

1994-B

087426424

# UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

---

División de Ciencias Biológicas y Ambientales

C U C B A



## CAMBIOS EN LA EXPRESION DE MARCADORES DE MEMBRANA EN LINFOCITOS DE INDIVIDUOS SANOS DE DIFERENTES EDADES

---

### TESIS PROFESIONAL

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN BIOLOGÍA  
P R E S E N T A

**CELIA GUERRERO VELAZQUEZ**

ZAPOPAN, JALISCO.

JUNIO DE 1997

---

C.  
DIRECTOR DE LA DIVISION DE  
CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AMBIENTALES  
DE LA UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA  
P R E S E N T E.

Por este conducto me permito poner a su consideración mi anteproyecto de tesis  
titulado:  
CAMBIOS EN LA EXPRESION DE MARCADORES DE MEMBRANA EN LINFOCI-  
TOS DE INDIVIDUOS SANOS DE DIFERENTES EDADES.  
el cual se anexa, para que sea turnado al Comité de Titulación de esta dependencia para su  
revisión y en su caso aprobación.

Así mismo pongo a su consideración a:  
MARY PAPUTIS MORRIS  
como Director de tesis. Así mismo, como asesor (NO indispensable, opcional) a:

Sin otro particular, aprovecho la ocasión para reiterarle mi consideración más  
distinguida.

A T E N T A M E N T E  
Las Aguas, Nextipac, Zapopan, Jal., NOV de 1997.

*Mary Paputis Morris*  
Vo So.  
en C. MARY PAPUTIS MORRIS  
El Director  
NOMBRE Y FIRMA

*Jelia Guerrero Velazquez*  
JELIA GUERRERO VELAZQUEZ  
El Alumno  
NOMBRE Y FIRMA

EL ASESOR

EXCLUSIVO COMISION DE TESIS

SINODALES	ENTERADO Y APROBADO	FECHA
1 M.C. ARTURO OROZCO BAROCIO		6/11/97
2 DRA. GALINA ZAITSEVA PETROVNA		26/10/97
3 M.C. FERNANDO ALFARO BUSTAMANTE		26/10/97
SUPL. M.C. ALFONSO E. ISLAS RODRIGUEZ		



*Centro Universitaria de Ciencias Biológicas y Agropecuarias*  
*División de Ciencias Biológicas y Ambientales*

1274/95

**C. CELIA GUERRERO VELAZQUEZ**  
**PRESENTE . -**

*Manifestamos a Usted, que con esta fecha ha sido aprobado el tema de Tesis "CAMBIOS EN LA EXPRESION DE MARCADORES DE MEMBRANA EN LINFOCITOS DE INDIVIDUOS SANOS DE DIFERENTES EDADES" para obtener la Licenciatura en Biología.*

*Al mismo tiempo le informamos que ha sido aceptado como Director de dicha Tesis la M.C. Mary Fafutis Morris.*

**A T E N T A M E N T E**  
**"PIENSA Y TRABAJA"**

**Las Agujas, Zapopan, Jal., 04 de Octubre de 1995**  
**EL DIRECTOR**

  
**M. EN C. ALFONSO E. ISLAS RODRIGUEZ**

**EL SECRETARIO**

  
**OCEAN. SALVADOR VELAZQUEZ MAGAÑA**

c.c.p.- M.C. Mary Fafutis Morris.- Director de Tesis  
c.c.p.- El expediente del alumno  
c.c.p.- El minutarío

AEIR/SVM/mahs\*

C.U.C.B.A



**DIV. DE CS.**  
**BIOLOGICAS Y**  
**AMBIENTALES**

M.en C. ARTURO OROZCO BAROCIO

PRESIDENTE DEL COMITE DE TITULACION  
DE LA LICENCIATURA EN BIOLOGIA  
DEL CENTRO UNIVERSITARIO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Y AGROPECUARIAS  
UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

PRESENTE.

Por medio de la presente, nos permitimos informar a Usted, que habiendo revisado el trabajo de tesis que realizó la pasante en Biología: CELIA GUERRERO VELZQUEZ. Con código 087426424 y el título: CAMBIOS EN LA EXPRESION DE MARCADORES DE MEMBRANA EN LINFOCITOS DE INDIVIDUOS SANOS DE DIFERENTES EDADES. consideramos que ha quedado debidamente concluido, por lo que ponemos a su consideración el escrito final para autorización de impresión y en su caso programación de fecha de exámenes de tesis y profesional respectivos.

Sin otro particular, agradecemos de antemano la atención que se sirva dar a la presente y aprovechamos la ocasión para enviarle un cordial saludo.

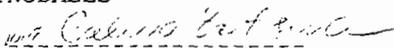
ATENTAMENTE

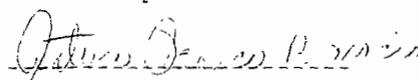
Las agujas, Nextipac, Zapopan, Jal., Junio de 1997

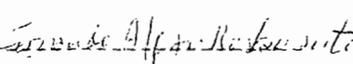
EL DIRECTOR DE TESIS

  
NOMBRE Y FIRMA

SINODALES

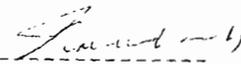
1.   
Nombre completo

2.   
Nombre completo

3.   
Nombre completo

1.   
firma

  
Firma

  
Firma

## *ANTONIMIA*

*¿Se debe al mundo o al humano  
la concepción de contrarios?  
¿existen o son supuestas las antónimas palabras?*

*Todo lo que sube, baja  
y lo que nace se muere,  
lo bello al tiempo es horrible  
y termina lo que empieza.  
Mas no son contradicciones  
sino meras dependencias,  
en ocasiones del modo  
y a veces lo son del tiempo.*

*En esta vena de contras  
vense enueltas mis razones  
por querer autoexplicarse  
los eternos sentimientos.*

NORN

Este trabajo lo dedico con mucho  
cariño a mis padres y a mis hermanos:

Paulo, David y Alicia.

... Si las condiciones de vida nos permiten elegir cualquier profesión, vamos a elegir la que nos proporcione mayor dignidad; una profesión basada en las ideas de cuya veracidad estemos completamente seguros que brinde las mayores posibilidades para actuar en aras de la humanidad y para aproximarnos al objetivo común, en relación al cual toda profesión es solo un medio de acercamiento a la perfección.

... Si el hombre trabaja solo para si, puede quizá ser un científico famoso, un gran sabio, un excelente poeta, pero jamás podrá ser un hombre perfecto y verdaderamente grande.

*Gracias a la M. en C. Mary Fafutis Morris  
por su gran apoyo, dedicación, amistad y  
ser la directora de este trabajo de tesis.*

*Al Dr. Femanado Alfaro Bustamante  
y a la Dr. Galina Zaitzeva Petrovna  
por su tiempo dedicado.*

## INDICE

<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>Planteamiento del problema.....</b>	<b>8</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>9</b>
<b>Metodología.....</b>	<b>11</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>15</b>
<b>Discusión.....</b>	<b>28</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>33</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>34</b>

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL CENTRO DE INVESTIGACION EN  
INMUNOLOGIA Y DERMATOLOGIA (CIINDE). UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA .  
INSTITUTO DERMATOLOGICO DE JALISCO "DR. JOSE BARBA RUBIO".

GRACIAS A LA

UNIVERSIDAD

DE

GUADALAJARA

## INTRODUCCION

El estudio de por qué envejecemos ha causado gran interés en la humanidad, y aunque la geriatría es una ciencia muy reciente, se tienen datos de que Aristotéles formuló las primeras hipótesis. El comparó la longevidad entre diferentes organismos y llegó a la conclusión de que las incapacidades que aparecen al envejecer no se deben a un trastorno de la mente, sino de su vehículo, como ocurre en las enfermedades. En la época del renacimiento Leonardo Da Vinci observó cambios anatómicos desde el nacimiento hasta la senectud y concluyó que el envejecimiento se debe a venas que al aumentar el grosor de sus paredes restringen el paso de la sangre, y con la consiguiente falta de nutrición, destruyen la vida de los ancianos sin que sufran fiebre, extinguiéndose poco a poco, en una lenta muerte (1). August Weissman (1891) define al envejecimiento desde un punto de vista evolutivo apeándose a las ideas de Darwin, el menciona que el envejecimiento y la muerte son una adaptación benéfica que deja espacio a los jóvenes que cuentan con nuevas combinaciones génicas: una especie de "retiro biológico", sin embargo Alexander Comfort (1979) describe que existen organismos que nunca envejecen, como es el caso de las bacterias y algunos protozoarios, que mediante la conjugación logran mantenerse vivos (2). Mediante un modelo poblacional estadístico Gompertz (1825) define al envejecimiento como una serie de procesos biológicos relacionados con el tiempo, que producen disminución de la viabilidad, aumento de la vulnerabilidad y probabilidad de muerte de un organismo (2).

En la biología el ser humano es la segunda especie animal más longeva y la primera entre los mamíferos, el primero la tortuga terrestre *Testudo sumeiri* con 150 años de edad, también existen otros organismos muy longevos que pertenecen a las plantas superiores, por ejemplo las monocárpicas anuales (de una sola floración), cuya maduración sexual desencadena su muerte. Y otros que aparentemente son eternos (1000 años) de 150 metros de altura como la secuoya (*Sequoia sempervirens*), los pinos californianos de unos 5,000 años (*Pinus aristata*) o el árbol del tule (*Taxodium mucronatum*) de aproximadamente unos 7000 años (2). También

son muy interesantes algunos arbustos desérticos productores de alquitrán (*Covillea mexicana*) que cuenta con unos diez mil años de vida (2).

Miquel y cols. (1984) señalan que la temperatura, el oxígeno y los componentes de la dieta ejercen una influencia sobre el envejecimiento de los metazoos. Loeb y Northrop (1917) estudió a la mosca *Drosophila melanogaster* y concluyó que la duración de la vida de ésta es inversamente proporcional a la temperatura ambiente. Dada la importancia que tienen los sistemas neuroendocrino e inmunológico en la regulación de todos los procesos fisiológicos, estos dos sistemas han sido foco de atención para los proponentes teóricos sobre el envejecimiento. Denkla (1977) dá el papel clave a una hormona pituitaria que aparece en los animales durante la pubertad bajo el estímulo de las hormonas tiroideas y cuya misión es bloquear la respuesta de los tejidos a estas hormonas, frenando así el consumo de oxígeno, pero Hayflick (1985) concluye que esta teoría carece de universalidad, en primer lugar, no todos los organismos que envejecen tienen complejos sistemas neuroendócrinos. En segundo lugar, el déficit que ocurre en el sistema neuroendócrino al envejecer puede ser el resultado de alteraciones básicas que ocurren, por ejemplo, en el genoma de todas las células viejas (1).

Existen tres hipótesis basadas en las moléculas portadoras de información (ADN y ARN). La primera formulada por Medvedev (1972), en donde él considera que la información transmitida en los procesos de transcripción y traducción del mensaje genético, desde el ADN al ARN, a las enzimas y otras moléculas proteicas, podría estar sujeta a un número progresivamente mayor de errores. Estos errores darían lugar a moléculas enzimáticas defectuosas, y conducirían a un declive de la capacidad funcional de las células. La acumulación de errores en un sistema biológico puede evitarse en parte por los conocidos procesos de reparación, pero los propios sistemas de reparación no actúan a la perfección ni de forma indefinida. Medvedev también ha propuesto la segunda hipótesis en donde dice que muchos de los genes de la molécula de ADN están repetidos en secuencias idénticas, por lo que el mensaje genético resulta altamente redundante. Medvedev ha propuesto que las secuencias repetidas estarían normalmente reprimidas, pero cuando un gen activo fuera dañado extensamente, sería reemplazado por un gen idéntico de reserva. La redundancia del

ADN podría, por lo tanto, proporcionar un mecanismo protector frente a la vulnerabilidad intrínseca del sistema, causada por accidentes moleculares. Al final, sin embargo, todos los genes repetidos serían utilizados, los errores se acumularían y las deficiencias fisiológicas determinantes del envejecimiento irían apareciendo. Esta hipótesis permite hacer la predicción de que las especies de larga vida deben tener más ADN redundante que las especies de vida corta. La tercera hipótesis genética del envejecimiento propone que los cambios producidos por la edad son simplemente una continuación de las señales genéticas normales que regulan el desarrollo de un animal desde el momento de la concepción a la madurez sexual. Supone incluso la existencia de genes de envejecimiento que frenarían o detendrían vías bioquímicas de forma secuencial y conducirían a una expresión programada de los cambios propios del envejecimiento ( 3).

Miquel y cols.(1983) han propuesto la teoría de la lesión mitocondrial por radicales libres. Debido a que la mitocondria posee un sistema genético semi-independiente sienta las bases de los conceptos de que el genoma mitocondrial (ADNmt) desempeña un papel importante en el envejecimiento celular. Si este genoma organelar sufre con el envejecimiento mutaciones u otro tipo de alteraciones, el resultado será una pérdida progresiva de la capacidad de regenerar la población mitocondrial. Puesto que las mitocondrias de las células diferenciadas están expuestas a un continuo ataque por los radicales libres generados por la reducción univalente del oxígeno, la pérdida de capacidad regeneradora debe llevar a una disminución en el número de mitocondrias funcionales y, por lo tanto, a una depresión en la síntesis de Adenosin Trifosfato (ATP). Esto, a su vez, inducirá la pérdida de función fisiológica, que es el efecto más aparente del envejecimiento (1).

Se sabe que la maduración del ser humano está acompañada de una serie de cambios en la respuestas inmunológicas desde la vida fetal hasta la senectud. De 0 a 13 años existe un desarrollo de la respuesta inmune, de 14 a 60 años una estabilización y finalmente de los 60 años hasta la muerte natural, un decremento en las funciones inmunológicas. Por otro lado se sabe que el feto no es inmunológicamente incompetente, ya que todas las clases de inmunoglobulinas pueden ser sintetizadas desde la decimosegunda semana de la vida fetal, sin

embargo los tejidos no están totalmente desarrollados, por lo tanto las funciones relacionadas con la protección no son óptimas en el feto ni tampoco en el neonato. Las respuestas inespecíficas por polimorfonucleares (PMN) y las específicas por células T y B van madurando durante los primeros seis meses de vida. El sistema inmune madura en los siguientes meses y años. En la etapa adulta se expresa una respuesta inmunológica más completa (4).

El envejecimiento lleva consigo la disminución de la capacidad inmunitaria, lo que se refleja en aumento de la frecuencia de enfermedades infecciosas, disminución de la resistencia a infecciones en fase crónica (tuberculosis, toxoplasmosis, etc) pérdida de la capacidad de respuesta cutánea a los antígenos comunes, también se han encontrado fallas en el sistema de reconocimiento y en el de regulación, con pérdida de la capacidad de respuesta frente a los agentes externos y aumento de los fenómenos autoinmunes, además se han detectado alteraciones en células progenitoras, timocitos y linfocitos T respondedores a antígenos/mitógenos. Las fallas de los linfocitos T son especialmente importantes, si se considera que son los principales involucrados en la respuesta inmune celular (RIC). Tales alteraciones son: expresión disminuida de algunos marcadores de superficie (IL-2R), bajos niveles de citocinas como la IL-2, aumento de otras: IL-1, IL-6 y Factor de Necrosis Tumoral (TNF), nivel de calcio iónico disminuido, y cambios de DNA nuclear y mitocondrial (1).

Por otro lado sabemos que las células T derivan de la médula ósea y se diferencian en el timo, entre sus funciones están la ayuda a las células B para la producción de anticuerpos, lisis de las células infectadas por virus, regulación de los niveles de la respuesta inmune, estimulación y activación citotóxica de otras células efectoras incluyendo macrófagos. La generación de la respuesta inmune mediada por linfocitos T, involucra la interacción de célula-célula y la producción de complejos inmunes solubles, esta respuesta está regulada por marcadores de membrana, incluyendo el complejo TCR (Receptor de las células T) y otras moléculas del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC). Los marcadores de superficie se denominan CD (Cluster of differentiation), la nomenclatura también incluye algunas moléculas que pueden ser características de diferentes líneas celulares (marcadores de linaje), de diferentes estados de maduración (marcadores de maduración) y los que aparecen seguida

la activación (marcadores de activación), estos marcadores tienen la función de interactuar eficientemente con otras células y otras moléculas para dar una función coestimuladora provocando la activación, proliferación y diferenciación celular. Las células T y B se activan con la unión de su antígeno específico a través del complejo mayor de histocompatibilidad. Las células B presentan inmunoglobulinas en su superficie que actúan específicamente como receptores antigénicos, en cambio los linfocitos T presentan el complejo TCR/CD3. El CD3 es una subunidad estrechamente unida al TCR y media la transducción de las señales cuando las células T se activan por la unión del antígeno con este complejo. In vitro los linfocitos pueden ser estimulados aún en ausencia de antígenos por mitógenos, la mayoría de estos son lectinas (carbohidratos ligados a proteínas) y se derivan de varias plantas y bacterias. La fitohemaglutinina es un mitógeno específico para las células T y su uso in vitro ha demostrado que al activar a las células T estas producen citocinas y expresan marcadores en su superficie (5), algunos son esenciales en la progresión del ciclo celular como CD25 y CD71, el CD25 es el receptor a interleucina 2 (IL-2) y se expresa sobre células T activadas, la alta afinidad del IL-2R se debe a una asociación no covalente de dos subunidades: alfa (p55) y beta (p75), la subunidad alfa contiene dos dominios CCP (Proteína Controladora del Complemento) que es rica en carbohidratos (6), la región extracelular de la subunidad beta consiste en un dominio de receptor a la citocina y un dominio de fibronectina del tipo II (7). La IL-2 también induce la activación y proliferación de los timocitos, células natural killer (NK), células B y macrófagos (8). Se sabe que los niveles de IL-2 disminuyen con el envejecimiento, sin embargo la IL-1, IL-6 y TNF se incrementan a medida que ocurre este fenómeno (9).

El CD28 es una molécula coestimuladora y es un miembro de la superfamilia de las inmunoglobulinas (IgSF), se expresa como un homodímero unido por puentes disulfuro, está presente sobre las células T en ambos subtipos CD4 y CD8 positivas, además en timocitos medulares. El CD28 es ligando natural del B7 (CD80) el cuál se expresa sobre las APC (Células presentadoras de antígeno), esta señal que se da primeramente por la unión del antígeno con el complejo TRC CD3 sugiere un papel muy importante para la interacción entre las APC y T (18,19), dando como resultado la activación de los linfocitos. La unión del CD28

con su ligando B7 genera un aumento en la proliferación de las células T y en la producción de citocinas especialmente IL-2 e IFN- $\gamma$  ( 8 ).

El CD71 no se expresa sobre linfocitos en reposo pero sí en linfocitos activados. Es una glicoproteína de membrana del tipo II, es un homodímero con puentes disulfuro que unen cisteína con cisteína. Análisis de filtración de geles sugieren que el dominio extracelular del receptor es una molécula asimétrica . El CD71 es el receptor a transferrina y une moléculas de hierro en el suero. Su expresión es muy alta en los linfocitos durante la respuesta a antígenos y mitógenos . Los anticuerpos monoclonales para el CD71 bloquean la proliferación. El CD25 y el CD71 tienen una gran importancia en la activación y proliferación de los linfocitos T. fig 1. (8).

Existen otras moléculas que forman parte estructural de la membrana de los linfocitos :CD27, CD56, y CD58 entre otros, el CD27 es un miembro de la superfamilia del NGFR (Receptor del Factor de Crecimiento Nervioso) y es rica en cisteína, esta proteína se encuentra sobre la superficie de las células T como un homodímero unido por puentes disulfuro, es fosforilada sobre residuos de serina e hiperfosforilada con la activación de las células T. Su expresión sobre las células T aumenta con el tratamiento de anticuerpos monoclonales anti-CD3 y disminuye con estéres de forbol ( 8 ).

El CD56 se expresa sobre todos los linfocitos y es una isoforma de las moléculas de adhesión en células neuronales (NCAM), el dominio extracelular de las NCAM (10), consta de 5 dominios de IgSF y dos dominios del tipo III de fibronectina (11). Al microscopio electrónico la proteína purificada sugiere que estos dominios están arreglados para formar una estructura flexible que se proyecta sobre la superficie de las células (12). La molécula NCAM media la adhesión celular homofílica y ha sido implicada en una gran variedad de interacciones celulares durante el desarrollo del sistema nervioso (10). Los anticuerpos monoclonales anti-CD56 bloquea la adhesión entre las NK y sus células blanco (8).

El CD58 tienen una distribución muy amplia, se encuentra en el tejido hematopoyético y no hematopoyético incluyendo el endotelio ( 8 ). El CD58 se expresa fuertemente sobre los macrófagos y está presente sobre las células B con centro germinal, timocitos medulares y linfocitos T de memoria. La adhesión celular del CD58 es mediada por la unión de su dominio

extracelular al extremo amino terminal del CD2 de los linfocitos T (13). La unión del CD58 con el CD2, aumenta la activación de las células T antígeno específicas (38), tiene un papel importante en las señales de transducción estimulando la relación de la IL-1 de las células epiteliales del timo o de mononucleares (14).

## Planteamiento del Problema

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Debido a que en la literatura existen pocos reportes y además controversiales respecto a la expresión de los marcadores de superficie CD25, CD27, CD28, CD56, CD58 y CD71 así como la proliferación de linfocitos bajo estímulo mitogénico, en este trabajo descriptivo se estudiaron los cambios de expresión de estos marcadores de superficie, así como el I.E de linfocitos en las diferentes edades de la vida humana.

## Objetivos

## OBJETIVO GENERAL

Determinar los cambios de expresión de los marcadores de membrana celular : CD25, CD27, CD28, CD56, CD58 y CD71 en linfocitos en reposo y activados de individuos sanos de diferentes edades.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Medir índice de estimulación por incorporación de  $^3\text{H}$
- b) Determinar el porcentaje de expresión de marcadores de membrana CD25, CD27, CD28, CD56, CD58 y CD71 en linfocitos activados y en reposo con anticuerpos monoclonales por citometría de flujo.
- c) Comparar los porcentajes de expresión de receptores entre los grupos de diferentes edades.

## **Metodología**

## **METODOLOGIA**

**SUJETOS DE ESTUDIO:** Se estudiaron 101 sujetos sanos de diferentes edades, todos ellos donadores voluntarios. Se formaron 7 grupos : Grupo 1 de recién nacidos (sangre del cordón umbilical con consentimiento de la madre), grupo 2: 1-19 años , grupo 3 : 20-29 años, grupo 4: 30-39 años. Grupo 5: 40-59 años. Grupo 6: 60-79 años. Grupo 7: 80 años y más. Este último grupo se apegó al protocolo de investigación gerontológica de SENIUR (15).

**MEDICION DE MARCADORES.** Mediante punción venosa se obtuvieron 8 ml de sangre periférica con heparina de cada individuo. A partir de estas muestras se separaron las células mononucleares por la técnica de Boyüm (16), cuyo principio se basa en la diferencia de gradientes de densidad y se realiza de la siguiente manera:

### **ENSAYO DE LINFOPROLIFERACION**

- a) La sangre se diluyó 1:2 en solución fisiológica de Hank's.
- b) En tubos cónicos estériles se colocó ficoll - hypaque y la dilución 1:2 sangre- Hank's , misma cantidad de ficoll hypaque y sangre- Hank's .
- c) La dilución se centrifugó a 1300 rpm 20 minutos a T° ambiente.
- d) Las células mononucleares se observaron en un anillo blanco en la interfase entre el plasma y el ficoll.
- e) Se colectó el anillo blanco , y se lavó con la solución de Hank's 2 veces centrifugando a 1500 rpm por 5 minutos.
- f) Se decantó la solución fisiológica, el botón que apareció en el fondo del tubo se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 5% de suero fetal de ternera para hacer prueba de viabilidad y cuenta del total de linfocitos obtenidos.
- g) A 0.1 ml de las células resuspendidas en el medio se le adicionó 0.1 ml de azul de tripano, se colocó 1 gota en la cámara de Neubauer y se observó al microscopio para el conteo de linfocitos, los linfocitos viables son aquellos que no toman el azul de tripano. Se contaron los linfocitos de los 16 cuadrantes, se multiplicó por 2 (dilución del azul de tripano) el resultado se multiplicó por 1 (dilución del medio de cultivo) y por último se multiplicó por

10,000 ( factor establecido de la cámara de Neubauer), quedando células/ml de medio de cultivo. Las células se ajustaron de manera que quedaran  $2 \times 10^5$  células x ml/pozo en cajas de microcultivo de 96 pozos, las células control en reposo se completan con medio de cultivo RPMI suplementado con 5% de suero fetal de ternera, para estimular a las células se les adicionó 10  $\mu\text{g}$  /ml de PHA ( en un volúmen de 0.1 ml/pozo ) .

- h) Las células se incubaron a 37° C en una atmósfera húmeda con 5% de  $\text{CO}_2$  y 95 % de aire durante 48 horas. A las 48 horas se cosecharon las células formándose dos grupos: las de reposo y las estimuladas con PHA .
- i) Las células fueron colectadas, se lavaron con solución fisiológica, se centrifugaron por 5 minutos a 1500 rpm. y se resuspendieron en 600  $\mu\text{l}$  de solución fisiológica para determinar la expresión de marcadores .

#### **DETERMINACION DE MARCADORES DE SUPERFICIE CELULAR CD25,CD27, CD28 , CD56, CD58 y CD71.-**

##### TECNICA DE CITOMETRIA DE FLUJO

- 1) Tanto las células en reposo como las estimuladas se colocaron en un volúmen de 100  $\mu\text{l}$  en tubos especiales del citofluorómetro (1/ marcador ) se incubaron con 10  $\mu\text{l}$  concentración de 0.1 mg/ml de los anticuerpos monoclonales anti-CD25 , CD27, CD28, CD56, CD58 y CD71 (Leinco Technologies, Inc. ) durante 30 minutos
- 2) A cada tubo se le adicionó 2.5 ml de solución lisante 10X compuesta por :
  - NH<sub>4</sub>Cl 8.02 g
  - NaHCO<sub>3</sub> 0.84 g
  - EDTA 3.7 gSe aforó a 100 ml con agua destilada y se guardó en el refrigerador a 4°C(41). Los tubos se agitaron vigorosamente durante 10 minutos .
- 3) Las células se decantaron y se lavaron con 5 ml solución buffer de fosfatos (PBS pH 7.2) se centrifugaron por 5 minutos a 1500 rpm, se tiró el sobrenadante y el botón se resuspendió en 0.5 ml de solución fijadora de paraformaldehído al 2% (17).

- 4) Las células se leyeron en un citómetro de flujo marca Culter (modelo EPICIV) y los resultados se expresaron como porcentajes de células+ a los diferentes marcadores.

#### INCORPORACION DE $^3\text{H}$ PARA ACTIVACION Y PROLIFERACION

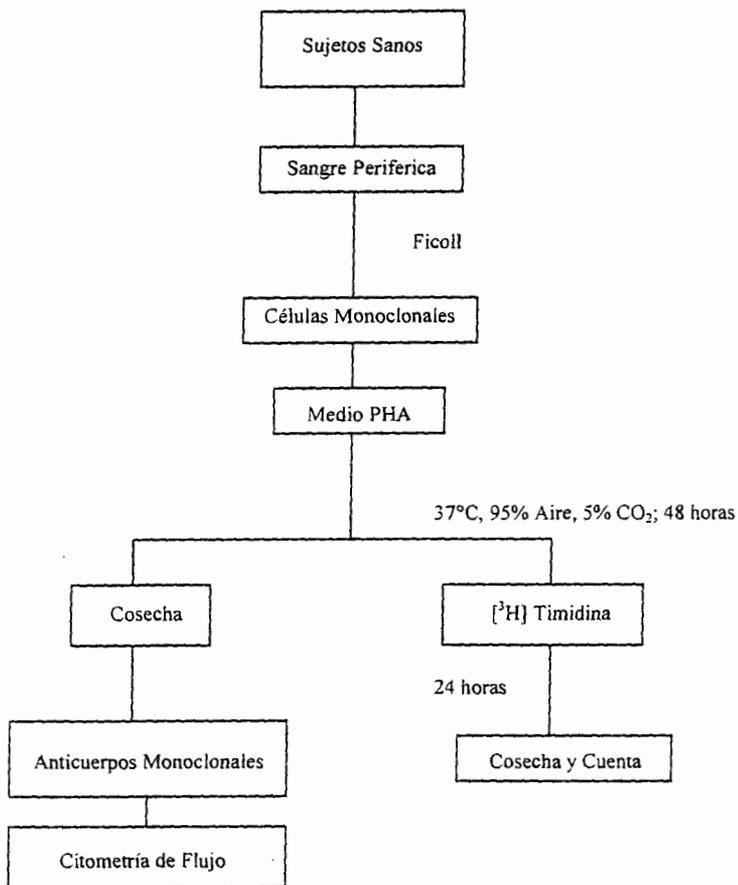
1. Siguiendo la metodología para obtener linfocitos se sembraron  $2 \times 10^5$  cels/ml en cajas de microcultivo de 96 pozos por triplicado bajo las dos condiciones antes mencionadas.
  - 1.1. células reposo + 100  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con 5% de suero fetal de ternera.
  - 1.2. células estimuladas con (10  $\mu\text{g/ml}$ ).
2. Las células se incubaron bajo las condiciones antes descritas, a las 48 horas se les da un pulso de timidina tritiada  $^3\text{H}$  (1  $\mu\text{Ci}$ ) / pozo.
3. 24 horas después se colectaron las células con un cosechador automático Nunc Cell Harvester.
4. La timidina tritiada incorporada al ADN de los linfocitos T se midió en un contador de centello de radiaciones  $\beta$  (MinaxiB- Tri- Carb 4000 series).
5. Los resultados se obtuvieron en cuentas por minuto (cpm). Y se reportaron en índice de estimulación (I.E) bajo la siguiente fórmula:  $\text{I.E.} = \frac{\text{cpm de las células estimuladas}}{\text{cpm de las células no estimuladas}}$ . Los I.E. de estimulación por arriba de 5 se toman como normales. La metodología se resume en el diagrama 1.

(cpm de células estimuladas)

I.E.: \_\_\_\_\_

(cpm de células no estimuladas)

DIAGRAMA 1



## Resultados

**A CONTINUACION SE PRESENTAN LOS CUADROS CON LOS DATOS DE  
LOS RESULTADOS DE LOS 101 SUJETOS SANOS.  
LOS CUADROS SE PRESENTAN POR GRUPOS DE EDADES.**

FECHA	NOMBRE	EDAD	MEDIO					RHA				ME. RHA	
			CD25	CD27	CD28	CD56	CD58	CD71	CD25	CD27	CD28		CD71
30/05/95	RNF-01	0	1		2	10	9	15	5	2	1	37	18
06/07/94	RNF-02	0			3			23				23	30
18/07/94	RNM-03	0	21	67	3	74	43	44	66	55	6	50	31
25/07/94	RNM-04	0	40	33	51	37	29	36	50	37	11	47	19
09/08/94	RNF-05	0	18	32		37	42	23	46	19	1	19	21
09/08/94	RNF-06	0	32	68	1	33	30	41	47	10	1	31	2
20/09/95	RNM-07	0		5	15	33	24	35	62	6	27	45	23
16/01/95	RNM-08	0	9	1	6	22	16	37	33	19	22	32	13
17/01/95	RNM-09	0	7	17	8	20	20	18	18	28	4	28	6
23/01/95	RNM-10	0	27	40	6	10	47	63	20	42	16	18	10
30/01/95	RNF-11	0	2	59	7	50	56	3	3		1	5	10
06/02/95	RNF-12	0	76	32	3	55	70	15	17	31	5	22	3
14/02/95	RNM-13	0	1	36	3	75	41	15	17	62	1	37	7
20/02/95	RNM-14	0	39	71	7	18	18	43	47	70	38	43	13
21/02/95	RNM-15	0	13	39	9	51	14	12	23	45	26	35	35
01/03/95	RNF-16	0	7		3	10	18	28	51		9	40	19
MEDIA			14.143	38.462	5.4	35.733	31.266	22.312	33.466	32.769	10.125	32.25	17.063
DIS. EST.			13.878	22.864	3.562	21.605	19.688	13.553	20.521	21.552	11.609	13.274	9.0661
ERR. ESTANDAR			3.469	5.7160	0.8904	5.4012	4.9221	3.3883	5.1303	5.3882	2.9024	3.3185	2.2665

RNF = RECIEN NACIDO FEMENINO; RNM = RECIEN NACIDO MASCULINO

FECHA	NOMBRE	EDAD	MEDIO					RHA				ME. RHA	
			CD25	CD27	CD28	CD56	CD58	CD71	CD25	CD27	CD28		CD71
26/08/95	FATIMA GOMEZ	6		59	10		47	15		54	8	10	
28/08/95	GRISelda SOTO	10	7	77	31	57	71	58	29	74	11	41	
31/05/95	BERENICE MORALES	12	29	76	11	59	51	20	5	74	5	9	2
26/04/95	ALICIA GUERRERO	13	29	35	3	18	19	18	11	47	13	15	13
08/05/95	DAVID GUERRERO	15	6	91	13	80	40	17	29	73	3	15	9
14/06/95	GELIDA VAUREGUI	15	10	75	10	65	45	17		32		5	8
MEDIA			10.2	68.833	13	56	45.166	24.166	18.5	59	7.6667	15.5	6.75
DIS. EST.			11.032	19.436	9.4445	22.561	16.857	16.654	12.369	17.572	4.8853	13.263	3.2016
ERR. ESTANDAR			4.5037	7.9348	3.8557	9.2105	6.8819	6.7991	5.0497	7.1740	1.9944	5.4145	1.3070

FECHA	NOMBRE	EDAD	MEDIO					PHA				IND. BIA	
			CD25	CD27	CD28	CD56	CD58	CD71	CD25	CD27	CD28		CD71
15/11/94	CECILIA NAVARRO	21	3	42	24	2	34	4	35	8	57	46	
13/12/94	VIRGINIA VADEZ	21	8	75	8	83	9	7	17	29	24	36	12
28/08/95	GLORIA SOTO	21	4	22	31		66	59	8	83	33	47	
06/12/94	GELIAGUERRERO	22	3	64	3	10	64	6	20	63	7	18	10
14/02/95	GUSTAVO VARGAS	22		35	2	46	43	4	11	61	2	11	2
27/02/95	LETICIA MENDOZA	22	8	19	4	18	18	8	16	21	46	12	32
07/05/94	KARINA OCHOA	23	8	1	11	5	13	12	4	3	16	34	53
06/07/94	ATISON	23			17			20			17	31	15
11/10/94	CESAR COVARRUBIAS	23	64	48	4	3	50	11	87	85	7	30	
16/01/95	ARMANDO SOTELO	23	16	20	10	16	16	5	24	38	14	20	9
20/02/95	MARCOS VIELMA	23	7	16	2	17	5	7	46	33	16	26	1
01/03/95	CELINE ESPINOZA	23	5		11	27		10	19		21	41	12
31/05/95	LAURA JUAREZ	23	3	67		54	67	5	8	69	12	12	5
14/06/95	ANTONIA AYALA	23		37	4	44	14	4		67	3	3	3
26/08/95	HIPATIA COLOMBIA	23		49	10		59	6		16	23	10	
09/08/94	ARTURO GONZALEZ	24	20	13	3	19	15	2	59	18	6	18	21
21/11/94	DORA MARTINEZ	24	5	75	24	40	60	15	26	12	15	71	
22/05/95	RICARDO GALVAN	24	31	81	5	75	60	6	30	36	56	29	2
02/05/95	FRANCISCO VARGAS	25	20	20	13	32	24	13	26	51	19	17	2
30/11/95	MARTIN ROE	26		28	11	90	79	12	25	28	22	74	6
05/12/95	VERONICA NUÑEZ	26	6	59	2	22	8		32	47	2	27	8
06/06/95	ALFREDO RAMIREZ	26	11	27	6	46	34	12	51	38	62	3	
10/01/95	THOMAS PAPPERT	27	1	40	6	13	6	6	25	21	19	17	13
06/02/95	ANA RANGEL	27	11	57	7	8	13	3	13	31	27	10	7
26/04/95	VERONICA LAGUNAS	27	5	44	26	35	31	13	20	40	12	16	7
30/05/94	MARILEN AREYES	29	30	43	12	65	78	19	14	4	3	19	7
17/01/95	JORGE GONZALEZ	29	21	21	10	23	24	19	46	28	9	6	4
20/06/95	NORMA VIDRIO	29		71	82	37	17			63	79		
04/03/95	CAROL FERGUSON	29	10		1	8		1	10		3	7	8
	MEDIA		12.609	39.385	11.571	32.231	34.885	10.741	28.8	39.154	20.483	25.214	10.591
	DIS. EST.		14.167	22.899	16.139	24.931	24.425	10.995	19.918	26.591	20.313	18.876	11.895
	ERR. ESTANDAR		2.6307	4.2524	2.9969	4.6295	4.5356	2.0417	3.6988	4.9378	3.7720	3.5053	2.2088

FECHA	NOMBRE	EDAD	MEDIO						PHA				P.E. PHA
			CD25	CD27	CD28	CD56	CD58	CD71	CD25	CD27	CD28	CD71	
25/07/94	SAAVEDRA	30	29	34	64	37	35	31	30	28	2	13	13
07/02/95	PATRICIA SANDOVAL	30	7	44	10	19	30	3	34	15	7	17	8
25/07/94	JOSEFINA VILLASEÑOR	31	40	46	21	53	39	41	19	10	2	44	6
07/11/94	CECILIA BORRERO	31	16	33	10	17	5	5	10	29	14	13	
01/03/95	CARMELITA MEJIA	31	5		61	11	2	11	34		7	25	4
30/01/95	MERCEDES HDZ	33	17	27	35	22	13	16	76	28	3	19	7
16/05/95	ROCIO GARCIA	34		3	2	1	1	2		2	4	13	4
13/07/94	MARY FAFUTIS	35		17	20	14	34	21		16	11	38	13
20/09/95	ROSARIO GOMEZ	36	17	47	24	24	18	12	56	18	17		5
23/01/95	ALFREDO SOTO	36	7	48		43	12		28	29	1	14	5
22/02/95	MARY FAFUTIS	36	11		26	23	37	12	47		32	44	12
18/07/94	MARIA FLORES	38	68	42	2	70	43	26	75	55	5	92	33
	MEDIA		20.1	34.1	22.273	27.833	22.833	16.455	33.9	25	8.75	30.182	9.5455
	DIS. EST.		20.642	14.806	21.648	19.511	15.332	12.209	21.005	16.713	8.8844	23.953	6.2827
	ERR. ESTANDAR		5.9588	4.2741	6.2491	5.6325	4.4259	3.5246	6.0636	4.8247	2.5647	6.9147	1.8137

FECHA	NOMBRE	EDAD	MEDIO						PHA				P.E. PHA
			CD25	CD27	CD28	CD56	CD58	CD71	CD25	CD27	CD28	CD71	
17/05/94	CELIA VELAZQUEZ	42	3	30	4	5	60	13	20	20			25
30/05/94	CECILIA GUILLEN	42	25	2	11	7	44	42	16	3	3	20	3
14/12/94	SALVADOR FLORES C.	43	2	54	9	59	38	3	12	6	5	5	13
03/10/94	MANUEL VAREZ	46	6				7						
04/10/94	ANDRES BAÑUELOS	48	21	10	6	3	15	9	16	14	6	12	
10/01/95	RICARDO MORENO	55	5	76	7	22	16	4	24	22	16	13	4
17/05/94	CARMEN	57	10	6	13	19	58	28	25	10	11	27	22
16/05/95	CRISTINA REMUS	59	2		4	10		4	1	9	1	11	7
	MEDIA		9.25	18.167	7.7143	18.143	34	14.714	14.857	12.714	6.8571	12.429	11.5
	DIS. EST.		8.9403	20.124	3.4503	19.308	21.533	14.852	9.0633	6.1837	5.8146	9.6412	10.134
	ERR. ESTANDAR		3.1609	7.1148	1.2199	6.8265	7.6130	5.2508	3.2043	2.1863	2.0558	3.4087	3.5829

FECHA	NOMBRE	EDAD	MEDIO					PHA				PHB/PHA	
			CD25	CD27	CD28	CD56	CD58	CD71	CD25	CD27	CD28		CD71
09/08/94	VICTOR MARTINEZ	60	11	46	2	35	20	14	33	42	9	9	24
21/11/94	ESTHER RODRIGUEZ	61	7	4	7	7	7	3	25	12	5	14	
17/05/94	ROSITA	62	7	1	7	3	11	22	7	11	20	40	12
15/11/94	TERESA NAVARRO	62	1	42	8	35	28	3	13	16	15	30	
06/12/94	GUADALUPE CONCHAS	62	3	27	2	12	6	2	8	30	5	7	4
13/07/94	GRACIELA ARAGON	63	32	16	32	51	39	42	38	18	10	54	8
18/07/94	LUZ ESPINOZA	63	17	21	14	64	78	72	89	63	9	88	16
20/09/95	ERNESTINA SORTEGA	64	29	39	18	42	25	19	41	37		23	15
04/10/94	AGUSTIN CAMARENA	64	7	5	6	2	20	6	19	18		33	
06/07/94	VICTORIA BEJARANO	67			5			7			22	66	4
13/12/94	GUADALUPE RAMIREZ	68	3	18	5	74	8	4	25	51	15	27	11
30/11/94	MOISES CONTRERAS	69	25	60	12	81	75	7	13	43	4	17	1
25/07/94	VIRGINIA CAMARENA	75	60	20	11	49	58	43	13	13	6	19	60
05/12/94	CARLOTA BECERRA	75	2	46	2	13	12	8	26	32	10	8	8
07/11/94	MARY CHUY CASTRO	76	1	40	11	62	12	2	21	28	10	17	
14/12/94	SALVADOR FLORES G	76	1	33	66	68	25	44	21	41	7	14	6
22/05/95	JESUS	78	73	62	76	68	64	81	45	42	11	11	6
	MEDIA		15.625	30	16.706	39.625	30.5	22.294	27.312	31.062	10.6	28.058	13.461
	DIS. EST.		22.249	19.047	21.762	28.842	24.763	25.156	20.022	15.502	5.3692	22.534	15.273
	ERR. ESTANDAR		5.3963	4.6196	5.2781	6.9952	6.0059	6.1013	4.8561	3.7599	1.3022	5.4654	3.7042

FECHA	NOMBRE	EDAD	MEDIO					PHA				T.E. PHA	
			CD25	CD27	CD28	CD56	CD58	CD71	CD25	CD27	CD28		CD71
30/05/94	DOLORES MONTOYA	80	4		22	9	8	22		6	9	26	28
04/10/94	DOLORES MONTOYA	80	12	12	12	16	12	10	10	7	10	12	
07/02/95	RAMONA AHUMADA	80	7	74	13	40	60	13	33	64	16	29	3
11/10/94	UBALDO VARGAS	81	57	30	27	22	46	38	60	30	9	38	
06/06/95	ANTONIO GONZALEZ	81	3	29	10	28	63	13	14	41	9	14	
06/07/94	ROSA ALVAREZ	85			6			38			6	65	9
08/05/95	ANGELICA VEGA	85	10	70	9	87	80	7	44	86	3	24	3
26/04/95	JUANITA BECERRA	88	18	53	22	39	45	10	32	70	17	17	5
02/05/95	SALVADOR GARCIA	89	9	29	14	14	22	17	19	27	12	14	1
01/03/95	ALTAGRACIA LLARA	93	4		2	15		8	57		12	18	10
14/03/95	ELISA AYALA	94	21		6	40		7	35		13	21	9
20/06/95	DAVID VIDRIO	95	7	7	67	57	38			28	14		23
22/02/95	POMPOSA ORTIZ	102	74		4	78	76	60	51		36	49	2
	MEDIA		19	38	16.461	34.583	45	22.083	35.5	39.888	12.769	26.5	9.2
	DIS. EST.		23.820	25.094	16.944	27.956	25.324	19.242	17.570	27.952	7.9702	16.076	9.1748
	ERR. ESTANDAR		2.2116	2.3299	1.5732	2.5956	2.3513	1.7866	1.6313	2.5953	0.7400	1.4926	0.8518

## RESULTADOS:

Los resultados muestran que el I.E. bajo PHA en todos los grupos fue mayor a 5. Sin embargo, el grupo de recién nacidos tuvo el I.E. más alto. Los promedios de I.E. bajo el estímulo de PHA se presenta en la Tabla 1. Las diferencias estadísticas por medio de una T de grupos contra I.E. de recién nacidos, se presenta en las gráficas 1-5.

TABLA 1.

GRUPO DE EDAD	Medio RPMI-1640		Bajo PHA
	n	X Medio ± Error Standard	X I.E. ± Error Standard
Recién nacidos	16	4656 ± 671	17.0 ± 2.2
1-19 años	6	2307 ± 972	6.7 ± 1.3
20-29 años	29	3280 ± 484	10.5 ± 2.2
30-39 años	12	3813 ± 564	9.5 ± 1.8
40-59 años	8	4464 ± 1421	11.5 ± 3.5
60-79 años	17	3331 ± 499	13.4 ± 3.7
≥ 80 años	13	1742 ± 117	9.2 ± 0.8

I.E. = Índice de Estimulación.  
PHA = Fitohemaglutinina.

**REPORTE DE ANOMALIAS**

**CUCBA**

**A LA TESIS:**

**LCUCBA00587**

**Autor:**

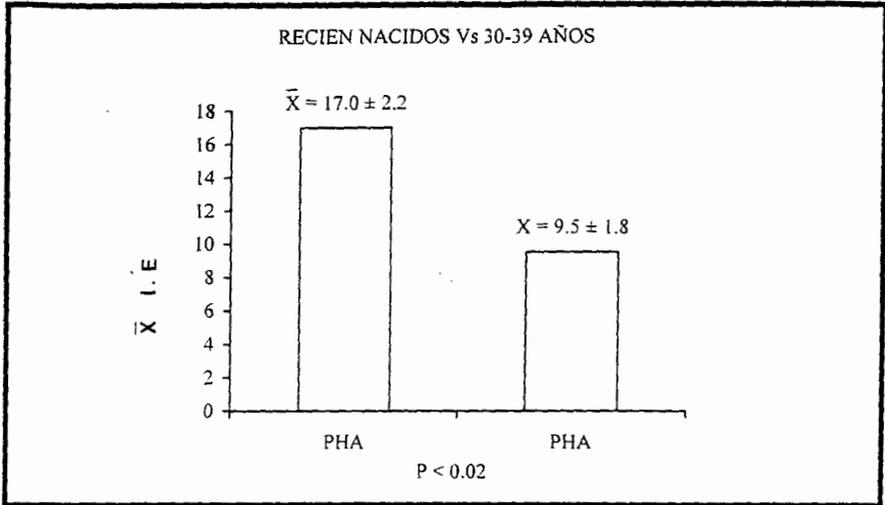
**Guerrero Velazquez Celia**

**Tipo de Anomalía:**

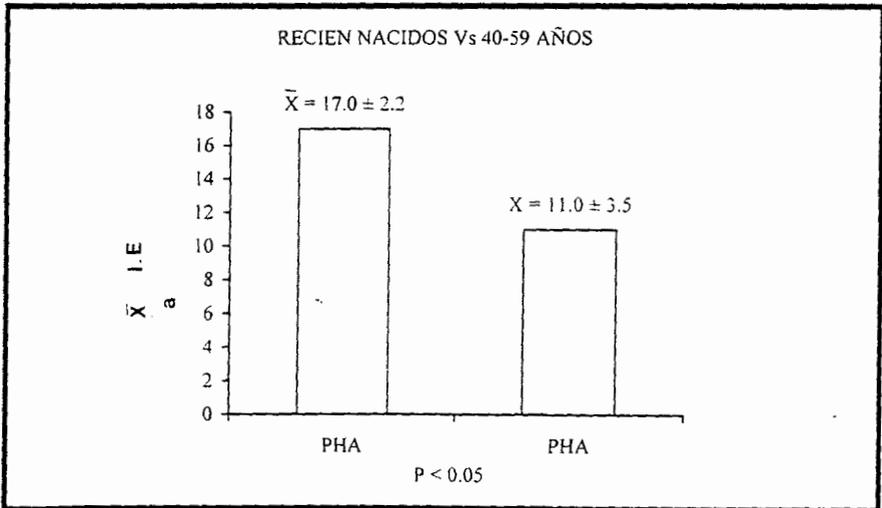
**Errores de Origen: Falta Pagina No. 16**

NIVELES DE SIGNIFICANCIA ESTADISTICA ENTRE LOS I.E. DE LOS DIFERENTES GRUPOS.

Gráfica 3.

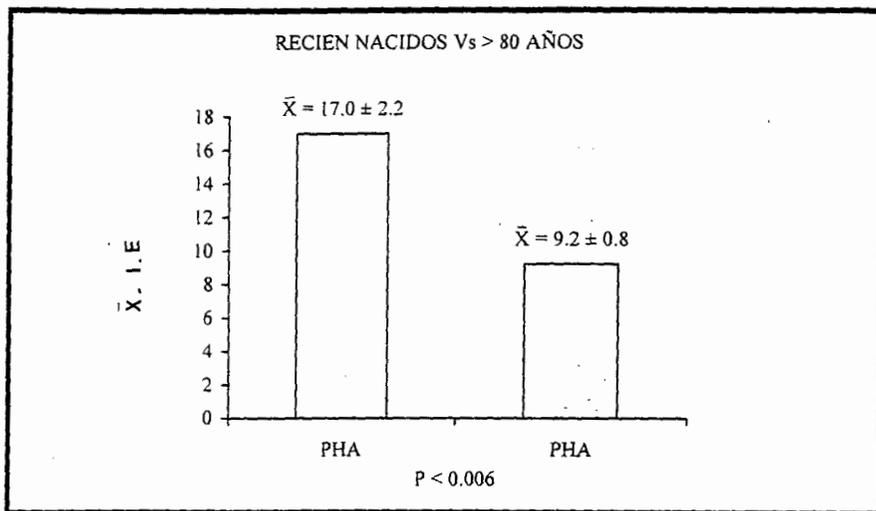


Gráfica 4.



NIVELES DE SIGNIFICANCIA ESTADISTICA ENTRE LOS I.E. DE LOS DIFERENTES GRUPOS.

Gráfica 5.



CD25.

Los resultados muestran que la expresión del CD25 se incrementó bajo el estímulo de PHA en todos los grupos. Tabla 2. Gráfica 6.

TABLA 2. Porcentaje de células positivas al receptor CD25.

GRUPOS DE EDAD	n	X Medio ± Error Standard	X PHA ± Error Standard	Nivel de significancia Estadística
Recién nacidos	16	14.4 ± 3.4	33.4 ± 5.1	p < 0.009
1-19 años	6	10.2 ± 4.5	18.5 ± 5.0	p > 0.511
20-29 años	29	12.6 ± 2.6	28.8 ± 3.6	p < 0.001
30-39 años	12	20.1 ± 5.9	33.9 ± 6.0	p > 0.155
40-59 años	8	9.2 ± 3.1	14.8 ± 3.2	p > 0.321
60-79 años	17	15.6 ± 5.3	27.3 ± 4.8	p > 0.128
≥ 80 años	13	19.0 ± 2.2	35.5 ± 1.6	p > 0.133

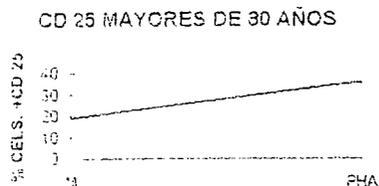
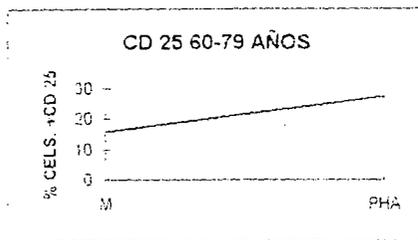
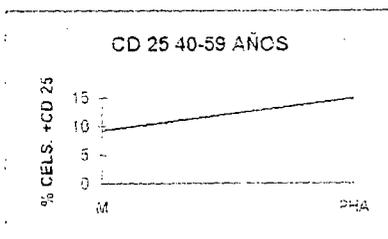
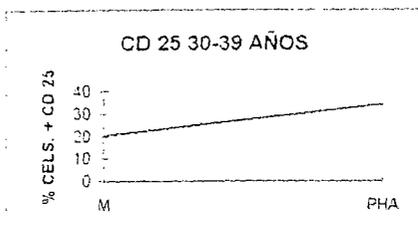
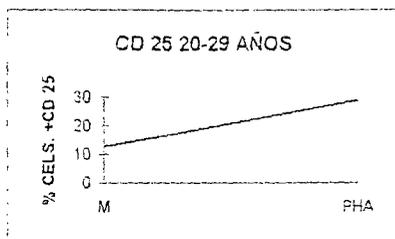
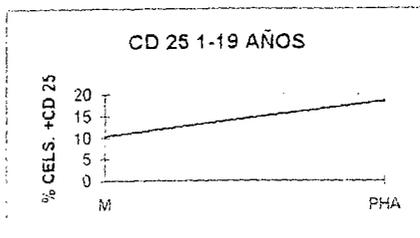
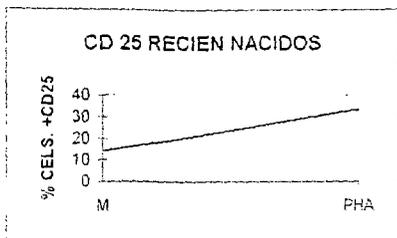
La expresión del CD71 bajo estímulo de PHA aumentó en todos los grupos, excepto en el de 1-19 años, donde se observó una disminución de la expresión de este marcador bajo el estímulo mitogénico (Tabla 3. Gráfica 7).

TABLA 3. Porcentaje de células que expresan el antígeno CD71.

GRUPOS DE EDAD	n	X Medio ± Error Standard	X PHA ± Error Standard	Nivel de significancia Estadística
Recién nacidos	16	22.3 ± 3.3	32.3 ± 3.3	p < 0.04
1-19 años	6	24.1 ± 6.7	15.5 ± 5.4	p > 0.374
20-29 años	29	10.7 ± 2.0	25.2 ± 3.5	p < 0.001
30-39 años	12	16.4 ± 3.5	30.1 ± 6.9	p > 0.102
40-59 años	8	14.7 ± 5.2	12.4 ± 3.4	p > 0.88
60-79 años	17	22.7 ± 6.1	28.0 ± 5.4	p > 0.486
≥ 80 años	13	22.0 ± 1.7	26.5 ± 1.4	p > 0.547

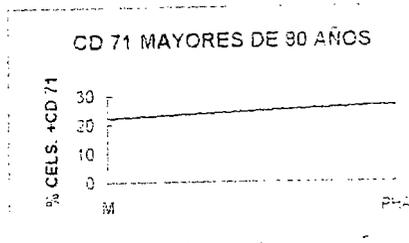
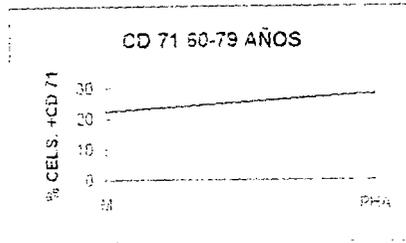
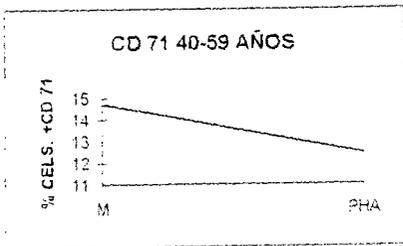
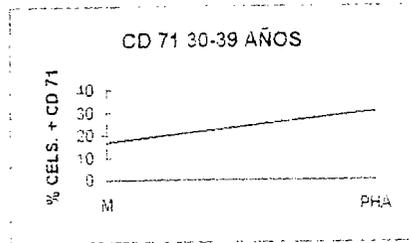
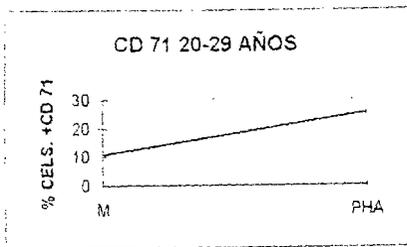
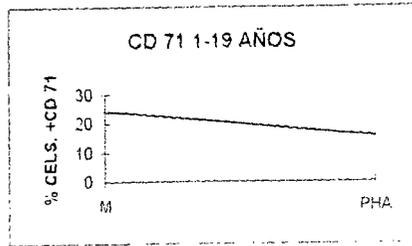
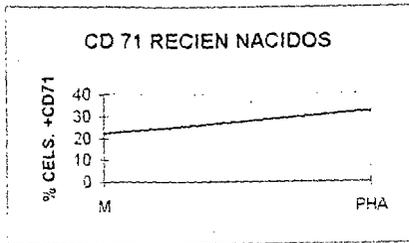
# % DE LINFOCITOS CD 25 + EN REPOSO Y ACTIVADOS

Gráfica 6



# % DE LINFOCITOS CD 71 + EN REPOSO Y ACTIVADOS

Gráfica 7



Las células de todos los grupos expresaron un alto porcentaje del antígeno CD27 en reposo, este porcentaje disminuyó cuando cuando las células se cultivaron en presencia de PHA (Tabla 4. Gráfica 8).

TABLA 4. Porcentaje de células que expresan CD27.

GRUPOS DE EDAD	n	X Medio ± Error Stan.	X PHA ± Error Stan.	NIVEL DE SIGNIFICANCIA ESTADISTICA
Recién nacidos	16	38.4 ± 5.7	32.7 ± 5.3	P > 0.84
1 - 19 años	6	68.3 ± 7.9	59.0 ± 7.1	P > 0.37
20 - 29 años	29	39.3 ± 4.25	39.1 ± 4.9	P > 0.81
30 - 39 años	12	34.1 ± 4.2	25.0 ± 4.8	P > 0.21
40 - 59 años	8	18.1 ± 7.1	12.7 ± 2.1	P > 0.58
60 - 79 años	17	30.0 ± 4.6	31.0 ± 3.7	P > 0.81
≥ 80	13	38.0 ± 2.3	39.8 ± 2.5	P > 0.64

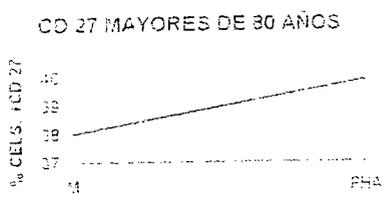
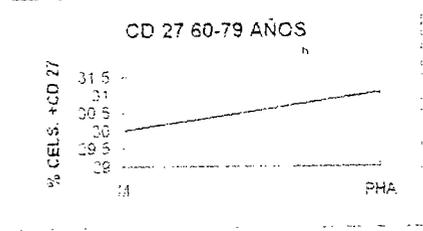
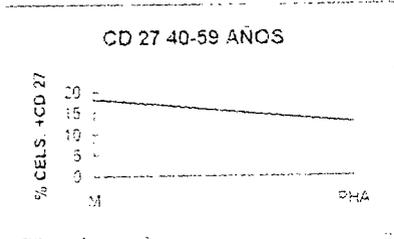
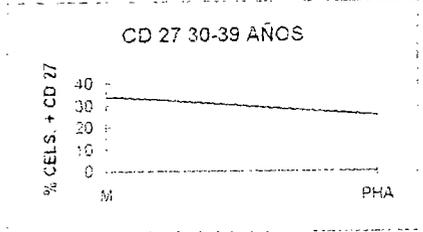
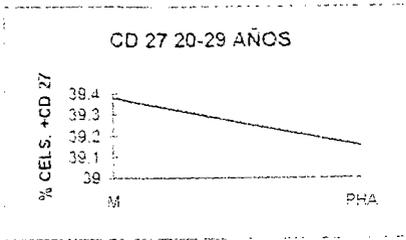
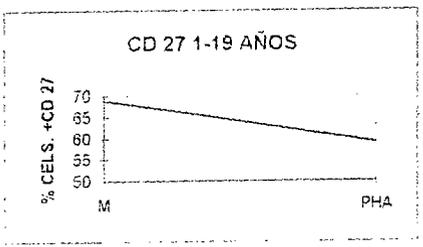
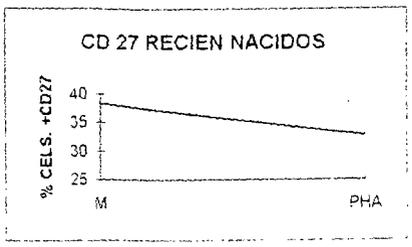
La expresión del marcador CD28 bajo el estímulo mitogénico, no presentó un patrón homogéneo, ya que en algunos grupos se incrementó, mientras que en otros disminuyó, no encontrándose diferencia significativa entre todos los grupos (Tabla 5. Gráfica 9).

TABLA 5. Porcentaje de células positivas que expresan el marcador CD28.

GRUPOS DE EDAD	n	X Medio ± Error Stan.	X PHA ± Error Stan.	NIVEL DE SIGNIFICANCIA ESTADISTICA
Recién nacidos	16	5.4 ± 0.8	10.12 ± 2.9	P > 0.10
1 - 19 años	6	13.0 ± 3.8	7.6 ± 1.9	P > 0.24
20 - 29 años	29	11.5 ± 2.9	20.4 ± 3.7	P < 0.06
30 - 39 años	12	22.2 ± 6.2	8.7 ± 2.5	P < 0.08
40 - 59 años	8	7.7 ± 1.2	6.8 ± 2.0	P > 0.73
60 - 79 años	17	16.7 ± 5.2	10.6 ± 1.3	P > 0.28
≥ 80	13	16.4 ± 1.5	12.7 ± 0.7	P > 0.48

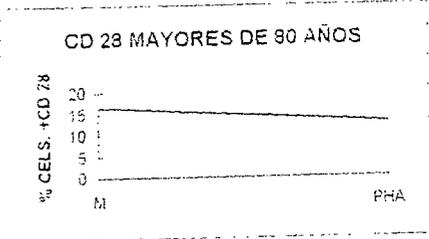
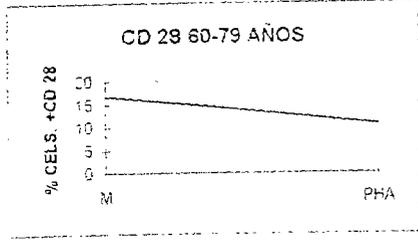
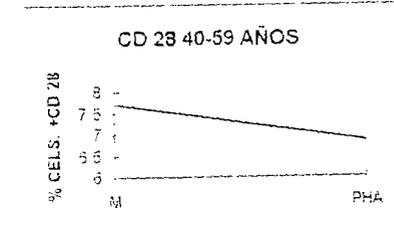
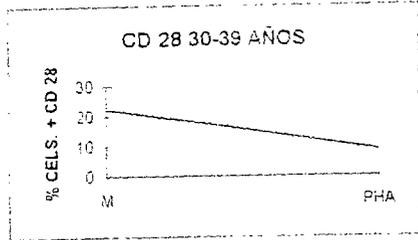
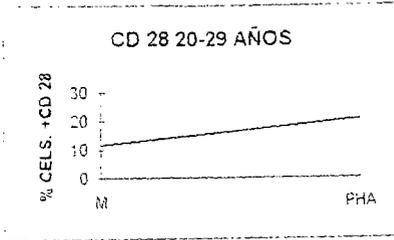
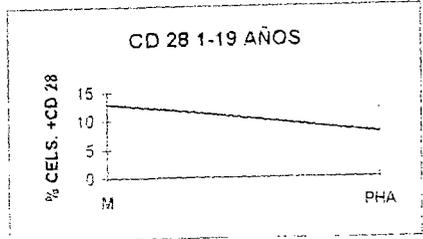
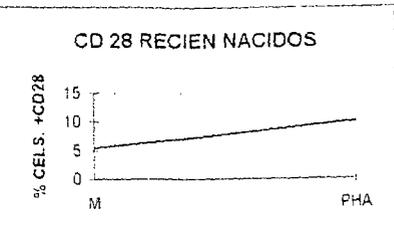
# % DE LINFOCITOS CD 27 + EN REPOSO Y BAJO ESTIMULO MITOGENICO

Gráfica 8



# % DE LINFOCITOS CD 28 + EN REPOSO Y ACTIVADOS

Gráfica 9



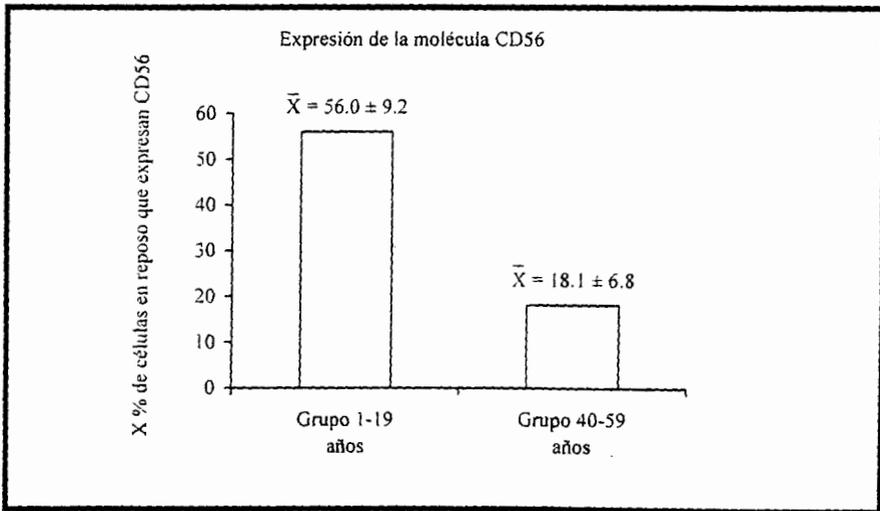
En todos los grupos se encontró un alto porcentaje de expresión de la molécula CD56, excepto en el grupo de 40 - 59 años (Tabla 6).

TABLA 6. Porcentaje de células en reposo que expresan la molécula CD56.

GRUPOS DE EDAD	n	X Medio ± Error Standard
Recién nacidos	16	37.5 ± 5.4
1-19 años	6	56.0 ± 9.2
20-29 años	29	32.2 ± 4.6
30-39 años	12	27.8 ± 5.6
40-59 años	8	18.1 ± 6.8
60-79 años	17	39.6 ± 6.9
≥ 80 años	13	34.5 ± 2.5

Al compararse todos los grupos entre sí, por medio de una T de student, sólo el grupo de 1 - 19 años contra el grupo de 40 - 59 años tuvo una diferencia estadística de  $p < 0.03$  (Gráfica 10).

Gráfica 10.



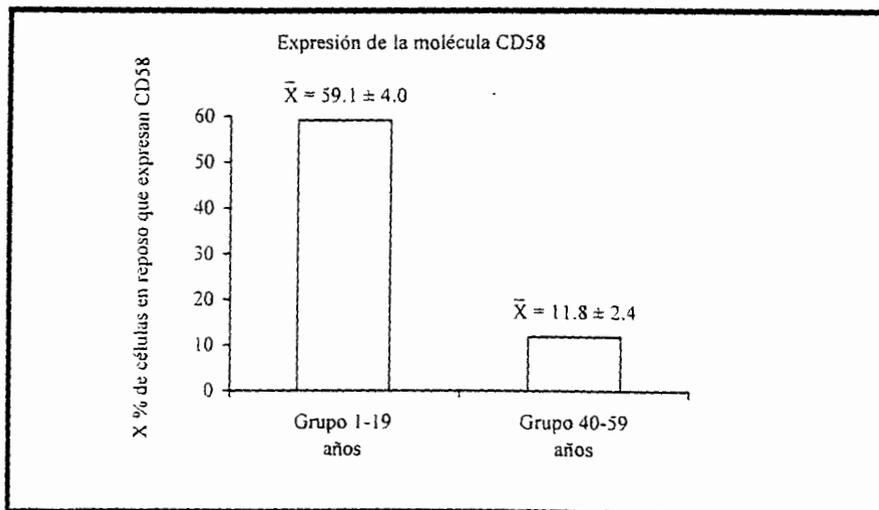
El porcentaje de células en reposo que expresan la molécula CD58 fue alto en todos los grupos excepto en el de 40 - 59 años (Tabla 7).

TABLA 7.

GRUPO DE EDAD	n	X Medio ± Error Standard
Recién nacidos	16	34.6 ± 5.7
1-19 años	6	59.1 ± 8.7
20-29 años	29	38.1 ± 4.0
30-39 años	12	38.3 ± 6.2
40-59 años	8	11.8 ± 2.4
60-79 años	17	34.0 ± 5.2
≥ 80 años	13	42.4 ± 2.8

Al compararse todos los grupos entre sí por medio de una T student, sólo el grupo de 1 - 19 años contra el grupo de 40 - 59 años tuvo una diferencia estadística de  $p < 0.04$  (Gráfica 11).

Gráfica 11.



## Discusión y Conclusiones

## DISCUSION

Nuestros resultados demuestran que todos los grupos tuvieron un I.E > 5, el grupo de recién nacidos mostró el I.E más alto ( I.E = 17). Al comparar los I.E de los demás grupos contra el de recién nacidos hubo diferencias significativas, excepto con el grupo de 60-79 años (Tabla 1. Gráficas 1-5).

Los linfocitos de recién nacidos presentan una alta capacidad de proliferación , probablemente porque se está llevando a cabo el reconocimiento de antígenos para que se establezcan las células T de memoria. Nosotros esperabamos que los sujetos de edades mayores tuvieron I.E por abajo de 5, sin embargo el grupo de 60-79 años tuvo un I.E = 13 y el grupo de 80 años y mayores su I.E=9.

Song.L y Pawelec, reportan que existe una relación inversa entre la edad del individuo y la capacidad de proliferación de sus linfocitos T (18,19). Por otro lado De Greef señala que la disminución de esta capacidad se debe al efecto de medicamentos o enfermedades y no al proceso propio de envejecimiento (20). Los sujetos de nuestro trabajo eran sanos y los de edades avanzadas entraban en los criterios del protocolo de SENIUR, por lo tanto tuvieron una buena capacidad de proliferación, sería interesante observar proliferación de células T de individuos enfermos con patologías asociadas al envejecimiento e individuos bajo tratamientos de medicamentos, probablemente estos factores estén alterando el sistema genético de los linfocitos T.

El CD25 es un marcador de activación de linfocitos T, ó receptor a IL-2.

Nuestros resultados demuestran que la cinética de expresión de esta molécula de superficie bajo el estímulo mitogénico aumentó de manera similar en todos los grupos, pero estadísticamente sólo el grupo de recién nacidos y el grupo de 20-29 años presentaron diferencias significativas. (Tabla 2. Gráfica 2).

Song. L. y cols. reportaron en 1993, que los sujetos de edades avanzadas presentan un déficit en la expresión del IL-2R, por lo tanto una incapacidad de proliferación de sus células T

(18). Tomando en cuenta los antecedentes de este autor, nosotros esperabamos que los grupos de individuos jóvenes tuvieran una mejor expresión del marcador CD25, bajo el estímulo de PHA, sin embargo nosotros encontramos que la expresión del marcador CD25 no aumentó significativamente en el grupo de 1-19 años, nosotros pensamos que posiblemente la  $n$  fué muy pequeña, para confirmar esto necesitaríamos aumentar la muestra, y además medir IL-2 en los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos de estos sujetos. En caso de que nuestros resultados se repitieran, si podríamos afirmar que aunque sean sujetos sanos, en esta etapa de la vida existe una baja expresión del IL-2R, cuando los linfocitos son estimulados bajo PHA, tal vez este sea un proceso normal, ya que posiblemente entran en defensa otras rutas (inmunidad humoral y respuesta celular mediada por macrófagos)

El CD71 es el receptor a transferrina (RTf) que se expresa sobre linfocitos T en la fase G<sup>1</sup> bajo un estímulo mitogénico, este receptor al unirse con su ligando provoca que el linfocito entre a la fase S, y por consiguiente prolifere.

Nuestros resultados indican que la expresión del marcador CD71 bajo el estímulo de PHA, aumentó significativamente sólo en el grupo de recién nacidos y el de 20-29 años. (tabla 3). Cabría esperar que el grupo de 1-19 años también aumentara, sin embargo no hubo una diferencia estadística. Es interesante observar que la expresión del CD25 y el CD71 no fué la que se esperaban en base a los resultados que se obtuvieron del grupo de recién nacidos y el de 20-29 años, el grupo de 1-19 años tuvo una baja capacidad de proliferación ( $I.E= 6.7$ ). Sin embargo nuestros resultados no son concluyentes ya que como mencionamos anteriormente la  $n$  de este grupo fué muy pequeña, en estudios posteriores ampliaríamos la  $n$ . Dependiendo de nuestros resultados podríamos pensar en varios puntos: Si la expresión del IL-2R aumenta significativamente bajo el estímulo mitogénico, pero sin embargo no se libera la IL-2 en cantidades adecuadas, no será suficiente para unirse al receptor, esto a su vez provocará una baja expresión del RTf. En caso de no existir una falla en la unión de IL-2 a su receptor, posiblemente el RTf si se exprese adecuadamente, pero si las moléculas de transferrina no se unen a su ligando, esto provocará una baja capacidad proliferativa. Por otro lado se tienen reportes a cerca de la expresión del receptor a transferrina y enfermedades asociadas al

envejecimiento., Morris señala que los enfermos de Alzheimer presentan una expresión disminuída del marcador CD71 (21), y los enfermos de Parkinson presentan altos niveles de esta molécula (22 ), como se mencionó anteriormente todos los sujetos de nuestro trabajo eran sanos, y no tuvieron ningun aumento o decremento significativo en la expresión del marcador CD71.

El CD28 es una molécula coestimuladora indispensable para la activación de los linfocitos T, vía TCR/CD3. Nuestros resultados indican que la expresión del Ag. CD28 bajo el estímulo mitogénico, no se modificó significativamente en la mayoría de los grupos. En el grupo de 20-29 años la expresión del Ag. CD28 tuvo una diferencia estadística de ( $P < 0.06$ ) cuando los linfocitos se incubaron bajo PHA, como hemos visto en este trabajo, el grupo ha tenido una buena expresión del CD25, CD71 y por lo tanto buena capacidad de proliferación de linfocitos T. Estos resultados nos llevan a pensar en que probablemente en esta etapa de la vida humana existe una respuesta inmune celular más equilibrada. Sin embargo el grupo de 30-39 años presentó una expresión disminuída de la molécula coestimuladora CD28 bajo fitohemaglutinina ( $P < 0.08$ ) cabe destacar que los linfocitos de este grupo cuando se incubaron sólo con el medio de cultivo presentaron un alto porcentaje del CD28 en la superficie celular, probablemente esto se deba a la función de regulación negativa que se le ha atribuído a esta misma molécula. Nuestros resultados demuestran que no existe una diferencia significativa en la expresión del CD28 en células en reposo y activadas en los grupos de edad avanzada. Nuestros datos entran en controversia con lo reportado por Boucher, que señala que la expresión del marcador CD28 disminuye con el envejecimiento, además Pawelec y Tübingen proponen que este antígeno puede ser un biomarcador de la inmunosenescencia (19).

Nuevamente nosotros pensamos que nuestros sujetos de edades avanzadas no presentaron esta baja expresión debido a que eran sanos.

Independientemente de la edad, la expresión del marcador CD27 tuvo un alto porcentaje en células en reposo y su expresión no se modificó significativamente bajo el estímulo mitogénico. En cuanto al marcador CD27 A.R. Rosenkranz señala que la activación de linfocitos T, promueve la regulación de la expresión de este antígeno y posteriormente se

desprende de la membrana celular (23), otros autores han encontrado esta molécula en forma soluble en sobrenadantes de linfocitos activados y fluidos biológicos de sujetos sanos (sCD27) (24). Sería interesante medir el sCD27 en sobrenadantes de cultivos de estos sujetos sanos, principalmente en el grupo de 1-19 años ya que presentaron un alto porcentaje de expresión de este marcador en células en reposo en comparación con otros grupos (tabla 5). Si se llegara a encontrar que no existe esta molécula sCD27 en los sobrenadantes de los cultivos de linfocitos de estos sujetos nosotros podríamos pensar que este marcador está ejerciendo una función negativa en la capacidad de proliferación de los linfocitos T. A este marcador se le considera como un marcador de activación de células T *in vivo* porque se ha visto que los niveles de sCD27 incrementan en pacientes que sufren de enfermedades inmunopatológicas (23).

El grupo de Lewis L. Lanier ha demostrado que el antígeno CD56 es una molécula de adhesión de células neuronales (N-CAM) este marcador se expresa predominantemente sobre células NK y linfocitos T CD56<sup>+</sup> que tienen una función citotóxica contra ciertas células tumorales, esta citotoxicidad mediada por células es independiente de las moléculas del MHC (11).

Por otro lado la literatura señala que la mayor incidencia de tumores se presenta aproximadamente hacia los 60 años (25). En nuestros resultados nosotros pudimos observar que al comparar estadísticamente el porcentaje de células en reposo que expresan la molécula CD56 en los diferentes grupos, sólo se encontró una diferencia estadística entre el grupo de 1-19 años ( $x = 56 \pm 9.2$ ) y el grupo de 40-59 años ( $x = 18.1 \pm 6.8$ ) con una  $p < 0.03$ .

Estos resultados nos llevan a pensar que probablemente esta baja expresión de la molécula CD56 sobre las células T en reposo, declinan la función citotóxica de estos linfocitos, y por lo tanto, se propicie el desarrollo de tumores, cabe destacar que en base a esto, nosotros esperaríamos que los grupos de edades más avanzadas tuvieran una menor expresión de la molécula CD56, pero si partimos de que nuestros sujetos eran sanos, en ellos se expresa normalmente la molécula CD56. Sería interesante observar en un estudio prospectivo si estos individuos de 40-59 años con baja expresión de este marcador llegaran a desarrollar tumores.

La unión del CD58/CD2 es necesaria para la activación y proliferación de las células T, en la respuesta al antígeno y función cooperadora con las células B. Por otro lado se ha asociado la ausencia o disminución de estas moléculas con la presencia de ciertos tumores (13). Los resultados que nosotros obtuvimos de la comparación estadística del porcentaje de células en reposo que expresan la molécula CD58, tuvo un comportamiento similar al marcador CD56. Sólo existió una diferencia significativa entre el grupo de 1-19 y 40-59 años ( $p < 0.04$ ). Igualmente sería muy interesante observar si estos individuos llegaran a desarrollar tumores.

Nosotros pensamos que los sujetos de edades avanzadas de nuestro trabajo han llegado a esta edad porque de alguna manera han tenido un equilibrio en todos sus sistemas y el sistema inmunológico no ha sido la excepción.

## CONCLUSIONES

1. - Todos los grupos de estudio presentaron una capacidad proliferativa con I.E mayor a 5.
2. - Nuestros resultados demostraron que solo se encontraron diferencias estadísticas de los I.E cuando se comparó a los grupos contra el grupo de recién nacidos, excepto con el grupo de 60-79 años.
3. - La expresión del CD25 y el receptor a transferrina (CD71) bajo el estímulo de PHA, aumentó significativamente sólo en el grupo de recién nacidos y en el grupo de 20-29 años.
4. - Nuestros resultados no son concluyentes en cuanto a la expresión de los marcadores CD25 y CD71, en el grupo de 1-19 años, ya que la  $n$  fué muy pequeña.
5. - La expresión de la molécula coestimuladora CD28, no se modificó bajo el estímulo mitogénico, de una manera homogénea, ya que en el grupo de 20-29 años aumentó significativamente, mientras que en el de 30-39 años disminuyó.
6. - La expresión del marcador CD27, no presentó ninguna diferencia estadística, cuando los linfocitos fueron incubados bajo el estímulo de PHA.
7. - Al compararse la expresión de las moléculas de adhesión CD56 y CD58 sobre los linfocitos en reposo, de los diferentes grupos de edades, sólo se encontraron diferencias estadísticas entre el grupo de 1-19 años y el grupo de 40-59 años.
8. - Nosotros concluimos en este trabajo, que aparentemente no existe ninguna correlación entre la expresión de los marcadores CD25, CD71, CD28, CD27, CD56 y CD58 sobre la superficie celular de linfocitos, y la edad de individuos sanos.

## Bibliografía

## BIBLIOGRAFIA

1. - Salgado, Alberto. Guillén , Francisco. Manual de Geriatria. SALVAT. 1990. Págs. 1-18, 121-138.
2. -Castañeda, Mario. Envejecimiento la última aventura. México DF. 1994. Bibliotece de la Salud. Págs. 31.40,49.
3. - W. Crocker, " Aging in Plants", en E.V. Cowdry (ed. ), . Biological and Medical Aspects, Baltimpoire, The Williams and wilkins, 1939.
4. - Hayflick, L. Biología Celular del Envejecimiento. Investigación y Ciencia. Mar. (1980). Nº 42. 24-32.
5. Roitt, I. Brostoff, J. Male, D. Immunology. Third edition. Págs. 2.1-2.14.
6. - Leonard, W. J. et sl. (1984). Structure of the Human Interleukin-2 Receptor Gene. Nature 311, 626-631.
7. - waldman A. T. Minireview. The Interleukin -2 Receptor. The of Biological . Chemistry. Vol. 266. Nº. 5. Febreo 15 .
8. - Neil. A., Albertus. D., Marion . B., Simon. D., The Leucocyte Antigen . Facts Book. Academic Press. San diego California. 1993. Págs.154-156, 160-161, 162-163, 228-229, 232-233, 258-259.
9. - Franceschi, C. Monti, D. Sansoni, P. and Cossarizza , A. the immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. Immunology Today. (1995). Vol. 16. No.1. 12-16.
- 10.- Lannier, L.L. Roberto Testi, Jane Bindi, and Joseph H. phillips. Identity of Leu-19 (CD56) Leucocyte Differentiation Antigen And Neural Cell Adhesion Molecule. (1989) J. Exp.med. 169, 2233- 223.
- 11.- Lannier, L.L . Chiwen Chang, Miyuki Azuma, Joyce J. Ruitenberg, Jonh J. Hemperly, and Joseph H. Phillips. Molecular and functional analysis of human natural killer cell-associated neural cell adhesion molecule (N- CAM/ CD56). (1991) J. Immunol. 146, 4421-4426.
- 12.- Alison K. Hall and Rutisbahuser. Visualization of neural cell adhesion molecule by electron microscopy. The journal of Cell Biology. June 1987. Vol.104. 1579-1586

- 13.- Smith, M.E.F. and Thomas, J. A. Cellular expression of lymphocyte function associated antigens and the intercellular adhesion molecule-1 in normal tissue. (1990) *J. Clin. Pathol.* 43, 893-900.
14. Le, P.T. Leanne W. Vollger, Barton F. Haynes, and Kay H. Singer. Ligand binding to the LFA-3 cell adhesion molecule induces IL-1 production by human thymic epithelial cells. (1990) *J. Immunol.* 144, 4541-4547.
- 15.- Lighthart, G. Joël X. Corberand, Catherine Fournier, Pierre Galanaud, Willy Hijmans, Bernard Kennes, Hans K. Müllerhewwink and Gerhard G. Steinmann. Admission criteria for immunogerontological studies in man: the SENIUR PROTOCOL. *Mechanisms of Ageing and Development*, 28 (1984) 47-55.
- 16.- Böyum, A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21 suppl. 197 (1988) 77-85.
- 17.- Robinson, P. *Hand Book of flow cytometry methods.* (1993) . Págs. 7, 23.
- 18.-.- Son-L. Kim- YH, Chopra-RK, Proust-JJ, Nagel-JE, Nordin -AA, Adler- WH .Age- related effects in T cell activation and proliferation. *Exp- Gerontol.* 1993 Jul-Oct. 28 ( 4-5): 313-21.
- 19.- Pawelec. G., Adibzadeh. M., Pohla. H., Schaudt. K. Immunosenescence: ageing of the immune system. *Immunology Today* . 1995 . Vol. 16. No. 9 . 420-422.
- 20.- De- Greef. GE., Van Staalduinen., Van Doorninck. H., Van Tol. Mj., Hijmans. W. Age-related changes of the antigen-specific antibody formation in vitro and PHA- induced T- cell proliferation in individuals who met the health criteria of the Senior protocol. *Mech Ageing- Dev.* 1992. 66 (1) . 1-14.
- 21.- Morris. CM., Candy. JM., Kerwin .J., Edwardson. JA., Tranferrine receptors in the normal human hippocampus and in Alzheimer's disease. *Neuropathology & Applied neurobiology.* 20( 5) : 473-7, 1994.
- 22.- Morris. CM., Omar. S. , Bloxham. CA., *Neuropathology & Applied Neurobiology.* 20 (5) 468-72 . 1994.

- 23.- A.R. Rosenkrans ., O. Majdic., Baumgartner., W. Knapp. Institute of Immunology, University of Vienna, Austria. 8<sup>th</sup> International Congress of Immunology Budapest, Hungary August 23-28, 1992.
- 24.- Hintzen, R. Q., de Jong, r., Hack, Susanne M. A. Lens and René A. W. van Lier. CD27: marker and mediator of T-cell activation ? (1991) J. Immunol. 147, 29-35.
- 25.- Wingaarden y Smith. Tratado de medicina interna. 18a.edición. Vol 1y2. Octubre Págs. 1083-1119,1123, 1124-112