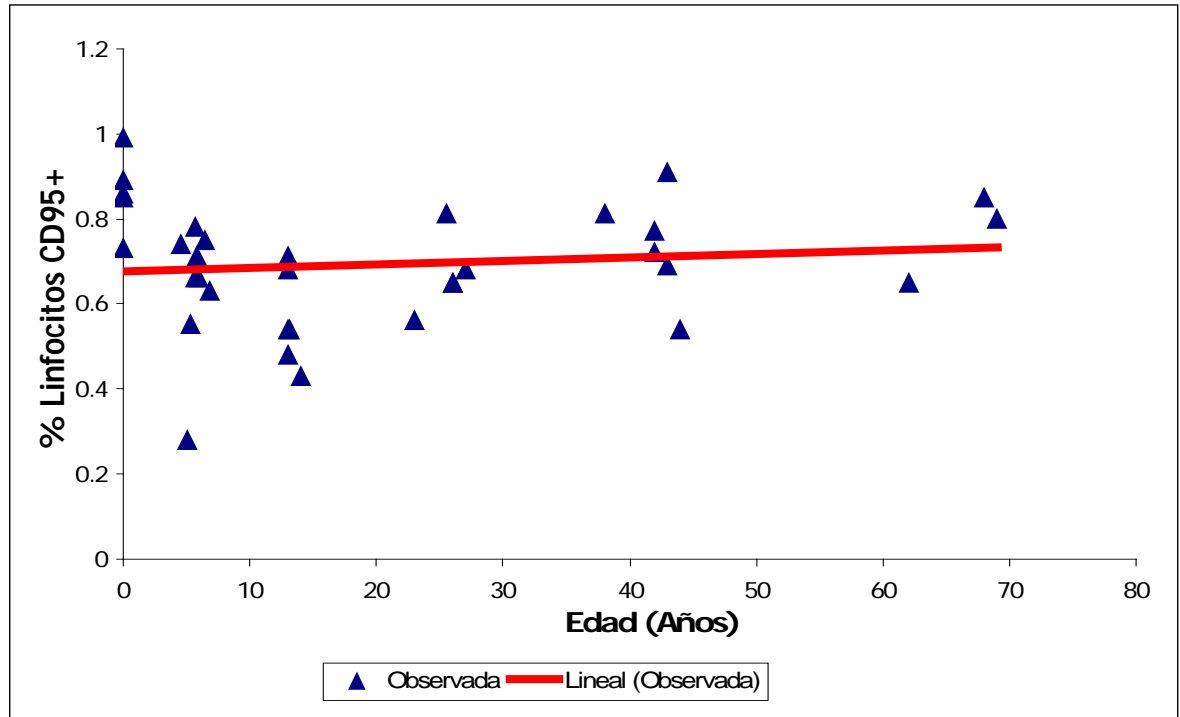


Figura 23. Correlación lineal entre la edad y la expresión de la proteína CD95

Al analizar la Figura 23, se observa que los porcentajes de expresión de la proteína CD95 tiende ligeramente a aumentar con la edad, pero esta tendencia no es estadísticamente significativa por lo tanto no se puede afirmar que estos porcentajes de expresión aumenten con la edad. El análisis de correlación indica que la variabilidad observada en la expresión de esta proteína depende en un 1.33% de la variabilidad de la edad (Ver Tabla 21), este bajo porcentaje de asociación se debe en gran parte a que no se encontró una diferencia estadísticamente significativa entre los porcentajes de expresión de esta proteína en las categorías de edad.

Tabla 20. Línea de tendencia—proteína CD95

$$Y = 0,6752 + 0,0008x$$

$$P = 0,517$$

$$R^2 = 0,013$$

Y= Expresión proteína CD95

X= Edad

26 ANÁLISIS DE FLUORESCENCIAS

26.1 PRUEBA DE SIGNIFICANCIA ESTADÍSTICA KOLMOGOROV–SMIRNOV (KS)

La prueba estadística de Kolmogorov–Smirnov, determina si dos datos difieren significativamente, esta prueba se aplica a datos no paramétricos con las mismas características (datos logarítmicos o lineales). Los datos que se comparan son representados en una curva, el análisis se basa en la sumatoria de las curvas comparadas y en encontrar una diferencia estadística entre la sumatoria de estas curvas.

El análisis estadístico usa los siguientes cálculos:

D/s(n) = Índice de Similaridad entre las curvas comparadas.

Si **D/s(n) = 0**, entonces las curvas son idénticas.

s(n) = $\sqrt{(n_1 + n_2) / (n_1 \times n_2)}$ donde n_1 es el número de datos de la primera curva y n_2 es el número de datos de la segunda curva.

D = Diferencia estadística entre las curvas comparadas. Prueba Kolmogorov–Smirnov (Ks).

Channel = Número de canales usados para calcular D.

Valor P = Valor de significancia estadística de la diferencia (D) reportada.⁵⁴

26.2 PROMEDIO DE DIFERENCIAS (D)

Las fluorescencias emitidas por los anticuerpos monoclonales CD95–PE y CD45RO–PE, se compararon con el control negativo (Gammaglobulina Hiperimmune)

⁵⁴ ESTADOS UNIDOS. CELLQuest Software Reference Manual. Becton Dickinson and Company. 1997. p.193–195.

Para analizar la diferencia estadística entre las curvas comparadas (D), se hizo un promedio de las treinta y cuatro diferencias obtenidas, tanto para la proteína CD45RO como para la CD95.

En la proteína CD45RO, se observó un promedio de 0.73 ± 0.2 , mostrando una mayor diferencia entre la emisión de fluorescencia del anticuerpo monoclonal CD45RO-PE y el control negativo, mientras que el promedio de la diferencia entre la proteína CD95 y el control negativo fue de 0.68 ± 0.1 , indicando que si hubo una diferencia entre la emisión de fluorescencia del anticuerpo monoclonal CD95-PE y el control negativo (Ver Tabla 22)

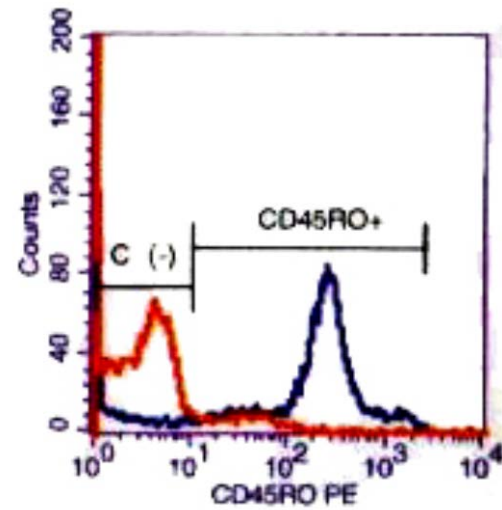
Tabla 21. Promedios de las diferencias (D) reportadas por la prueba Kolmogorov – Smirnov

N	Proteína CD95 Media \pm Ds	Proteína CD45RO Media \pm Ds	Valor p
34	$0,68 \pm 0,1$	$0,73 \pm 0,2$	<0.001

Ds = Desviación estándar

Estos datos muestran que los ensayos realizados con los anticuerpos monoclonales PE-ANTI HUMAN-CD45RO y PE-ANTI HUMAN-CD95 (FAS/APO-1), fueron efectivos y que los linfocitos T analizados mediante citometría de flujo expresaron en su superficie celular las proteínas CD45RO y CD95(FAS/APO-1).

Además estos resultados muestran que las proteínas CD45RO y CD95 están produciéndose constitutivamente en los linfocitos T humanos, estos hallazgos coinciden con los estudios de Li *et al*, 1998, donde se reporta la expresión constitutiva de los genes que codifican la proteína de superficie CD95(FAS/APO-1) en linfocitos T citotóxicos humanos.

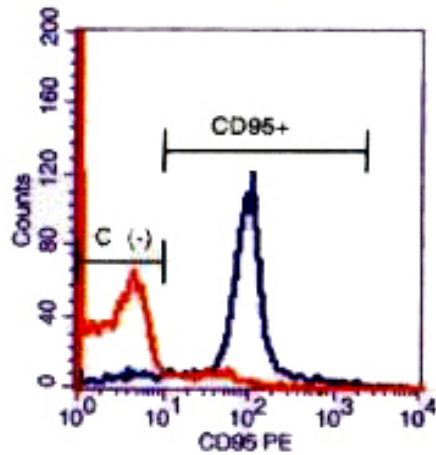
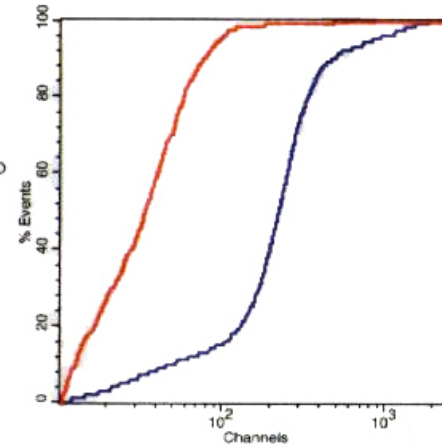


2 Kolmogorov-Smirnov Statistics

File: FeGuFa.003 on 19-03-03.001
 Parameter: FL2-H FL1-H
 Gate: No Gate No Gate
 Sample ID: 03004
 Patient ID: FeGuFa CONTROL NEGATIVO
 Patient Name:
 Case Number:
 Tube: tube #13 tube #3
 Panel: KLINGER Apoptosis
 Acquisition Date: 10-Jan-03 19-Mar-03
 Smooths: 0 0

Marker = CD45RO+
 Channels = 10 - 2641
 D/s(n) = 22.39
 D = 0.81
 Channel = 102.00
 Log Data Units = Linear Values

p <= 0.001



1 Kolmogorov-Smirnov Statistics

File: FeGuFa.002 on 19-03-03.001
 Parameter: FL2-H FL1-H
 Gate: No Gate No Gate
 Sample ID: 03004
 Patient ID: FeGuFa CONTROL NEGATIVO
 Patient Name:
 Case Number:
 Tube: tube #12 tube #3
 Panel: KLINGER Apoptosis
 Acquisition Date: 10-Jan-03 19-Mar-03
 Smooths: 0 0

Marker = CD95+
 Channels = 10 - 2436
 D/s(n) = 17.80
 D = 0.64
 Channel = 57.00
 Log Data Units = Linear Values

p <= 0.001

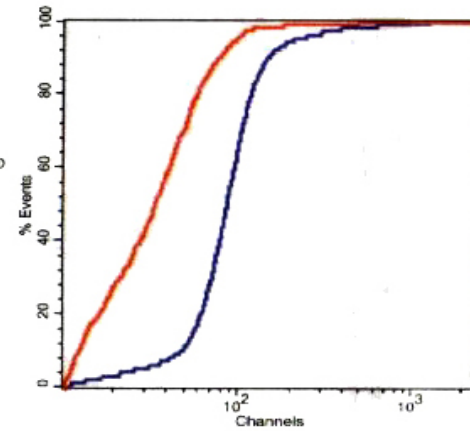


Figura 24. Prueba estadística de Kolmogorov–Smirnov, basada en histogramas de fluorescencias

27. CONCLUSIONES

En las poblaciones de linfocitos T de personas sanas estudiadas, se presentó un promedio de $71\pm 14\%$ de células positivas para la proteína superficial CD95(FAS/APO-1) y un promedio de $58\pm 16\%$ de células positivas para la proteínas superficial CD45RO.

En la población de personas sanas estudiada, no se presentó una relación lineal entre la edad y la expresión de la proteína superficial CD95(FAS/APO-1), ya que la variabilidad de los porcentajes de expresión de esta entre los grupos de edad fue muy alta. Este resultado no coincide con otros estudios como los de Potestio *et al*, 1999; Aggarwal *et al*, 1998; Shinohara *et al*, 1995 y Meunch *et al*, 2003.

En esta misma población estudiada, se presentó una relación lineal positiva entre la edad y la expresión de la proteína superficial CD45RO, debido a la baja variabilidad en los porcentajes de expresión de esta en los grupos de edad, esta resultado coincide con otros estudios como los de Potestio *et al*, 1999; Austran *et al*, Chheda et al, 1996; Sánchez-Guerrero *et al*, 1999 y Kuss *et al*, 2003.

28. IMPACTO

Los resultados encontrados en este estudio son de gran relevancia en el control y seguimiento de personas afectadas por patologías relacionadas con alteraciones en la función de las proteínas CD45RO y CD95(FAS/Apo-1), como enfermedades autoinmunes, tipos específicos de linfomas, leucemias, procesos alérgicos como asma e infecciones de las vías respiratorias.

Estos resultados pueden ser un buen biomarcador en estudios de monitoreo de personas ancianas, ya que se ha comprobado que el sistema inmune de estos individuos al presentar una memoria inmunológica elevada sufren de enfermedades autoinmunes, al ser su organismo incapaz de diferenciar entre sus propios tejidos y los extraños al cuerpo. Esta confusión también disminuye su capacidad de respuesta a la infección de agentes patógenos, haciéndolos más susceptibles a sufrir enfermedades infecciosas, tanto las bacterianas como las producidas por hongos o virus.

Además, estos resultados se pueden aplicar como marcadores en estudios de envejecimiento; el ligero aumento encontrado en los procesos de muerte celular programada o apoptosis en las personas más ancianas muestran que sus tejidos al tener elevadas tasas de muerte, pueden producir enfermedades neurodegenerativas asociadas con daños en el tejido cerebral, como Alzheimer, Parkinson, al ser eliminadas células tan especializadas como las neuronas.

Es claro que los resultados de este estudio tienen importantes aplicaciones en diferentes campos. En el clínico se pueden usar como monitoreo de poblaciones ancianas, en personas con enfermedades autoinmunes, neurodegenerativas, con daños celulares severos tipo cáncer, linfomas, o con alergias como asma e infecciones respiratorias, además es un pequeño aporte para ampliar el conocimiento de un sistema tan complejo y dinámico como el inmunológico.

BIBLIOGRAFÍA

ABUL, K. A; Lichtman, A. H., y Pober, J. S. *Inmunología Celular y Molecular*. 3 ed. Interpanamericana, 1998. p. 3–15.

ADAMS, J. M. and Cory, Z. The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival. En: *Science*. Vol. 281, No. 5381(aug. 1998); p. 1322–1326. ISSN 0036-8075.

ALBERTS, B et al. *Molecular Biology of the Cell*. 3 ed. E. U. A: Garland Publishing, 1994.

ANDERSEN, P. and Smedegaard, B. CD4+ T-cell subsets that mediate immunological memory to *Micobacterium tuberculosis* infection in mice. En: *Infection and Immunity*. Vol. 68, No.621–629. 2000.

AUTRAN, B. and Carcelain, G. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4 [sup+] T cell homeostasis and function in advances HIV disease. En: *Science*. Vol. 277, No 5322(jul. 1997); p. 112–116. ISSN 0036-8075.

ASHKENAZI, Avi and Vishva, Dixit. Death Receptors: Siganling and Modulation. En: *Science*. Vol. 281, No. 5381(aug. 1998); p. 1322–1326. ISSN 0036-8075.

BARYSHNIKOV, Y. *et al.* Fas (APO-1/CD95) Antigen: New Activation Marker for Evaluation of the Immune Status. En: *Russ J Immunol*. Vol. 2, No 2; p. 115–120. 1997.

BOLDRINI, L. et al. Identification of Fas (APO-1/CD95) and p53 mutations in non-small cancer lung cancer. En: *International Journal of Oncology*. Vol. 20, 2002. p.155–159.

CARSOR, D. A. and Ribeiro, J. M. En: *Apoptosis and disease*. *Lancet*. Vol. 541, No. 1251. 1993.

CHHEDA, S. et al. Deficient quantitative expression of CD45 isoforms on CD4+ and CD8+ T cell subpopulations and subsets and CD45RA (low)CD45RO(low) T cells in newborn blood. En: *Biol Neonate* Vol. 69, No 2; 1996. p. 128–132.

CHINEN, J. and Shearer, W. T. Molecular virology and immunology of VIH infection. En: Journal of Allergy and Clinical Immunology. Vol. 110, No 2(aug. 2002); p. 189–198. ISSN 0091–6749.

COLIGAN, J. E. et al. CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY. U.S.A: Jhon Wiley & Sons, 1995.

CURSO DE CITOMETRÍA DE FLUJO (2002: Barcelona). Memorias Programa de Citometría de Flujo. Barcelona: Fundació per a la Rcerca Biomédica Germans Trias i pujoj, 2002. p. 1–28.

DANIAL, P. S; Abba, I. T y Tristram, G. P. Inmunología Básica y Clínica. 3 ed. El manual Moderno, 1998. p. 147–161.

ELLIOTT, W. H. and Elliott, D. C. Biochemistry and Molecular Biology. 3 ed. U. S.A: Oxford University Press, 1997.

ESTADOS UNIDOS. CELLQuest Software Reference Manual. Becton Dickinson and Company, 1997. p.193–195.

EVAN, G. and Littlewood, T. A. Matter of Life and Cell Death. En: Science. Vol. 281, No. 5381(aug. 1998); p. 1322–1326. ISSN 0036-8075.

GREEN, D. R. and Reed, J. C. Mitochondria and Apoptosis. En: Science. Vol. 281, No. 5381(aug. 1998); p. 1322–1326. ISSN 0036-8075.

GRIFFITHS, J. F. et al. Genética Moderna. Madrid: Mc Graw–Hill, 1999.

INSUASTY, M. B. Apoptosis: Un Nuevo Rumbo para la Investigación Biomédica. Revista Facultad Ciencias de la Salud. Universidad del Cauca. Vol. 3, No 1(mar. 2001); p. 27–35.

JANEWAY, C. A. Immunobiology: The Immune System in Health and Disease. [on line]. Garland Publishing. 5 ed. [New York. 2001]; Acceso en Internet: <URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?tool=bookshelf&call=bv.View.ShowSection&searchterm=immunobiology&rid=imm>.

KRATZ, A. et al. Effect of Marathon Running on Hematologic and Biochemical Laboratory Parameters, Including Cardiac Markers. En: Am J Clin Pathol Vol. 118, No 6 2002;.p. 856–863.

KUSS, I. et al. Effector CD8+CD45RO-CD27- T cells have signalling defects in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. En: British Journal of Cancer. Vol. 88, No 2003; p. 223–230.

LI, J. et al. The regulation of CD95 Ligand Expression and Function in CTL. En: The Journal of Immunology. Vol. 161, 1998. p. 3943–3949.

MEUNCH, M. O. et al. Ontogenic changes in CD95 expression on human leukocytes: prevalence of T-cells expressing activation markers and identification of CD95(-)CD45RO(+) T-cells in fetus. En: Dev Comp Immunol. Vol. 27, No.10(dec. 2003); p. 899–914.

MÜLLER, Martina. et al. The role of p53 and the CD95 (APO-1/Fas) death system in chemotherapy-induced apoptosis. En: European Cytokine Network. Vol. 9, No. 4(dec. 1998); p. 685–686.

NATIONAL CENTER OF BIOTECHNOLOGY INFORMATION: PubMed.[on line]. [may. 2003]; Acceso en Internet:

<URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?call=bv.View..ShowSection&rid=cell.figgrp.6685>.

<URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PROW/cd45/cd45.html#grants>

<URL:<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?tool=bookshelf&call=bv.View..ShowSection&searchterm=CD45RO&rid=imm.figgrp.1382>.

POTESTIO, M. et al. Age-related changes in the expression of CD95 (APO/FAS) on blood lymphocytes. En: Exp Gerontol. Vol. 34, No 5 1999; p. 659–673. ISSN 0531–5565.

_____ Apoptosis and aging. En: Mech. Ageing Dev. Vol. 102. 1998. p. 35–46.

RUIZ–RUIZ, C. et al. Protein Kinase C Inhibits CD95 (Fas/APO-1)–Mediated Apoptosis by at Least Two Different Mechanisms in Jurkat T Cells. En: The Journal of Immunology. Vol. 163, 1999. p. 4737–4746.

SÁNCHEZ–GUERRERO, V. M. et al. Diferente expresión de CD45RA y CD45RO por linfocitos T CD4+ en asma intrínseca y extrínseca. En: Rev. Esp. Alergol Inmunol Cli. Vol. 13, No 3(jun. 1998); p. 160–166.

SPRENT, Jonathan. and Tough, David F. T cell death and memory. En: Science. Vol. 293, No. 5528(jul. 2001); p. 245–249. ISSN 0036-8075.

THORBERRY, N. A. and Lazebnik, Y. Caspases: Enemies Within. En: Science. Vol. 281, No. 5381(aug. 1998); p. 1322–1326. ISSN 0036-8075.

VELÁSQUEZ, D. José. Estrés???. [on line]. InfoMed. [2000]. Acceso en Internet:<URL:<http://www.Zonadiet.com>.

VON ANDRIAN, U.H. et al. T cell function and migration, two sides of the same coin. N. Engl J. Med. Vol. 343, No 14. 2000; p. 1020–1034.

YIN, D. et al. Chronic Restraint Promotes Lymphocyte Apoptosis by Modulating CD95 Expression. J. Exp. Med. Vol. 191, No 8(apr. 2000); p. 1423–1428.

YOUNG, J. L. et al. In vitro responses of human CD45RO^{bright} RA- and CD45ROR^{bright} T cell subsets and their relationship to memory and naïve T cells. Eur J Immunol. Vol. 27, 1997.p. 2383–2389.

ANEXOS

ANEXO A Encuesta

CONSENTIMIENTO VOLUNTARIO DE PARTICIPACION PROYECTO DE INVESTIGACION DE TRABAJO DE GRADO

Yo _____
Identificado con cedula de ciudadanía No. _____ de
_____. Declaro que participo de carácter
VOLUNTARIO y sin ánimo de lucro, donando aproximadamente 5 c. c. de mi material
sanguíneo, previa explicación del destino de esta muestra y CONCIENTE de las
implicaciones de dicha decisión. Para mi inclusión en el proyecto **“EXPRESIÓN DE
LAS PROTEÍNAS CD45RO (CÉLULAS DE MEMORIA) Y CD95 (INDUCTORA
DE APOPTOSIS) EN LINFOCITOS T HUMANOS DURANTE LA VIDA”**. Esta
muestra será procesada en el Laboratorio de Inmunología y Enfermedades
Infecciosas de la Universidad del Cauca. Donde se aplicara la prueba:

- **Tipificación inmunológica de las moléculas CD45RO y CD95 en linfocitos T de sangre periférica.**

Este consentimiento cumple con las implicaciones éticas y morales, según la
declaración de derechos en investigación científica de **HELSINKI**.

Firmado en la ciudad de Popayán a los _____ días del mes de _____
de 200 _____

Acepto.

**LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA Y ENFERMEDADES INFECCIOSAS
UNIVERSIDAD DEL CAUCA
POPAYÁN
2003**

**EVOLUCIÓN DE LAS MOLÉCULAS CD45RO (CELULAS DE MEMORIA) Y CD95
(CELULAS APOPTOCAS) EN LINFOCITOS T HUMANOS DURANTE LA VIDA**

I. DATOS PERSONALES

Fecha: Nombres y Apellidos: _____
Dirección: _____ Vivienda: Rural Urbana
Origen: _____ Procedencia: _____ Teléfono: _____
1. Sexo: M F 2. Fecha y lugar de nacimiento: _____
3. Edad (años): _____ Meses: _____
4. Estatura (Mt): 5. Peso (Kg):
6. Estado civil: C S D Otros: _____

II. PREGUNTAS REFERENTES A SU ESTADO DE SALUD

7. ¿Ha tenido problemas de salud? SI NO Cuales: _____
8. ¿Ha padecido enfermedades vírales recientes (últimos 6 meses)? (gripas severas, sarampión, etc.)
SI NO ¿Cuales? _____
9. ¿Consume algún medicamento (drogas para la presión, etc.)?
SI NO ¿Cual(es)? _____
10. ¿En su familia existen problemas de salud hereditarios (*Infarto del Miocardio, Diabetes Mellitus, etc*)?
SI NO ¿De qué tipo? _____

III. ANTECEDENTES PERSONALES DE SALUD

11 d. ha padecido alguna de estas enfermedades? ¿Cuál(es)?

- A. Cardiacas (Soplos, Arritmias) _____
B. Pulmonares (Neumonía, Asma, Bronquitis Catarros) _____
C. Convulsiones, Antecedentes de mareo, Fiebres reumáticas _____
D. Sanguíneas (Anemia, Hepatitis, Diabetes) _____
E. de la piel (Micosis, Eczema, Pie de ateta) _____

IV. SOLO PARA MUJERES

12. ¿Tiene hijos? SI NO 13. Número de hijos: _____ 14. G P A E
15. ¿Tiene hijos con problemas físicos y/o mentales desde su nacimiento?
SI NO ¿Cuántos? _____ Tipo de problema: _____

V. CONSUMO DE CIGARRILLO

16. ¿Usted fuma? SI NO
17. ¿Esta usted expuesto pasivamente al humo del cigarrillo? SI NO
- En casa En el trabajo Amigos

VI. CONSUMO DE ALCOHOL

18. ¿Consumes bebidas alcohólicas? SI NO
- Aguardiente Brandy Ron Guarapo Otras

- A. Diariamente
- B. Tres o cuatro veces a la semana
- C. Una o dos veces a la semana
- D. Una o dos veces al mes
- E. Menos de una vez al mes
- F. Ocasionalmente (Social) _____

VII. NIVELES DE STRESS

SI NO

- | | | |
|---|--------------------------|--------------------------|
| 19. ¿Se siente cansado aunque haya dormido suficiente? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ¿Se siente frustrado al tener que realizar sus labores diarias? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ¿Se siente de mal genio, irritado o impaciente por pequeños inconvenientes? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ¿Tiende a sentirse enfermo? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ¿Está comiendo más o menos, o tomando más tinto de lo usual? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ¿La comunicación con su jefe, compañeros, amigos o familia es conflictiva? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ¿Se le olvidan las cosas? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ¿Tiene dificultad en concentrarse? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ¿Se siente aburrido? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ¿Siente tensión muscular en el cuello, la espalda y cintura? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ¿Le duele la cabeza y siente presión en el pecho? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ¿Se duerme pensando en sus problemas o en lo que hay que hacer mañana? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| ¿Se desahoga llorando o hablando con un amigo sobre lo que le aqueja? | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

VIII. PRÁCTICAS DEPORTIVAS

20. ¿Tiene pasatiempos preferidos? SI NO ¿Cuales? _____
21. ¿Práctica algún tipo de deporte? SI NO ¿Cual(es)? _____
22. ¿Desde hace cuanto practica este deporte? _____ Número de sesiones: _____
- Horas en cada sesión: _____ Intensidad: Diariamente _____ Semanalmente _____

IX. NIVELES NUTRICIONALES

23. ¿Cuántas veces come al día? _____ 24. ¿Ud. es vegetariano (a)? SI NO
25. Tipo de alimentos que ingiere: Frecuencia de consumo (semanal/diariamente):
- A. Carne (Pescado, Pollo, Res)

- B. Frutas _____
- C. Verduras _____
- D. Arroz _____
- E. Granos (cereales) _____
- F. Pastas _____
- G. Fritos _____

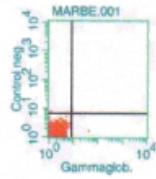
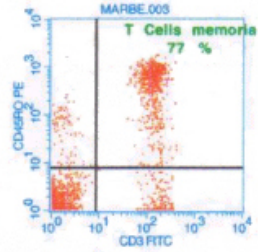
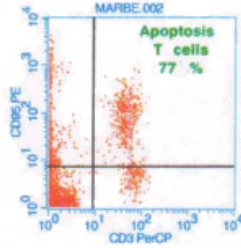
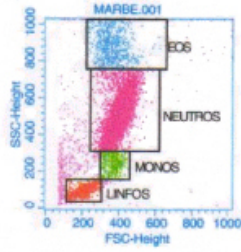
ANEXO B. Inmunofenotipo persona saludable.

File: MARBE.001
 Sample ID: 03113
 Tube: tube #3
 Acquisition Date: 08-May-03
 Gated Events: 10000
 X Parameter: FSC-H FSC-Height (Linear)

Region	Events	% Gated	% Total
LINFOS	2188	21.68	21.68
MONOS	401	4.01	4.01
NEUTROS	5858	58.58	58.58
EOS	943	9.43	9.43

UNIVERSIDAD DEL CAUCA
 FACULTAD CIENCIAS DE LA SALUD
Inmunología
 FACSCalibur Flowcytometer, B&D, USA
 Popayan - Colombia

EDAD 68 ANOS
 ADULTO SANO



File: MARBE.002
 Sample ID: 03113
 Tube: tube #1
 Acquisition Date: 08-May-03
 Gated Events: 2186
 X Parameter: FL3-H CD3 PerCP (Log)
 Quad Location: 9, 7

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	342	15.65	3.42
UR	400	18.30	4.00
LL	1307	59.79	13.07
LR	137	6.27	1.37

File: MARBE.003
 Sample ID: 03113
 Tube: tube #2
 Acquisition Date: 08-May-03
 Gated Events: 2690
 X Parameter: FL1-H CD3 FITC (Log)
 Quad Location: 9, 8

Quad	Events	% Gated	% Total
UL	82	3.05	0.82
UR	750	27.88	7.50
LL	1637	60.86	16.37
LR	221	8.22	2.21