

# FACULTAD DE MEDICINA REVISTA MEDICA DE LA EXTENSIÓN PORTUGUESA EXTENSIÓN PORTUGUESA-ULA

ISSN: 1856-9781 Depósito Legal: PP200702ME3234



UNIVERSIDAD  
DE LOS ANDES

VOLUMEN

4

Junio 2010

Nº 1

**DIRECTOR  
EDITORIAL**

**Dr. Librado Ortiz-Ortiz**

**EDITORES  
ASOCIADOS**

**Dra. Lisbeth Berrueta**

**Dr. César I. Pérez Maldonado**

**Dra. Siham Salmen**

**Dr. Luis E. Télez**

**Dr. José Luis Valderrama Landaeta**



## Autoridades Universitarias

**MARIO BONUCCI**

Rector de la Universidad de Los Andes

**PATRICIA ROSENZWEIG LEVY**

Vicerrectora Académica

**Manuel Aranguren**

Vicerrector Administrativo

**José María Andérez**

Secretario

**Gerardo Tovitto**

Decano de la Facultad de Medicina

**María Quintiliani de Gamboa**

Coordinadora General del Decanato de la

Facultad de Medicina

**Carlos Gómez Urquiola**

Coordinador General

**Nurys Manzione**

Coordinador Adjunto

**Henry Soto**

Coordinador Académico

**Misael Abreu**

Coordinador Administrativo

**Félix Gonzalez**

Jefe de Programas de Pediatría

**Orlando Flores**

Jefe del programa de Medicina

**Francisco Alvarez**

Jefe del Programa de Cirugía

**Thays Gamboa de Gómez**

Jefe de Programas de Obstetricia y Ginecología

**Félix Gómez Orduño**

Coordinador de Beneficios Estudiantiles

**María Mendoza**

Coordinadora de Nutrición

**Zoraida Torrealba**

Coordinadora de Enfermería

**ISSN: 1856-9781 Depósito Legal: PP200702ME3234**

### Información para los suscriptores:

La suscripción anual de índole personal es de Bs. 50; institucional, Bs. 75; copia sencilla, Bs. 20. EXTRANJERO: personal, Bs.70; institucional, Bs.100; copia sencilla, Bs. 25. Cuota especial para los estudiantes con credencial actualizada: 50% del valor establecido. Las suscripciones deberán ser solicitadas a: Revista Médica de la Extensión Portuguesa - ULA. Av. "El Limonero". Edif. ULA. Las remesas deberán hacerse a nombre de la Revista Médica de la Extensión Portuguesa - ULA. Cambios de dirección: Los suscriptores deberán notificar cambios a la Revista Médica de la Extensión Portuguesa - ULA con 60 días de anticipación. Las revistas que regresen por dirección errónea serán destruidas. Duplicados se pueden obtener en la dirección de la revista.

Las suscripciones nuevas como las renovaciones se inician con el número de la revista que se publique después de recibir el costo de la misma, y terminan en el mismo mes un año después.

Renovación de las suscripciones: Para evitar la pérdida de la secuencia de su serie, las renovaciones deben hacerse con tiempo. La revista no puede garantizar el suplir números atrasados de renovaciones realizadas tardíamente.

Las separatas (reprints) de artículos individuales están disponibles solamente para los autores.

Revista Médica de la Extensión Portuguesa - ULA

ISSN: 2856-9781

Órgano oficial de la Universidad de Los Andes, Facultad de Medicina, Extensión Portuguesa

Mérida - Venezuela

rev.med.ext.portuguesa.ula@gmail.com

Sitio Web Desarrollado por: Proyecto SaberULA

Web: <http://www.saber.ula.ve>

## Descripción

La Revista Médica de la Extensión Portuguesa-ULA, (RMEP-ULA) publica artículos relacionados con el área biomédica. Se reciben artículos originales de investigación clínica o básica, casos clínicos, revisiones y cartas al editor.

Esta revista cuenta con sistema de arbitraje, llevado a cabo por al menos dos revisores expertos en el área, seleccionados por el Consejo Editorial.

Índices y directorios: La RMEP pertenece al directorio de SABER-ULA

La RMEP - ULA se publica semestralmente

### Comité Editorial (2009-2011)

#### Director Editorial

Librado Ortiz-Ortiz

#### Editores Asociados

Lisbeth Berrueta Carrillo

César I. Pérez-Maldonado

Siham Salmen Halabi

Luis E. Téllez

José Luis Valderrama-Landaeta

### Comisión de Arbitraje 2009-2011

José Alfonso Osuna

Diago F Davila Spinetti

José H Donis

### Asesores

Thays Gamboa de Gómez

Andreina Gómez

Carlos Gómez Urquila

Disney M. Rosales Borjas

Oswaldo Alcalá

Giovanna alvarado

Nury Carrasquel

Depósito Legal

PP200702ME3234

ISSN: 1856-9781

Impreso Extensión Portuguesa

Editorial Thays Gamboa de Gómez

1000 ejemplares

Dirección online:

<http://www.saber.ula.ve/revistamedica/>

# REVISTA MÉDICA DE LA EXTENSIÓN PORTUGUESA - ULA

## CONTENIDO

Pág

### Artículos Originales

Papel de la asociación de Nef-VIH-1 con p22-phox

Role of Nef-VIH-1 and p22-phox association

Siham Salmen, Melisa Colmenares, Darrel L. Peterson, Lisbeth Berrueta.

1

### Revisiones

Muerte celular programada: II. Papel en el desarrollo y función de las células linfoides del sistema inmune.

Programmed cell death: II. Role in the development and function of lymphoid cells in the immune system

Masyelly Rojas, Siham Salmen, Lisbeth

6

Enfermedad tiroidea autoinmune

Autoimmune thyroid disease

Librado Ortiz-Ortiz

17

## Papel de la asociación de Nef-VIH-1 con p22-phox

Siham Salmen<sup>1</sup>, Melisa Colmenares<sup>1</sup>, Darrel L. Peterson<sup>2</sup>, Lisbeth Berrueta<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Instituto de Inmunología Clínica, Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela

<sup>2</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Virginia Commonwealth University, Richmond, Virginia, Estados Unidos

Recibido Mayo 15, 2010. Aceptado Mayo 30, 2010

### ROLE OF Nef-VIH-1 AND p22-phox ASSOCIATION

#### Resumen

La alteración de la función de los componentes de la inmunidad innata puede contribuir al desarrollo del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) durante el curso de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Se ha descrito que Nef, una de las proteínas reguladoras del VIH, puede modular la producción de superóxido en células. Así, la alteración de la producción de superóxido en los monocitos/macrófagos y neutrófilos de pacientes infectados con VIH, podría ser secundaria a un efecto directo de Nef en componentes del complejo NADPH oxidasa. Nuestro grupo recientemente describió que Nef es capaz de aumentar la producción de anión superóxido en los neutrófilos humanos, y de asociarse con p22-phox, uno de los componentes de membrana del complejo enzimático. En este reporte proponemos un modelo hipotético de asociación entre p22-phox y Nef-VIH-1, donde se evidencia un posible sitio de contacto. Es necesario realizar nuevos estudios que permitan corroborar este modelo y mapear el sitio de contacto crítico para modular este complejo enzimático responsable de uno de los mecanismos de defensa innatos más eficientes en los fagocitos.

**PALABRAS CLAVE:** VIH, neutrófilos, superóxido, Nef, p22-phox, NADPH-oxidasa.

#### Abstract

*Altered neutrophil function may contribute to the development of AIDS during the course of HIV infection. It has been described that Nef, a regulatory protein from HIV, can modulate superoxide production in phagocytic cells, therefore altered superoxide production in monocyte/macrophage and neutrophils from HIV infected patients, could be secondary to a direct effect of Nef on components of the NADPH oxidase complex. Our group recently described a specific association between Nef and p22-phox, a membrane component of the NADPH oxidase complex. In this work we proposed a hypothetical model that shows the way that these proteins could be associated. Additional studies are necessary to map the sequence that are involved and if they are critical to modulate the enzymatic complex responsible for one of the most efficient innate defense mechanisms in phagocytes, contributing to the pathogenesis of the disease.*

**KEY WORDS:** VIH, neutrophils, superoxide, Nef, p22-phox, NADPH oxidase

## Introducción

Se ha estimado que 3.2 millones de personas en el mundo están infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (1), agente causal del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Además del deterioro de la respuesta inmune adaptativa, durante la infección por el VIH ocurre un detrimento de los elementos de la inmunidad innata (2,3). Las células fagocíticas juegan un papel muy importante en la defensa contra patógenos mediante la activación de diversos mecanismos microbicidas, dentro de los cuales se encuentran la fagocitosis y la producción de superóxido. El superóxido es generado por la activación del complejo NADPH-oxidasa, a través de la reducción del oxígeno molecular, favoreciendo así la generación de metabolitos reactivos del oxígeno (ROS), responsables de mediar la destrucción de diferentes componentes celulares, con alto poder microbicida (4). El complejo NADPH-oxidasa está constituido por un componente de membrana, denominado flavocitocromo conformado por dos subunidades proteicas (gp91-phox y p22-phox) que constituyen la subunidad catalítica y un componente citosólico, conformado por tres proteínas denominadas: p47-phox, p67-phox y p40-phox.

Una vez que la célula es activada el componente citosólico debe ser trasladado para su adecuado ensamblaje con los componentes de membrana y así conformar un complejo enzimáticamente activo (5, 6). Para que este proceso se lleve a cabo de manera efectiva, p47-phox debe sufrir un cambio conformacional, mediado principalmente por eventos de fosforilación, exponiendo de esta manera su dominio SH3; que le permite interactuar con p22-phox, facilitando el reclutamiento de los otros dos componentes citosólicos hacia la membrana celular (7); además favorece que p67-phox establezca contacto con gp91-phox conduciendo así a la activación definitiva de este complejo (8). Para que todo este proceso de movilización, traslado y activación del complejo enzimático ocurra, deben participar otras proteínas pertenecientes a la familia de las GTPasas, tales como Rac1, Rac2 (ubicadas en el citosol) y Rap1A (ubicada en la membrana) (9, 10), las cuales son indispensables

para la conformación de complejo enzimáticamente activo.

Diversas células fagocíticas y no fagocíticas expresan componentes del complejo NADPH-oxidasa, pero es especialmente en los monocitos y neutrófilos donde se ha caracterizado la función microbicida de este complejo enzimático (5). Se ha evidenciado que durante la infección por el VIH, las células fagocíticas (monocitos y neutrófilos) pierden su capacidad funcional, predisponiendo así a los pacientes a sufrir infecciones oportunistas (1, 11, 12), asociado con un desequilibrio en el estrés oxidativo e incremento en la susceptibilidad a sufrir muerte celular (13). Los monocitos/macrófagos además son células susceptibles a ser infectadas por el VIH y son consideradas uno de sus principales reservorios (14).

El virus está constituido por múltiples proteínas estructurales y reguladoras, dentro de las cuales Nef es una de las que se ha caracterizado por mediar múltiples estrategias de evasión de la respuesta inmune (15). Nef es una proteína miristoilada de 27-34 kDa de peso molecular, es expresada exclusivamente por VIH1/2 y por el virus de la inmunodeficiencia simia (VIS), y se ha establecido que es una de las proteínas más importantes en la inmunopatogenia de la infección por el VIH (16), ya que incrementa la infectividad y la replicación viral (17, 18). Gran parte de los mecanismos de regulación están asociados con su capacidad de interactuar con proteínas celulares que incluyen: receptores de membrana, proteínas encargadas del tráfico intracelular, proteínas de señalización, entre otras (15, 19).

Recientemente se ha evidenciado que Nef se asocia con proteínas del hospedador a fin de mediar sus mecanismos inmunopatogénicos, una de la mejor caracterizada es la interacción con la proteína PAK2, que conduce a alteración de la quimiotaxia celular por afectar el remodelamiento de la actina, a través de promover la hiperfosforilación de la cofilina (proteína reguladora del proceso de polimerización de actina). Esta función es común de las diferentes formas alélicas de Nef, con algunas excepciones (20).

Debido a que se ha documentado que Nef puede regular la producción de superóxido en macrófagos, microglías y neutrófilos (2, 21, 22), y que

además se ha demostrado que es capaz de inducir la fosforilación de p47-phox (23), se evaluó si esta proteína era capaz de asociarse con componentes del complejo NADPH-oxidasa y promover este cambio a través de mecanismos directos. Para ello se realizó un abordaje mediante el uso de diferentes herramientas experimentales que incluyeron la microscopía de fluorescencia, la citometría de flujo, la biología molecular y la bioquímica, a fin de comprender cómo el VIH puede afectar la producción de superóxido en pacientes infectados.

Nef fue expresado y purificado como una proteína de fusión y utilizada para estimular a los PMN, a fin de evidenciar en primer lugar si la forma soluble era capaz de inducir la producción de superóxido (24). Este efecto de Nef sobre la activación de la producción de superóxido ha sido documentado anteriormente en otras poblaciones celulares, argumentándose varios mecanismos de acción, que involucran su capacidad para activar a Rac1 y a PAK, ambas implicadas en la activación del complejo NADPH oxidasa (24). Recientemente se ha demostrado que una línea de monocitos (U937) humanos, Nef interactúa con Hck (quinasa de células hematopoyéticas), de esta manera puede inducir la fosforilación y traslado a la membrana de p47-phox (23).

Nuestro grupo fue capaz de demostrar mediante ensayos de inmunoprecipitación, que Nef se asociaba a una proteína de 22 kDa, identificada mediante inmunotransferencia (*immunoblotting*) como p22-phox (25), hallazgo que fue confirmado mediante co-inmunoprecipitación inversa, es decir inmunoprecipitando a p22-phox y detectando a Nef, en lisados de polimorfonucleares previamente incubadas con esta proteína viral, y mediante inmunofluorescencia y ensayos de *Far-western*.

En vista de estos hallazgos, la asociación proteína-proteína fue analizada mediante el uso de un servidor de *web* que permite la predicción de la estructura proteica. Para ello primero obtuvimos los archivos en formato PDB de ambas proteínas, mediante el uso del servidor remoto *Phyre Server* (26). Luego se procedió a determinar los segmentos que con mayor probabilidad estaban interactuando y se evidenció que los residuos VRGE [126-129] de p22-phox y RRQDI [105-109] de

Nef, mostraban alta probabilidad de asociación. A pesar de que aun no está reportada la estructura cristalizada de la proteína p22-phox completa, se propone un modelo de predicción de la asociación de p22-phox con Nef, generado con el programa *ClusPro* (27) y el modelaje tridimensional realizado mediante el uso del programa *MolBrowser* de Molsoft, dicho modelo hipotético de interacción se muestra en la figura 1.

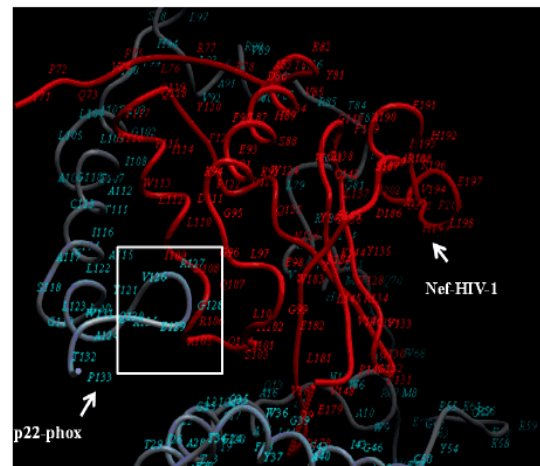


Figura 1. Modelaje sobre la asociación Nef/p22phox

La p22-phox funciona como una proteína adaptadora entre la membrana y los componentes citoplasmáticos del complejo enzimático, su asociación con Nef pudiera tener un efecto sinérgico, quizás mediante un cambio conformacional de la proteína y aumento de la actividad enzimática. Este modelo hipotético que proponemos de asociación entre p22-phox y Nef-VIH-1, es el punto de partida para el diseño de nuevos estudios que permitan corroborar los dominios participantes de esta asociación y además comprender la importancia biológica de esta interacción, lo que pudiera representar en el futuro un posible blanco para la intervención terapéutica, no solo durante la infección por VIH, sino en otras patologías asociadas a disfunción en la producción de metabolitos reactivos del oxígeno.

**Agradecimiento:** Este trabajo fue apoyado en parte por dos donaciones procedentes de FONACIT y CDCHT-ULA M-M-998-10-07-B.

**Correspondencia:** Lisbeth Berrueta, MD, PhD. Instituto de Inmunología Clínica, Universidad de Los Andes. Mérida. Venezuela, Avenida 16 de Septiembre. Edificio Louis Pasteur. Anexo LAHU-LA, PO BOX 566. Mérida 5101. Venezuela, correo electrónico: lberruet@ula.ve

## Referencias

1. Kilaeski, E.M., Shah, S., Nonnemacher, M.R., Wigdahl, B. 2009. Regulation of HIV-1 transcription in cells of the monocyte-macrophage lineage. *Retrovirology* 6:118.
2. Salmen, S., Guillermo, C., Colmenares, M., et al. 2005. Role of human immunodeficiency virus in leukocytes apoptosis from infected patients. *Invest. Clin.* 46:289-305.
3. Salmen, S., Berrueta, L., Montes, H. 2007. Immunopatología de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Revista Médica Extensión Portuguesa-ULA* 1:29-44
4. Roos, D., van Bruggen, R., Meischl, C. 2003. Oxidative killing of microbes by neutrophils. *Microbes Infect.* 5:1307-1315.
5. Babior, B.M. 2004. NADPH oxidase. *Curr. Opin. Immunol.* 16:42-47.
6. de Mendez, I., Homayounpour, N., Leto, T.L. 1997. Specificity of p47phox SH3 domain interactions in NADPH oxidase assembly and activation. *Mol. Cell. Biol.* 17:2177-2185.
7. Ago, T., Nunoi, H., Ito, T., Sumimoto, H. 1999. Mechanism for Phosphorylation-induced Activation of the Phagocyte NADPH Oxidase Protein p47phox. Triple replacement of serines 303, 304, and 328 with aspartates disrupts the sh3 domain-mediated intramolecular interaction in p47phox, thereby activating the oxidase. *J. Biol. Chem.* 274:33644-33653.
8. Dang, P., Cross, A., Babior, B. 2001. Assembly of the neutrophil respiratory burst oxidase: a direct interaction between p67PHOX and cytochrome b558. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:3001-3005.
9. Knaus, U., Heyworth, P., Evans, T., et al. 1991. Regulation of phagocyte oxygen radical production by the GTP-binding protein Rac2. *Science* 254:1512-1515.
10. Moskwa, P., Dagher, M.C., Pacllet, M.H., et al. 2002. Participation of Rac GTPase activating proteins in the deactivation of the phagocytic NADPH oxidase. *Biochemistry* 41:10710-10716.
11. Kuritzkes, D. 2000. Neutropenia, neutrophil dysfunction, and bacterial infection in patients with human immunodeficiency virus disease: the role of granulocyte colony-stimulating factor. *Clin. Infect. Dis.* 30:256-260.
12. Salmen, S., Teran, G., Borges, L., et al. 2004. Increased Fas-mediated apoptosis in polymorphonuclear cells from HIV-infected patients. *Clin. Exp. Immunol.* 137:166-172.
13. Salmen, S., Montes, H., Soyano, A., et al. 2007. Mechanisms of neutrophil death in human immunodeficiency virus-infected patients: role of reactive oxygen species, caspases and map kinase pathways. *Clin. Exp. Immunol.* 150:539-545.
14. Brown, A., Zhang, H., Lopez, P., et al. 2006. In vitro modeling of the HIV-macrophage reservoir. *J. Leukoc. Biol.* 80:1127-1135.
15. Foster, J.L., Garcia, J.V. 2008. HIV-1 Nef: at the crossroads. *Retrovirology* 5:1-13.
16. Quaranta, M.G., Mattioli, B., Giordani, L., Viora, M. 2006. The immunoregulatory effects of HIV-1 Nef on dendritic cells and the pathogenesis of AIDS. *FASEB J.* 20:2198-2208.
17. Hanna, Z., Kay, D.G., Rebai, N., et al. 1998. Nef harbors a major determinant of pathogenicity for an AIDS-like disease induced by HIV-1 in transgenic mice. *Cell* 95:163-175.
18. Roeth, J.F., Collins, K.L. 2006. Human immunodeficiency virus type 1 Nef: adapting to intracellular trafficking pathways. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70:548-563.
19. Geyer, M., Fackler, O.T., Peterlin, B.M. 2001. Structure-function relationships in HIV-1 Nef. *EMBO Reports* 2:580-585.
20. Stolp, B., Abraham, L., Rudolph, J.M., Fackler, O.T. 2010. Lentiviral Nef proteins utilize PAK2-mediated deregulation of cofilin as a general strategy to interfere with actin remodeling. *J. Virol.* 84:3935-3948.
21. Olivetta, E., Pietraforte, D., Schiavoni, I., et al. 2005. HIV-1 Nef regulates the release of superoxide anions from human macrophages. *Biochem. J.* 390(Pt 2):591-602.
22. Vilhardt, F., Plastre, O., Sawada, M., et al. 2002. The HIV-1 Nef Protein and Phagocyte NADPH Oxidase Activation. *J. Biol. Chem.* 277:42136 - 42143.
23. Olivetta, E., Mallozzi, C., Ruggieri, V., et al. 2009. HIV-1 Nef induces p47(phox) phosphorylation leading to a rapid superoxide anion release from the U937 human monoblastic cell line. *J. Cell. Biochem.* 106:812-822.
24. Manninen, A., Hiipakka, M., Vihinen, M., et al. 1998. SH3-domain binding function of HIV-1 Nef is required for association with a PAK-related kinase. *Virology* 250:273-282.
25. Salmen, S., Colmenares, M., Peterson, D.L., et al. 2010. HIV-1 Nef associates with p22-phox, a component of the

NADPH oxidase protein complex. *Cell. Immunol.* 263:87-99.

26. Kelley, L.A., Sternberg, M.J.E. 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server.

*Nat. Protoc.* 4:363-371.

27. Comeau, S.R., Gatchell, D.W., Vajda, S., Camacho, C.J. 2004: ClusPro: a fully automated algorithm for protein-protein docking. *Nucleic Acids Res.* 32:W96-W99.

## Muerte celular programada: II. Papel en el desarrollo y función de las células linfoides del sistema inmune

Masyelly Rojas, Siham Salmen, Lisbeth Berrueta

*Instituto de Inmunología Clínica, Universidad de Los Andes Mérida-Venezuela*

Recibido Abril 24, 2010. Aceptado Mayo 15, 2010

---

### *PROGRAMMED CELL DEATH: II.ROLE IN THE DEVELOPMENT AND FUNCTION OF LYMPHOID CELLS IN THE IMMUNE SYSTEM*

#### **Resumen**

La muerte celular programada representa para el sistema inmune una de sus principales herramientas a fin de mantener la homeostasis. Este proceso es altamente eficiente al controlar el desarrollo y activación de las células linfoides tanto a nivel de los órganos linfoides primarios como secundarios. Por lo tanto, durante la ontogenia se activan mecanismos de selección positiva y negativa, a fin de evitar el desarrollo y maduración de linfocitos potencialmente autorreactivos. La selección negativa se genera por la presencia de linfocitos con alta afinidad por antígenos propios, lo que condiciona la activación de mecanismo de muerte por apoptosis. En el caso de linfocitos maduros activados en la periferia, el sistema debe asegurar que sobrevivan los linfocitos con alta afinidad por los antígenos extraños, mediando así la activación de los eventos de muerte celular en aquellos con baja afinidad por estos antígenos. Los eventos que activan y conducen a la muerte celular son diferentes en los distintos estadios de maduración. En esta revisión se discutirán los eventos de la muerte celular que controlan el desarrollo de selección de estas subpoblaciones linfocitarias

**PALABRAS CLAVE:** apoptosis, muerte celular programada, linfocitos, ontogenia, vía extrínseca y vía intrínseca.

#### **Abstract**

*Programmed cell death (PCD) is one of the most important mechanisms for the immune system to maintain the homeostasis. This process is highly efficient in the control of lymphocyte development and activation, in both primary and secondary lymphoid tissues. Hence, during the ontogeny the immature lymphocytes go through positive and negative selection, in order to prevent potential autoreactive lymphocytes, to reach peripheral tissues. Therefore, negative selection is activated against every immature lymphocyte that show a high affinity for self antigens, which mostly will be eliminated by apoptosis or PCD. On the contrary, in peripheral tissues, the immune system is committed into a process of positive selection for populations capable of reacting with a high affinity against foreign antigens, in order to assure a more efficient immune response. Consequently, lymphocytes with a low affinity for foreign antigens, need to be deleted by PCD. The purpose of this review is to describe the different processes of PCD which are involved during lymphocytes ontogeny, life and differentiation.*

**KEY WORDS:** *apoptosis, programmed cell death (PCD), ontogeny, lymphocytes, homeostasis, intrinsic and extrinsic pathway.*

## 1. Introducción

La muerte celular programada o apoptosis en el sistema inmune es un proceso fundamental que regula la maduración de los linfocitos, la selección del repertorio de receptores específicos para linfocitos T (TCR) y B (BCR) y la homeostasis. Así, la muerte por apoptosis es esencial tanto para la función de los linfocitos como para el crecimiento y diferenciación (1). El sistema inmune es una sociedad de células interactuando, que consiste de linfocitos T y B, células asesinas naturales (NK), macrófagos, células dendríticas, polimorfonucleares y sus subclases. La mayoría de los componentes del sistema inmune nacen en la médula ósea; los linfocitos B, las células NK, los macrófagos, polimorfonucleares y un grupo de células dendríticas, maduran en la médula ósea y en el hígado fetal, mientras que los linfocitos T y una subpoblación de células dendríticas, maduran en el timo (2). Las células del sistema inmune trabajan en equipo y después del contacto con agentes infecciosos las células presentadoras de antígeno (APCs) profesionales, como las células dendríticas en particular, presentan péptidos antigénicos de éstos agentes infecciosos a las células T, favoreciendo la comunicación y polarización de la respuesta inmune efectora, lo que condiciona entre otros eventos la proliferación y expansión de las células involucradas, seguida de la fase de contracción donde la mayoría de los linfocitos son eliminados. Los pocos que sobreviven constituyen un pool de células de memoria (2). Esta fase final es crucial para el control del daño tisular y el desarrollo de enfermedades autoinflamatorias.

Diversas características del sistema inmune son únicas, una de ellas es la especificidad, producto de la generación del repertorio de linfocitos T y B, determinado por el reordenamiento de genes de la región variable que conforman tanto el TCR como el BCR, y la posterior selección (negativa o positiva) de estas clonas, lo que conduce a procesos altamente regulados, a fin de generar repertorios de células B y T específicos para la totalidad de antígenos, preservar la integridad de los tejidos propios y prevenir la autoinmunidad, además del control homeostático descrito previamente (des-

pués de la fase de expansión clonal, los linfocitos reactivos al antígeno deben ser valorados de nuevo hasta que el grupo de células linfoides alcance el nivel basal) (3). Este balance es logrado por un ajuste entre expansión/crecimiento y muerte celular, debido a que generalmente el sistema inmune produce más células de las que finalmente necesita, de tal manera que las células extra son eliminadas por apoptosis (4). Es así como la apoptosis controla diversos procesos como la génesis, diferenciación y control de la respuesta inmune. Debido a su papel crítico en la homeostasis tisular, en esta revisión se describirán los mecanismos moleculares del control y ejecución de la muerte celular programada (MCP), involucrados en cada uno de los eventos clave de la fisiología de la respuesta inmune.

## 2. Ontogenia de linfocitos T y papel de la MCP

El repertorio de células T es formado en el timo. Un ratón adulto joven con  $1-2 \times 10^8$  timocitos genera entre 20 a 40 millones de nuevas células T por día. Pero el número de células T que sale del timo y entra en la periferia es de solamente 2-3% del pool de células T que inicialmente fueron generadas (4). En el timo, los linfocitos T son divididos en tres estados de desarrollo: el estado doble negativo CD4-CD8- (DN), el estado doble positivo CD4+CD8+ (DP) y el estado simple positivo CD4+CD8- o CD4-CD8+ (SP). En cada etapa las señales que conducen a apoptosis son diferentes (4, 5). Uno de los eventos más crítico de este complejo proceso, es el reordenamiento del TCR y su evaluación a fin de determinar su funcionalidad para la adecuada activación de la respuesta inmune, preservando la integridad de los tejidos propios, es por ello que se ponen en juego eventos clave como la selección positiva y negativa (para TCRs potencialmente autorreactivos). Otra forma descrita de selección negativa conocida como muerte por negligencia, para aquellas células T que fallen en arreglar sus genes TCR productivamente y que no pueden interactuar eficientemente con las APCs tímicas (células epiteliales tímicas y células dendríticas) que expresan complejos péptidos-MHC propios (2).

## 2.1 Timocitos DN

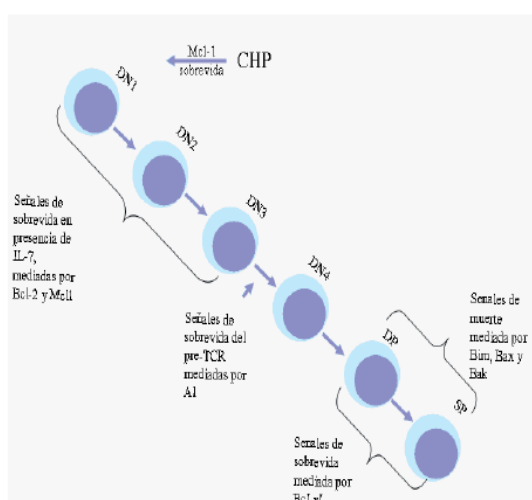
Los timocitos DN están divididos en cuatro subpoblaciones de desarrollo DN1-DN4, identificados por la expresión diferencial en su superficie de CD25 y CD44 (6). Durante el desarrollo de los timocitos DN, la citocina IL-7 ha mostrado ser crucial como una molécula pro-supervivencia. Los miembros antiapoptóticos de la vía intrínseca de la familia Bcl-2 (Bcl2, BclXL, Mcl1 y A1) (7), son las moléculas efectoras de la señalización producida por IL-7. Bcl-2 se expresa altamente en el estado DN, y en conjunto con Mcl-1 participan como un factor pro-supervivencia regulado por la señalización de la IL-7, que no solo modula la supervivencia en los timocitos, sino de células en etapas más tempranas del desarrollo, como las células hematopoyéticas pluripotenciales (CHP) y el precursor linfocítico común (PLC) (4, 5).

El TCR está constituido por dos cadenas transmembrana ( $\alpha$  y  $\beta$ ); durante el desarrollo en la etapa de DN, la cadena  $\beta$  inicia su reordenamiento y expresión, lo que constituye un punto de control del desarrollo del timocito. Otro elemento de particular importancia durante el desarrollo de los timocitos es la cadena pT $\alpha$ , que transitoriamente acompaña a la cadena  $\beta$  y ejerce otro punto de control para permitir o no la progresión en el desarrollo y conceder la expresión de la cadena  $\alpha$ , que formará parte del TCR definitivo. La selección de la cadena  $\beta$  es un evento clave en el estadio DN3 mediado por la señalización del pre-TCR. Sin una buena señal del pre-TCR, la célula DN3 entra en apoptosis, evento que es mediado tanto por la vía intrínseca (A1/Bfl-1) como por la extrínseca. La vía extrínseca puede mediar la apoptosis en las células DN3 que no reciben señal del pre-TCR y dentro de los receptores descritos que participan en esta fase están: el receptor de muerte 3 (DR3), DR5 y el receptor del TNF 1 (TNFR1), los cuales son expresados en las células DN3 (4, 5) y aparentemente median las señales en este etapa de desarrollo.

## 2.2 Timocitos DP y la muerte por negligencia

Los timocitos DP reordenan y expresan su cadena TCR $\alpha$  y una vez que es coexpresada para conformar el TCR, son objeto de selección positiva y negativa. Solamente los timocitos que expresen un TCR con una afinidad intermedia por el complejo péptido-MHC propio son seleccionados positivamente. Los timocitos que expresen un TCR con baja afinidad o que sean incapaces de interactuar con las células epiteliales tímicas, mueren por negligencia para asegurar un repertorio de TCR funcional en la periferia. Los timocitos que expresen un TCR con alta afinidad son objeto de selección negativa para ser eliminados como células T potencialmente autorreactivas, o sufren un proceso de rescate de la muerte para así formar parte del repertorio de células T reguladoras (Treg) naturales (nTreg) (4, 5). En esta fase del desarrollo de los timocitos la molécula BclxL se expresa y ejerce un papel relevante en el control de la sobrevivencia (5).

La muerte por negligencia contribuye a la mayoría de la muerte celular durante el desarrollo de los timocitos. Se estima que el 90% de los timocitos en desarrollo mueren por negligencia. La degradación de proteínas antiapoptóticas como Bcl-2 y Bcl-XL y la liberación del citocromo c en el citoplasma, son los eventos tempranos que conducen a la muerte espontánea de los timocitos por apoptosis (vía intrínseca), asociado con la expresión de la proteína proapoptótica Bim (3), involucrada en ejecutar la muerte espontánea de los timocitos. Otros miembros proapoptóticos de la familia Bcl-2, como Bax y Bak, participan en colaboración con Bim, como ejecutores en la vía intrínseca (4, 5). El resumen de los mediadores de sobrevivencia/muerte durante la ontogenia de linfocitos T, se muestra en la figura 1 (adaptado de ref. 5)



**Figura 1.** Ontogenia de linfocitos T y los mecanismos de control de la supervivencia/muerte

### 2.3 Timocitos SP y selección negativa

La selección negativa elimina a los timocitos que expresen un TCR con alta afinidad, para reducir el riesgo de autoinmunidad en la periferia. Recientemente se ha demostrado que la proteína antiapoptótica, c-FLIP es requerida para la maduración de los timocitos brindando protección contra la apoptosis en este estadio. Por esto, uno o más receptores de muerte pueden participar en el proceso de maduración del timocito hacia SP. Dentro de los receptores de la vía extrínseca que participan en la selección negativa, se destaca al sistema Fas/FasL, que juega un papel crítico en la selección negativa de timocitos semimaduros cuando el TCR recibe señales fuertes (4, 5).

### 3. Eventos que controlan la supervivencia/muerte de linfocitos B

Tres moléculas de superficie celular son elementos clave en la regulación de la vida y muerte de las células B, específicamente: BCR, CD40 y CD95. El estado de maduración y de activación, la cantidad y la cualidad de la señal y el contexto de citocinas y otros componentes del medio ambiente celular, son elementos clave en definir si se desencadena la supervivencia o muerte, en presencia de un antígeno. Evidencias obtenidas de células B normales o malignas, sugieren que la activación

del BCR induce apoptosis por la vía mitocondrial (1, 2, 8). Las células B pueden ser rescatadas de apoptosis por coestimulación vía CD40 que ha sido activado por CD40L expresado en células T y macrófagos; este estímulo podría representar la señal de supervivencia más importante para la célula B, incluso se piensa que tales señales en diferentes estados de maduración podrían también preparar a la célula B para la muerte (2).

Las células B inician su maduración en la médula ósea y la culminan en la periferia y es ahí donde reciben el desafío antigénico para activar o no los mecanismos de selección negativa. Al igual que para los linfocitos T, la molécula proapoptótica Bim juega un papel crucial durante la selección negativa y control de los linfocitos B autorreactivos, tanto en los linfocitos B inmaduros, como maduros (3). Las células B experimentan una segunda diversificación y un paso de maduración de la afinidad en el centro germinal de los órganos linfoides secundarios por un proceso conocido como hipermutación somática: la baja afinidad o los mutantes autorreactivos de células B son eliminados por apoptosis y el resto madura en células B de memoria y células plasmáticas de larga vida. Las células plasmáticas podrían constituir un importante componente de las células de memoria (2). Aunque las células T pueden usar su CD95L para el suicidio inducido por activación, las células B generalmente no expresan CD95L y mueren por una señal directa mediada por el BCR. Esto abre la posibilidad que las células T puedan matar a las células B positivas para CD95. Esto podría ser aplicado a células B tolerantes susceptibles o a células B insuficientemente estimuladas por señales de supervivencia o aquellas cuyos BCR no estén ocupados por antígenos (2, 9).

### 4. MCP durante la expansión y mantenimiento de linfocitos en la periferia

Después de la activación, las células T pasan a través de diferentes fases: (i) expansión clonal dependiente de IL -2, y fase efectora después de la sensibilización con el antígeno, (ii) fase de descenso en la cual la mayoría de las células T antígeno específicas son eventualmente eliminadas y (iii) fase en la cual ciertas células T que sobre-

viven a la fase de descenso entran en la población de células de memoria. En la primera fase las células son resistentes a la apoptosis, pero en la fase de descenso las células T se vuelven progresivamente más sensibles a la apoptosis en presencia de IL-2. Así, la IL-2 tiene un rol dual: es inicialmente obligatoria para la expansión clonal y después para la sensibilización de las células T a la apoptosis (2).

Las células T en la periferia pueden morir por diversas vías: la extrínseca dependiente de receptores de muerte, la intrínseca mitocondrial y la independiente de caspasas o perteneciente a la vía de las catepsinas (autofagia), las cuales están localizadas en los lisosomas (10, 11). La reestimulación del TCR en ausencia de una adecuada señal coestimuladora, es uno de los factores desencadenantes de la muerte del linfocito, fenómeno conocido como muerte celular inducida por activación (MCIA). Durante la MCIA se ha demostrado la participación del receptor Fas, TNFR1, TRAILR, fenómeno que puede reproducirse *in vitro*, si las células son re-estimuladas durante los primeros 4-6 días posterior a la activación, y se acompaña con la expresión de FasL, regulada por la movilización de calcio y la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) (4, 12). Los linfocitos T expresan constitutivamente la molécula Fas en su superficie, sin embargo esta expresión no necesariamente está asociada con su sensibilidad a sufrir muerte por esta vía, por ejemplo los linfocitos T vírgenes (no expuestos a antígenos extraños) son resistentes cuando son estimulados con el ligando (FasL), mientras que las activadas, las células T reguladoras (Treg) y las de memoria son susceptibles a morir vía Fas cuando son estimuladas. La adquisición de esta sensibilidad está asociada con la caída de los niveles de FLIP y probablemente también de Bcl-2 y Mcl1 (2, 13, 14). Las células T sensibilizadas se comportan como células tipo I, forman complejos DISC, inician la cascada de caspasas que resulta en apoptosis (1, 2, 8). Las células T CD4 son además responsables en parte de promover la supervivencia de células T de memoria CD8, demostrado por el hecho que la activación de linfocitos T CD8 en ausencia de la colaboración de CD4, muestran una reducida expresión de Bcl2, BclxL y c-FLIP e incremento de FasL

y TRAIL durante un segundo desafío antigénico, lo que promueve su eliminación (5). Así, la MCIA, podría servir como una segunda línea de defensa contra la autoinmunidad, para borrar células T auto-reactivas en la periferia (2), o a fin de eliminar células infectadas o dañadas, una de las moléculas involucradas en mediar esta función es Fas/FasL, que se ha visto implicada en la eliminación de células infectadas por virus, dañadas o cuando se producen en exceso (15).

La muerte puede además desencadenarse como consecuencia de la privación de citocinas, por negligencia o muerte autónoma de células activadas (MACA) (16), donde se sugiere la participación de la vía intrínseca a través de la acción de la proteína proapoptótica Bim (4, 17), y la activación de JNK y p38 (ambas miembros de las MAPK), que juegan un papel crucial en la inducción de la expresión de la proteína Bim (4). Igualmente, se ha descrito una vía alterna independiente de receptores y donde NF- $\kappa$ B ejerce un papel importante. La activación de NF- $\kappa$ B se asocia con incremento de la supervivencia debido a que promueve la inducción de la expresión de Bcl2, mientras que su supresión (hecho que ocurre durante la MCIA), favorece la muerte asociada con el incremento de ERO y este último facilita la supresión de Bcl2 e incremento de Bim (4, 18). Finalmente, al igual que en el timo, en la periferia ocurre depleción por apoptosis por negligencia, en los casos de que las células T no son estimuladas suficientemente por señales de crecimiento, y más importante aún, esto ocurre hacia el pico o en la fase de caída de la respuesta inmune para la desregulación del número de células T reactivas y para terminar la respuesta inmune. Así, una vez que el desafío antigénico culmina, el 90% de las células activadas son eliminadas por apoptosis (5).

Durante la fase de contracción de la respuesta inmune también se eliminan del 90 al 95% de las células T CD8 efectoras; los mecanismos descritos en este proceso involucran la participación tanto de la vía intrínseca como la vía extrínseca. Así, los TCR re-estimulados en presencia de IL-2, incrementan la sensibilidad de estas células a morir vía Fas y TNFR1, producto en parte al efecto inhibitorio de esta interleucina sobre la expresión de FLIP. En el caso de la vía intrínseca se ha

evidenciado incremento de la proteína Noxa en los linfocitos T CD8+, durante la fase de contracción. Solo las células que sobrevivirán y formaran parte del pool de células de memoria expresan el receptor de IL-7 (IL-7R) que en conjunto con la IL-15 proveerán señales de sobrevida en esta población celular (5).

#### 4.1 Moléculas coestimuladoras y su papel en la supervivencia de células T

Varios son los factores que determinan el destino de los linfocitos posterior a la estimulación periférica: i) el tipo de antígeno; ii) la existencia o no de reactividad cruzada; iii) la presencia de señales coestimuladoras, y iv) el microambiente de estimulación (19). Las células T activadas por medio del TCR pueden ser salvadas de MICA por una segunda señal de moléculas coestimuladoras, moléculas de adhesión o receptores de citocinas. CD28 es el mayor correceptor coestimulador expresado sobre los linfocitos T y funciona aumentando la producción de citocinas y la inducción del receptor de citocinas. Bajo ciertas condiciones CD28 puede sensibilizar a las células T hacia apoptosis, pero generalmente aumenta la proliferación celular y la viabilidad de las células T (2). El efecto de coestimulación se evidencia a tres niveles: (i) fuerte sobre-regulación de c-FLIP, (ii) sobrerregulación de Bcl-xL inducido por la activación de PI3K/Akt y (iii) desregulación del ARN mensajero de CD95L y de la proteína en un tiempo definido (8-12 horas luego de la estimulación). Así, la coestimulación bloquea ambas vías: tipo I y tipo II en las células T, y más tardíamente, también bloquea la expresión de CD95L (2). Se ha descrito además la participación de otra molécula coestimuladora responsable en promover la sobrevida de linfocitos T CD4 de memoria, OX40 y CD27 que induce la expresión de Bcl-xL, así como también Bfl protegiéndolas de la muerte y contribuyendo así al pool de memoria (5).

#### 5. Papel de las células accesorias de la respuesta inmune durante la apoptosis

Las células T y B influyen una sobre la otra, y además en la persistencia, expansión clonal y

apoptosis de otras células. Sin embargo, las APCs son las primeras en iniciar la inmunidad dependiente de la célula T. Las APCs son capaces de engullir células necróticas y células apoptóticas y presentar sus antígenos a las células T. El material expuesto puede activar o calmar a la célula T. Se sabe que las APCs no son espectadores pasivos, las APCs activadas sintetizan CD95L, TRAIL, TNF y otros factores que modulan la actividad y función de las células T (2). Por otro lado, las células T activadas influyen en la función de las APCs y por esto afectan el curso de la respuesta inmune. Al inicio de la respuesta inmune la mayoría de las APCs son resistentes a la apoptosis para ejercer su función. Así, el cambio de estas células hacia desregulación de la respuesta se convierte en una cuestión importante. Dos miembros de la superfamilia TNF-R: CD40 y CD95, poseen roles adversos en este contexto: el sistema CD40-CD40L permite la supervivencia de las APCs y el sistema CD95-CD95L induce su muerte. La plasticidad del sistema inmune podría requerir que las células puedan dar y recibir señales de vida y señales de muerte al mismo tiempo y que el contexto celular determina cual señal dicta la respuesta celular (2).

#### 5.1 Características inmunogénicas de la muerte celular

Las células que sufren muerte deben ser reconocidas y eliminadas a fin de evitar que se active el proceso inflamatorio, así la fagocitosis es el principal evento que promueve la eliminación de las células que mueren. Estas células apoptóticas expresan señales de reconocimiento que atraen fagocitos profesionales y para eso atraen su removimiento. Una de tales señales es el glicerolípido lisofosfatidilcolina (un constituyente normal de la membrana) producido por fosfolipasa A2 independiente de calcio (iPLA2, también conocido como PLA2G6). Sin embargo, diferentes hallazgos indican que tales señales son más importantes para la inducción de tolerancia, que para el inicio de una respuesta inmune. Por el contrario, otras señales tales como la liberación de nucleótidos (incluyendo ATP y UTP) por neuronas dañadas en ratones, se piensa que atraen células de la mi-

croglia al sitio de daño (8).

El producto de los nucleótidos, tales como el ácido úrico, pueden funcionar como patrones moleculares asociados a daño (DAMPs), que actúan activando al sistema inmune, a través de la estimulación de la producción de citocinas inflamatorias tales como IL-1 $\beta$ , IL-8 e IL-33, cuya secreción dependerá de la activación de caspasa-1 en el inflamasoma. Existe una gran variedad de estas proteínas que alertan al sistema inmune dentro de las cuales destaca, la proteína HMGBI (proteína del grupo de la caja I de alta movilidad con unión al ADN) que es liberada durante la necrosis primaria y durante la necrosis secundaria que se produce luego de apoptosis (8). Todas las células que mueren pueden liberar DAMPs, pero el proceso de apoptosis puede modificar estas moléculas inmunostimulatorias para promover tolerancia (8).

Se tiene un ejemplo claro para explicar los efectos tolerogénicos de las células apoptóticas en el cual estas células y las fagocíticas liberan citocinas inmunosupresoras, en contacto con los macrófagos, las células apoptóticas inducen la secreción de citocinas antiinflamatorias tales como TGF- $\beta$ , IL-10, el factor activador de plaquetas (PAF) y prostaglandina E2 (PGE2) (4, 5, 8). Las células apoptóticas pueden estimular la producción de mediadores lipídicos tales como 15-lipoxigenasa y 15-ácido hidroxieicosatetraenoico, los cuales pueden participar en la resolución de la inflamación. En otro orden de ideas, el TGF- $\beta$ , liberado por células dendríticas o macrófagos que han engullido células apoptóticas, podría promover la generación de células Treg inducidas. Tales células Treg pueden contribuir al efecto de las células apoptóticas sobre el sistema inmune, sin embargo la situación es más compleja: si IL-6 también está presente, por ejemplo, debido a la participación de TLR (receptores tipo Toll) u otras señales inflamatorias, las células apoptóticas pueden conducir a la generación de células inflamatorias T ayudadoras más que células Treg, un fenómeno que recientemente se ha demostrado que ocurre cuando la apoptosis es inducida en la infección bacteriana (4, 5, 8).

Se ha sugerido el siguiente mecanismo de inducción de tolerancia: las células que entran en apoptosis pueden producir DAMPs, tales como

HMGBI, sin embargo, la activación de caspasas y de ERO pueden oxidar a HMGBI, de modo que pueda quedar inactivo. Adicionalmente, las citocinas tales como TGF- $\beta$  e IL-10 pueden ser liberadas de las células apoptóticas o alternativamente, las células apoptóticas pueden estimular sobre los macrófagos la producción de estas moléculas o bien otras como PAF y PGE2 (8). La producción de estas citocinas induce la diferenciación de células T CD4+ vírgenes hacia células Treg y células T ayudadoras tipo 2 (Th2), las cuales inhiben la respuesta inmune pro-inflamatoria. Simultáneamente, las células T CD8+ son estimuladas en ausencia de células T CD4+ activadas, resultando en la diferenciación de linfocitos T citotóxicos (CTLs) incapacitados. Estos CTLs incapacitados, funcionan primariamente como células efectoras y parecen ser totalmente funcionales. Sin embargo, luego de una reexposición al antígeno, estos CTLs liberan el ligando de muerte TRAIL, lo que resulta en su remoción y supresión de una futura mediación de la respuesta por células T CD4+ y en consecuencia la inducción de tolerancia (8).

## 6. Mecanismos de muerte no apoptóticos

Evidencias emergentes indican que la apoptosis no es el único mecanismo de muerte celular, aunque quizá las células puedan elegir uno de los muchos mecanismos de muerte cuando ellas así lo disponen (20).

### 6.1 Muerte celular tipo II

Se caracteriza por la acumulación de vesículas encerradas por doble membrana. Estas vesículas son características de la autofagia y por esto se le conoce como muerte celular por autofagia. La autofagia es un mecanismo catabólico intracelular conservado evolutivamente que opera a bajos niveles bajo condiciones normales para mediar la degradación de componentes citoplasmáticos, agregados proteínicos y organelas intracelulares envejecidas, por la formación de vesículas encerradas por doble membrana llamadas autofagosomas. El contenido del autofagosoma es degradado luego de su fusión con lisosomas por enzimas. Bajo condiciones normales la autofagia tiene un

rol importante en el mantenimiento de la homeostasis intracelular. Este proceso es controlado por un grupo grande de genes ATG (relacionados con la autofagia) que aparecen conservados desde las levaduras hasta los humanos (21). La autofagia puede contribuir a la muerte celular que es inducida por los virus, como el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (ver más adelante). Aunque el mecanismo por el cual la autofagia es activada por env no es claro, los resultados indican que la autofagia podría contribuir a la muerte celular de una manera no autónoma, proveyendo un mecanismo por el cual el virus podría inducir la muerte celular independientemente de la replicación viral. La autofagia puede asumir la muerte cuando la apoptosis no está disponible (22).

### 6.2 Necroptosis como una forma de necrosis regulada

La necroptosis la cual representa un tipo de necrosis programada, es otro ejemplo intrigante de muerte celular no apoptótica. Su descubrimiento fue promovido por observaciones de los clásicos estímulos apoptóticos, tales como el entrecruzamiento entre los receptores de muerte y sus ligandos, en ocasiones cuando la apoptosis es refrenada por los inhibidores de caspasas o a través de mutaciones en caspasa-8 o FADD. Aunque la necroptosis es activada por el mismo estímulo que inicia la apoptosis, las características morfológicas de la necroptosis, tales como el encerrado de organelas, la rápida disfunción mitocondrial, la permeabilización de la membrana plasmática y la carencia de fragmentación nuclear, son características de la necrosis celular (22).

### 6.3 Muerte celular mediada por la polimerasa I poli-ADP-ribosa (PARPI)

La PARPI es una enzima nuclear que tiene un papel clave en el mantenimiento de la estabilidad del genoma, que es rápidamente activada cuando el ADN sufre rupturas y esta recluta factores reparadores de ADN. La pérdida de PARPI conduce a un incremento de la sensibilidad por el daño al ADN, los cuales promueven el desarrollo de inhibidores de PARPI. Sin embargo, la sobreac-

tivación de esta polimerasa puede conducir a la muerte celular independiente de caspasas. PARPI puede mediar la muerte celular en escenarios diferentes. Por ejemplo, el daño alquilante del ADN promueve una rápida depleción del NAD<sup>+</sup> citosólico mediado por PARPI, lo cual conduce a una muerte necrótica por colapso energético en células glicolíticas. PARPI también puede mediar la muerte celular que es inducida por daño al ADN secundario asociado con daño neuronal agudo. En este caso, la muerte celular neuronal conduce al traslado de polímeros de poli-ADP-ribosa hacia el citosol, dando lugar al traslado de AIF desde la mitocondria hacia el núcleo, donde es mediada la muerte celular (23).

En muchos tipos celulares se adoptan destinos distintos luego de la estimulación con TNF- $\alpha$  (20):

(a) En numerosos casos, la activación de la señalización NF- $\kappa$ B, resulta de la formación de un complejo activador de NF- $\kappa$ B y de la poliubiquitinación de RIPI (proteína I de interacción con el receptor), y es una respuesta primaria a TNF- $\alpha$ ; en este escenario, la ubiquitinación de RIPI limita la formación del complejo de señalización proapoptótico, en consecuencia NF- $\kappa$ B actúa sobre regulando transcripcionalmente la expresión de genes prosupervivencia. El bajo nivel de caspasa-8 degrada a RIPI inhibiendo la necroptosis (22).

(b) La activación de la apoptosis como una respuesta primaria a TNF- $\alpha$  requiere de condiciones específicas que promuevan la apoptosis tales como la presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas (cicloheximida), la sobreexpresión del polipéptido proteína tipo dedos de zinc (ZFRA) o la deficiencia en las quinasas de adhesión focal (FAK) en la señalización de quinasas, lo cual conduce a una eficiente formación de DISC y a la activación de caspasa-8 (22).

(c) La activación de la necroptosis como una respuesta primaria a TNF- $\alpha$  requiere de la supresión de señales apoptóticas o al menos de la actividad de caspasas (por inhibidores de caspasas). La pérdida rápida de ATP, condición de la producción de especies reactivas del oxígeno y del nitrógeno o de la isquemia, pueden proveer un medio ambiente no permisivo para la apoptosis (22).

## 7. Trastornos del sistema inmune que involucran alteración de la apoptosis

La apoptosis es un proceso fundamental de regulación del sistema inmune; su descarrilamiento conduce a muerte celular exagerada o a bloqueo de la misma. Diversos ejemplos de tales enfermedades con inhibición o exagerada apoptosis se discuten a continuación (1, 2, 20).

### 7.1 Defectos asociados con activación deficiente de los mecanismos de muerte celular

Se han identificados varias mutaciones que causan desordenes complejos del sistema inmune, manifestados como linfadenopatía y autoinmunidad (15). Una es la mutación recesiva *lpr* (linfoproliferación). Los síntomas de esta enfermedad son similares a las del lupus eritematoso sistémico. En estos casos las células T aberrantes se acumulan, debido a un defecto en el splicing o empalme de *lpr*, lo que resulta en una gran disminución de la expresión de CD95 (2). En humanos se han reportado enfermedades similares con disfunción de CD95 (síndrome linfoproliferativo autoinmune tipo 1a, ALPS) y CD95L (ALPS tipo Ib). Los niños con ALPS muestran linfadenopatía no maligna, población de células T alteradas y aumentadas de tamaño y autoinmunidad severa. Muchos de estos niños muestran una mutación en el dominio de muerte de CD95 (2). En algunos casos (ALPS tipo Ib), la apoptosis mediada por CD95 está alterada sin evidencia de mutaciones en CD95 o CD95L. Esto sugiere que otros defectos afectan las vías de señalización CD95 y no a esta molécula per se. Ejemplo de ello es la recientemente reportada mutación de la caspasa-10 (2).

Otra falla descrita es la desregulación de Bim (molécula proapoptótica que participa en la ontogenia y homeostasis de la respuesta inmune) y su papel en la inmunopatogenia de la artritis reumatoidea se ha puesto recientemente en evidencia. La alteración de esta molécula se asocia con proliferación descontrolada de linfocitos T y producción de citocinas proinflamatorias tales como la IL-17. Además, se ha descrito que Bim participa en la eliminación de linfocito B autorreactivos (24), lo que sugiere que pueda estar asociado con

la presencia de linfocitos B productores de factor reumatoideo y otros autoanticuerpos característicos de esta patología. Finalmente, tal y como se describió en la primera parte de esta revisión (7), los cuerpos apoptóticos deben ser adecuadamente eliminados para que durante este proceso no se generen eventos que conduzcan al daño tisular. En enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico, se ha mencionado una deficiente capacidad para fagocitar y destruir estos cuerpos apoptóticos (25), lo que pudiera estar mediando parte del daño tisular y la activación de linfocitos T autorreactivos.

### 7.2 Apoptosis y tumores linfoides

Los defectos asociados a bloqueo de la apoptosis son críticos en la generación y persistencia de tumores. Los linfomas foliculares resultan de la traslocación de *bcl-2* dentro del locus de la cadena pesada de inmunoglobulinas y de la expresión no regulada de *bcl-2* bajo la influencia del aumento de inmunoglobulinas. La sobreexpresión de *bcl-2* suprime la apoptosis y favorece la proliferación del tumor. Esto es apoyado por el incremento de la incidencia de tumores en animales transgénicos para *bcl-2*. De manera similar, *c-FLIP* y la mayoría de otros supresores de la proapoptosis, que podrían en principio actuar como supresores de tumores. Además, la resistencia a la quimioterapia podría resultar de mecanismos antiapoptóticos similares, que se conocen que bloquean la apoptosis en condiciones normales (2, 26).

En el desarrollo de tumores se han descrito múltiples mecanismos de evasión y eliminación por el sistema inmune. Estos mecanismos comprenden la ausencia de expresión de molécula coestimuladoras o MHC y estrategias activas tales como la producción de citocinas inmunosupresoras. Adicionalmente, CD95 pudiera tener una función inmunosupresora. Un número de tumores, incluyendo tumores linfoides, son resistentes a la apoptosis y expresan CD95L funcional y de manera constitutiva o después de quimioterapia. Esta situación puede permitir a las células tumorales eliminar linfocitos anti-tumorales y suprimir la respuesta inmune antitumoral (2, 26).

CD95L se expresa constitutivamente en sitios

immunoprivilegiados, tales como los testículos y los ojos, y podría contribuir al estatus de inmunoprivilegio por apoptosis inducida en linfocitos infiltrados. Pero también se ha reportado que la sobreexpresión de CD95L en los injertos no confiere simplemente privilegio, necesariamente induce una respuesta granulocítica que acelera el rechazo (2, 26).

### 7.3 Apoptosis en la infección por el VIH

Durante la infección por el VIH, se evidencia un incremento de la tasa de recambio de linfocitos T, producto de la tasa acelerada de muerte celular, asociado a incremento compensatorio y limitado en la tasa de proliferación y el estado de hiperactivación celular (19). Así, la depleción de células T está relacionada con la muerte celular acelerada. El principal evento que se genera durante la infección es la muerte de múltiples poblaciones celulares relacionadas con la defensa del hospedador, y el deterioro progresivo de la respuesta inmune. El desbalance de la respuesta inmune se inicia con la destrucción de los linfocitos T CD4 y de las células T CD4 de memoria residentes del tejido linfoidal asociado al tracto gastrointestinal (TLAG), ya que estas células expresan CCR5 (27).

Otro evento crítico en el deterioro de la respuesta inmune es el estado de hiperactivación crónica, lo que promueve que se active la muerte celular tanto a través de la vía extrínseca como intrínseca, favoreciendo la MCI. Esto es además favorecido por reducción de la expresión de Bcl2 en los linfocitos T residentes de los nódulos linfáticos y en sangre periférica (28, 29). Además, la condición de hiperactivación condiciona un incremento de la susceptibilidad a la muerte inducida por CD95, no solo en linfocitos, sino también en elementos de la inmunidad innata (27, 30-32).

Los productos de genes virales reguladores (por ejemplo, Tat de HIV-1), producido por células infectadas penetran en células no infectadas y confieren a estas células hipersensibilidad hacia la apoptosis mediada por CD95 inducida por el TCR. Tat induce un estado prooxidativo en las células afectadas, incrementando la expresión de CD95L y facilitando el suicidio mediado por CD95 (1, 2). Adicionalmente a la apoptosis me-

diada por CD95, un nuevo y rápido tipo de apoptosis se ha descrito, la cual es inducida en receptores de superficie celular unidos a HIV: CD4 y CXCR4. La potencialidad de este fenómeno y su especificidad por las células T CD4+ sugiere que esto pudiera tener un rol significativo en la depleción de las células T ayudadoras en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida o SIDA (2).

Otro receptor recientemente descrito y que se asocia con los eventos de muerte celular durante la infección por el VIH es PD-1; esta molécula se encuentra en elevada densidad en los linfocitos T CD8 y su ligando PD-L1 sobre las APCs en los pacientes seropositivos, lo que promueve una reducción de la proliferación e incremento de la muerte de las células linfoides, una vez que ellas establecen contacto con las APCs, PD-L1 (27).

Se ha descrito recientemente que la autofagia contribuye con la depleción y deterioro de la respuesta inmune. La autofagia se ha evidenciado tanto en las células infectadas como en las adyacentes o también denominadas espectadoras inocentes, al parecer este evento es promovido por el receptor CXCR4 que interactúa con la proteína Env viral (33), y esta asociación activa la autofagia por promover la hemifusión o fusión total de dos células o formación de sincitia (27).

**Correspondencia:** Lisbeth Berrueta, MD, MSc, PhD. Instituto de Immunología Clínica Facultad de Medicina, Universidad de Los Andes, Avenida 16 de Septiembre. Edificio Louis Pasteur. Anexo IAHULA, POBOX 566. Mérida 5101. Venezuela, e-mail: lberruet@ula.ve.

### Referencias

1. Giovannetti, A., Pierdominici, M., Di Iorio, A., et al. 2008. Apoptosis in the homeostasis of the immune system and in human immune mediated diseases. *Curr. Pharm. Des.* 14:253-268.
2. Krammer, P.H. 2000. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature* 407:789-795.
3. Strasser, A., Puthalakath, H., O'Reilly, L.A., Bouillet, P. 2008. What do we know about the mechanisms of elimination of autoreactive T and B cells and what challenges remain. *Immunol Cell Biol.* 86:57-66.
4. Krammer, P.H., Arnold, R., Lavrik, I.N. 2007. Life and

- death in peripheral T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 7:532-542.
5. Zhang, N., Hartig, H., Dzhagalov, I., et al. 2005. The role of apoptosis in the development and function of T lymphocytes. *Cell Res.* 15:749-769.
6. Klein, L., Hinterberger, M., Wimsberger, G., Kyewski, B. 2009. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat. Rev. Immunol.* 9:833-844.
7. Rojas, M., Salmen, S., Berrueta, L. 2009. Muerte celular programada: I. Activación y mecanismos de regulación. *Rev. Med. Ext. Portuguesa - ULA* 4:92-106.
8. Green, D.R., Ferguson, T., Zitvogel, L., Kroemer, G. 2009. Immunogenic and tolerogenic cell death. *Nat. Rev. Immunol.* 9:353-363.
9. Mollinedo, F., Gajate, C. 2006. Fas/CD95 death receptor and lipid rafts: new targets for apoptosis-directed cancer therapy. *Drug Resist. Update* 9:51-73.
10. Arnold, R., Brenner, D., Becker, M., et al. 2006. How T lymphocytes switch between life and death. *Eur. J. Immunol.* 36:1654-1658.
11. Kroemer, G., Jäätelä, M. 2005. Lysosomes and autophagy in cell death control. *Nat. Rev. Cancer* 5:886-897.
12. Kaminski, M., Kiessling, M., Süß, D., et al. 2007. Novel role for mitochondria: protein kinase C $\theta$ -dependent oxidative signaling organelles in activation-induced T-cell death. *Mol. Cell Biol.* 27:3625-3639.
13. Fritzsching, B., Oberle, N., Eberhardt, N., et al. 2005. In contrast to effector T cells, CD4+CD25+FoxP3+ regulatory T cells are highly susceptible to CD95 ligand- but not to TCR-mediated cell death. *J. Immunol.* 175:32-36.
14. Hildeman, D.A., Zhu, Y., Mitchell, T.C., et al. 2002. Activated T cell death in vivo mediated by proapoptotic bcl.2 family member bim. *Immunity* 16:758-767.
15. Strasser, A., Jost, P.J., Nagata, S. 2009. The many roles of FAS receptor signaling in the immune system. *Immunity* 30:180-192.
16. Hildeman, D.A., Zhu, Y., Mitchell, T.C., et al. 2002. Molecular mechanisms of activated T cell death in vivo. *Curr. Opin. Immunol.* 14:354-359.
17. Erlacher, M., Michalak, E.M., Kelly, P.N., et al. 2005. BH3-only proteins Puma and Bim are rate-limiting for gamma-radiation- and glucocorticoid-induced apoptosis of lymphoid cells in vivo. *Blood* 106:4131-4138.
18. Hildeman, D.A., Mitchell, T., Aronow, B., et al. 2003. Control of Bcl-2 expression by reactive oxygen species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:15035-15040.
19. Asquith, B., Borghans, J.A., Ganusov, V.V., Macallan, D.C. 2009. Lymphocyte kinetics in health and disease. *Trends Immunol.* 30:182-189.
20. Degterev, A., Yuan, J. 2008. Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:378-390.
21. Glick, D., Barth, S., Macleod, K.F. 2010. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *J. Pathol.* 221:3-12.
22. Challa, S., Chan, F.K. 2010. Going up in flames: necrotic cell injury and inflammatory diseases. *Cell Mol. Life Sci.* 67:3241-3253.
23. Lieberman, J. 2010. Granzyme A activates another way to die. *Immunol. Rev.* 235:93-104.
24. Hutcheson, J., Perlman, H. 2008. BH3-only proteins in rheumatoid arthritis: potential targets for therapeutic intervention. *Oncogene* 27 Suppl 1:S168-175.
25. Nagata, S., Hanayama, R., Kawane, K. 2010. Autoimmunity and the clearance of dead cells. *Cell* 140:619-630.
26. Igney, F.H., Krammer, P.H. 2002. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat. Rev. Cancer* 2:277-288.
27. Gougeon, M.L., Piacentini, M. 2009. New insights on the role of apoptosis and autophagy in HIV pathogenesis. *Apoptosis* 14:501-508.
28. Bofill, M., Gombert, W., Borthwick, N.J., et al. 1995. Presence of CD3+CD8+Bcl-2(low) lymphocytes undergoing apoptosis and activated macrophages in lymph nodes of HIV-1+ patients. *Am. J. Pathol.* 146:1542-1555.
29. Boudet, F., Lecoq, H., Gougeon, M.L. 1996. Apoptosis associated with ex vivo down-regulation of Bcl-2 and up-regulation of Fas in potential cytotoxic CD8+ T lymphocytes during HIV infection. *J. Immunol.* 156:2282-2293.
30. Salmen, S., Guillermo, C., Colmenares, M., et al. 2005. Role of human immunodeficiency virus in leukocytes apoptosis from infected patients. *Invest. Clin.* 46:289-305.
31. Salmen, S., Montes, H., Soyano, A., et al. 2007. Mechanisms of neutrophil death in human immunodeficiency virus-infected patients: role of reactive oxygen species, caspases and map kinase pathways. *Clin. Exp. Immunol.* 150:539-545.
32. Salmen, S., Terán, G., Borges, L., et al. 2004. Increased Fas-mediated apoptosis in polymorphonuclear cells from HIV-infected patients. *Clin. Exp. Immunol.* 137:166-172.
33. Espert, L., Denizot, M., Grimaldi, M., et al. 2006. Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. *J. Clin. Invest.* 116:2161-2172.

# Enfermedad tiroidea autoinmune

Librado Ortiz-Ortiz

*Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, y Facultad de Medicina, Extensión Portuguesa-ULA, Guanare, Edo. Portuguesa, Venezuela*

Recibido, Mayo 10, 2010. Aceptado Mayo 30, 2010

## AUTOIMMUNE THYROID DISEASE

### Resumen

Se presenta una descripción breve de los principales aspectos inmunológicos de la enfermedad tiroidea autoinmune, una de las enfermedades autoinmunes más frecuentes, donde se han implicado tanto aspectos genéticos, ambientales, como endógenos. Se revisan los autoantígenos implicados, los anticuerpos que producen, y el significado clínico de los mismos frente a la tiroides. Asimismo, se evalúa la participación de los linfocitos T CD4+ y CD8+ y las citocinas que producen en el proceso autoinmune. Finalmente se hace una revisión del mecanismo de daño a la tiroides, donde participa de manera importante la apoptosis.

**PALABRAS CLAVE:** enfermedades autoinmunes, autoantígenos, enfermedad de Hashimoto, enfermedad de Graves, tiroglobulina, tiroperoxidasa, receptor de la TSH, apoptosis

### Abstract

*A brief description of the main immunological aspects of the autoimmune thyroid disease, one of the most frequent autoimmune diseases, where genetic, environmental and endogenous factors have been implicated, is presented. A review of the main self antigens involved, the antibody they elicit and their clinical effect on the thyroid gland, is done. Also, the participation of the T CD4+ and CD8+ cells as well as the cytokines they produced during the autoimmune processes, are discussed. Finally, an analysis on the damage mechanism on the thyroid gland, where apoptosis has an important role, is made.*

**KEY WORDS:** autoimmune diseases; autoantigens, Hashimoto's disease, Grave's disease, thyroglobulin, thyroperoxidase, TSH-receptor, apoptosis

### Introducción

En general, se acepta que la enfermedad tiroidea autoinmune (ETAI) es un trastorno autoinmune complejo y poligénico órgano-específico, donde juega un papel importante la interacción de factores ambientales, genéticos y endógenos en la iniciación, progresión y resultado clínico del padecimiento. La ETAI es la más común de las enfermedades autoinmunes y se presenta con mayor frecuencia en mujeres entre los 30 y 50 años de edad, aún cuando la prevalencia aumenta con la

edad (1). La mayoría de los trastornos de la tiroides son causados por enfermedad autoinmune y dan lugar a un funcionamiento disminuido o aumentado de la tiroides.

En las ETAIs los principales genes de susceptibilidad que se han identificado y caracterizado son los loci genéticos HLA-DR, así como los genes distintos del sistema principal de histocompatibilidad (MHC) que incluyen a CTLA-4, CD40, PTPN22, tiroglobulina (Tg) y el receptor de la hormona estimulante de la tiroides (TSH-R). Asimismo, se ha reportado la participación de facto-

res ambientales, entre los que se han mencionado el contenido de yodo en la dieta, las infecciones, el fumar, y posiblemente el estrés, entre otros (2, 3).

La ETAI incluye varias formas clínicas de tiroiditis autoinmune, como la tiroiditis de Hashimoto (TH) clásica, la enfermedad de Graves (EG), hipotiroidismo autoinmune atrófico, tiroiditis postparto, tiroiditis silente, y la orbitopatía asociada a la tiroides. De ellas las dos primeras son las más comunes y las que comparten muchas características inmunológicas. Una forma de la enfermedad puede cambiar a la otra a medida que el proceso inmune avanza. Un buen número de estos pacientes progresa a hipotiroidismo espontáneamente después del tratamiento con drogas antitiroideas o iatrogénicamente después de la terapia radioactiva o cirugía (4).

Una de las características invariables de las ETAs es la producción de anticuerpos hacia los principales autoantígenos de la tiroides, específicamente, la tiroperoxidasa o peroxidasa tiroidea (TPO), enzima que cataliza la organificación del yodo; la Tg, proteína principal de la coloide, y el TSH-R (5).

Todas las formas de ETAs están asociadas con un infiltrado linfocítico en la tiroides de células T CD4+ y CD8+, las cuales son en gran parte responsables de generar autorreactividad mediada por las células T y B, aunque también se encuentran linfocitos autorreactivos tiroideos en otros sitios, como los ganglios linfáticos que drenan la tiroides y la médula ósea. La respuesta autoinmune inicial parece ser la regulación de la secreción aumentada de citocinas, como el interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) por las células T CD4+, que da lugar a un aumento en la expresión de moléculas del MHC de clase II en los tirocitos, lo cual parece aumentar la expansión de células T autorreactivas dando lugar a la característica respuesta inflamatoria que se observa a medida que el padecimiento progresa. Los tirocitos son el blanco de la apoptosis ocasionando hipotiroidismo, y en el caso particular de la TH otro factor que contribuye puede ser el anticuerpo inhibidor de la TSH circulante. En el lado opuesto encontramos a la EG, donde los pacientes sufren de hipertiroidismo. La activación de células T CD4+ específicas

para tiroides ocasiona el reclutamiento de células B autorreactivas, y el desarrollo de una respuesta inmune estimuladora de la tiroides a través de anticuerpos antitiroideos (6).

La biosíntesis de hormonas tiroideas requiere de la captación de yodo hacia el tirocito y su salida hacia el lumen folicular, donde es organificado. La captación de yodo dentro del tirocito es mediada por una glicoproteína de membrana intrínseca que se denomina *simporter* sodio-yodo (NIS), la cual cotransporta dos cationes de sodio por cada anión de yodo. El transporte de yodo mediado por NIS es manejado por el gradiente electroquímico de sodio generado por la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa. La NIS es estimulada por la TSH, aumentando la captación de yodo y la iodación de la tirosina. El defecto en la captación-transporte de yodo se produce por mutaciones del gen NIS (cromosoma 19) y alteración consiguiente de la proteína NIS (7, 8).

### Autoantígenos

Como ya se mencionó, se han identificado tres principales antígenos tiroideos patogénicamente importantes, específicamente: TPO, Tg y TSH-R. En la última década, estos tres antígenos han sido clonados (9-12). Asimismo, se ha descrito la clonación del *simporter* (13).

### TPO

La TPO es una enzima que se encuentra normalmente en la glándula tiroides, y juega un papel importante en la producción de hormonas tiroideas. Esta enzima en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> cataliza la iodación de los residuos de tirosilo de la Tg y reacción de acoplamiento para la síntesis de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>. La TPO es una glicoproteína de 107 kDa, constituida por 993 aminoácidos (aa), que se encuentra ligada a la membrana y se localiza en el citoplasma y en concentraciones elevadas sobre la superficie apical de los tirocitos. Anteriormente se le conoció como antígeno microsomal tiroideo (9). La molécula posee múltiples determinantes antigénicos (epítopes) para las células T y B, y la respuesta de anticuerpos hacia TPO no muestra usualmente una restricción de anticuerpos anti-

TPO a una subclase de inmunoglobulina G (14). La TPO es el antígeno responsable mayoritariamente de la autoinmunidad microsomal tiroidea (15).

### Tg

La Tg es la proteína mayoritaria de la célula tiroidea y el soporte estructural sobre el que se sintetizan las hormonas tiroideas. La TSH estimula la salida de Tg del tiroides y la T4 libre la suprime, por lo que sus valores séricos, en realidad lo que indican es la presencia de tejido tiroideo y su índice de actividad glandular (16, 17). La Tg es una glicoproteína de 660 kDa compuesta de dos subunidades idénticas de 330 kDa; es secretada por las células foliculares de la tiroides hacia el lumen folicular, y almacenada como coloide. Cada molécula de Tg tiene aproximadamente 100 residuos de tirosina, donde la cuarta parte se encuentra iodada. Estos residuos se acoplan para formar las hormonas tiroideas triyodotironina (T3) y tiroxina (T4). La secuencia de la Tg humana se conoce (18). Cuando la TSH estimula las células tiroideas, la Tg es endocitada e hidrolizada en los lisosomas, liberando T3 y T4. La localización exacta de los epítopes de las células T y B dentro de la Tg se desconocen (19). Un epítipo fundamental de las células T en la tiroiditis espontánea de los pollos obesos (OS) contiene iodo, y se ha encontrado que la Tg escasamente iodada es pobremente inmunogénica (20).

### TSH-R

TSH-R es un miembro de la familia de receptores acoplados a la proteína G. El enlace de la TSH a su TSH-R, presente sobre las células tiroideas, conlleva a la estimulación a través de segundos mensajeros que involucra predominantemente AMP cíclico (AMPC) y concentraciones elevadas de inositol 1,4,5-trifosfato y diacilglicerol, que resulta finalmente en la modulación de la expresión del gen tiroideo (21, 22).

El TSH-R ha sido caracterizado y se sabe que tiene un dominio extracelular (A) que contiene 398 aa, un dominio transmembranal (B) de 266 aa, organizado en siete asas, y un dominio intra-

celular de 83 aa. Al igual que la TPO, contiene múltiples epítopes para las células T y B. El TSH-R presenta 7 segmentos que se extienden en la membrana, característica que lo relaciona estrechamente con los receptores de otras hormonas glicoproteicas, como la hormona luteinizante y la foliculo estimulante (23-25). La traducción de ambas subunidades de una sola especie de ARNm indica que el TSH-R se forma por degradación intramolecular de un precursor más grande. La degradación tiene lugar en el receptor maduro después de que alcanza la superficie celular (26).

La obtención del TSH-R para uso diagnóstico o de investigación ha sido difícil, ya que es una molécula lábil con una gran estructura conformacional, y solo pequeñas cantidades pueden ser purificadas del tejido tiroideo humano. Cuando se expresa en células procarióticas, levaduras, o de insecto, tanto el holoreceptor como su ectodominio son insolubles mayoritariamente y no pueden ser reconocidos por los autoanticuerpos, aún después de que han obtenido su conformación. No obstante, varios estudios han explorado la interacción de sueros de pacientes con EG, con TSH-R generado en bacterias, células de insecto, material expresado libre de células o como péptidos sintéticos, por inmunotransferencia, inmunoprecipitación, o ensayos inmunoenzimáticos, aunque estos procedimientos no evalúan la capacidad de este material para interactuar con autoanticuerpos funcionales. Sin embargo, se ha obtenido la secreción de una proteína con un carbohidrato complejo que neutraliza autoanticuerpos de pacientes con EG; los autores esperan que este material antigénicamente activo pueda ser de utilidad en estudios de diagnóstico, patogénesis e inmunoterapia de este padecimiento (27).

### Respuesta de células B

Se acepta que el sistema inmune se encuentra normalmente en un estado en donde no reacciona hacia antígenos propios, es decir en un estado de tolerancia inmune, el cual no es mantenido a nivel de las células B, mientras que en las células T existe un alto grado de tolerancia a los autoantígenos, como la Tg (28). Aunque existen múltiples mecanismos de control de la tolerancia a los

antígenos propios, los defectos en un solo sitio de regulación, como en los genes reguladores de la autoinmunidad, pueden ocasionar una enfermedad autoinmune. Asimismo, los autoanticuerpos pueden formarse cuando la tolerancia de las células T es soslayada por desafíos inmunológicos con antígenos extraños de reacción cruzada o cuando los antígenos propios se acoplan a un acarreador extraño, o bien cuando la tolerancia en las células T se rompe (29).

El conocimiento de los epítopes que reconocen los linfocitos B y que dan lugar a autoanticuerpos, puede ser de gran utilidad para el entendimiento de la respuesta autoinmune hacia la tiroides. Sin embargo, una de las limitantes para su estudio, son los cambios conformacionales que sufren las moléculas, y cuya estructura original parece ser necesaria para su interacción con los anticuerpos. Así, fragmentos de polipéptidos o péptidos sintéticos de la TPO han dado resultados variables (30). No obstante, se ha obtenido TPO con una conformación intacta y estable que ha permitido la clonación molecular y caracterización de una repertorio grande de autoanticuerpos anti-TPO, y que además evidencia la importancia de las células B que infiltran la tiroides como una fuente de autoanticuerpos anti-TPO, ya descrita previamente (31).

Los anticuerpos anti-Tg y anti-TPO ocurren en concentraciones elevadas en pacientes con TH y mixedema primario. Estos anticuerpos son menos comunes, pero todavía frecuentes en EG, mientras que anticuerpos anti-TPO, más que anti-Tg, son comunes (10%) en tiroiditis post-parto (32, 33). Ambos muestran una restricción parcial a las subclases IgG1 e IgG4 (14, 34). Los anticuerpos anti-Tg generalmente median citotoxicidad mediada por anticuerpos (ADCC), mientras que los anti-TPO forman complejos terminales con el complemento dentro de la glándula tiroidea (35). El daño mediado por células puede ser necesario para que los anti-TPO ganen acceso a su antígeno y se vuelvan patogénicos (36).

Los anticuerpos estimulantes de la tiroides (TSAc) se enlazan al TSH-R, activan la adenilato ciclasa, aumentan la proporción de síntesis y secreción de la hormona tiroidea, y la vascularidad, mimetizando los efectos de la TSH (37). Los

TSAc se encuentran en el 95% de los casos de EG. Estos anticuerpos se pensó que presentaban una restricción a la cadena kappa (38); sin embargo, se han reportado estudios que no favorecen este concepto (39). La subclase de estos anticuerpos parece estar restringida predominantemente a las subclases IgG1 e IgG4, y en menor proporción a IgG2, lo cual podría sugerir un defecto primario a nivel de la célula B en la EG (40, 41). Los TAc también se presentan en el 10 a 20% de pacientes con hipotiroidismo autoinmune (HA), pero sus efectos son enmascarados por los anticuerpos bloqueadores del TSH-R y procesos destructivos (24, 37, 42, 43).

La inmunidad humoral exagera el daño mediado por células de una manera secundaria, tanto por fijación directa del complemento (anticuerpos anti-TPO) como por ADCC (44, 45). El ataque del complemento iniciado por la vía clásica o alterna, incapacita la función metabólica de las células tiroideas y las induce a secretar interleucina (IL)-1, IL-6, metabolitos reactivos de oxígeno y prostaglandina, los cuales aumentan la respuesta autoinmune (35).

#### Autoanticuerpos

Los anticuerpos antitiroideos representan una herramienta importante en el diagnóstico de la patología tiroidea autoinmune. Los implicados en este tipo de enfermedades son: antiperoxidasa (anti-TPO), antitiroglobulina (anti-Tg), y anti-receptor de la TSH (anti-TSH-R) (37, 46). En la tiroiditis de Hashimoto, que es la patología tiroidea autoinmune de mayor prevalencia, el marcador más específico son los anti-TPO, encontrándose presentes en más del 90% de los casos (37, 47, 48). Estos autoanticuerpos están dirigidos contra la TPO mitocondrial de la glándula tiroidea (49). Los anticuerpos anti-TPO son citotóxicos, y por tanto, son responsables del daño directo a la glándula (50). En sujetos con TSH elevada se ha encontrado una fuerte asociación entre anti-TPO positivos y un volumen tiroideo aumentado (51). En el hipotiroidismo subclínico, se ha descrito la importancia de estos anticuerpos en la patogenia y progresión de la enfermedad, siendo su positividad uno de los criterios para iniciar terapia con

tiroxina. Un nivel elevado de anti-TPO confiere un riesgo de desarrollar hipotiroidismo, 18 veces mayor que el de la población normal (52). En la EG, los TSH-R son los marcadores específicos. Los anti-TPO se encuentran presentes en 74% de estos pacientes, y sus niveles descienden luego de tratamiento con drogas antitiroideas (48).

Las técnicas de laboratorio disponibles en la actualidad son más sensibles para detectar la presencia de estos anticuerpos, lo que probablemente ha influido en el aumento de la prevalencia de anti-TPO positivos descritos en diferentes publicaciones.

#### Anti-TPO

Los anticuerpos anti-TPO se encuentran en más del 90% de pacientes con HT (30). Junto con los anticuerpos anti-Tg son los anticuerpos predominantes en hipotiroidismo autoinmune. Los anti-TPO son principalmente de la clase IgG con IgG1 e IgG4 predominando (14, 53). Algunas personas sin enfermedad tiroidea presentan anti-TPO. Sin embargo, la presencia de anti-TPO puede aumentar el riesgo de futura enfermedad tiroidea. Si el individuo presenta una función tiroidea normal con anti-TPO, es recomendable examinarse periódicamente para evitar problemas tiroideos futuros. No obstante, se ha reportado que los anti-TPO de individuos normales no muestran la misma especificidad que la de pacientes con tiroiditis crónica (54).

Los anticuerpos anti-TPO han sido involucrados en el proceso destructivo tisular asociado con el hipotiroidismo observado en la TH y la atrófica. La aparición de anti-TPO generalmente precede el desarrollo de trastornos tiroideos. La presencia de anticuerpos citotóxicos antitiroideos circulantes no necesariamente implica destrucción progresiva de tejido, y se puede concluir que estos anticuerpos no son responsables del daño inicial a la glándula, aunque contribuyen a la destrucción de la tiroidea una vez que la estructura folicular normal ha sido alterada por otros mecanismos, como ADCC y/o células asesinas naturales (células NK) (40, 50, 55). Rebuffat y col. (50) demostraron por primera vez que anticuerpos anti-TPO humanos purificados de sueros de pacientes con

EAIT son capaces de destruir la glándula tiroidea por ADCC cuando se asocian con monocitos. El efecto biológico es disparado por los receptores FcγRI y FcγRII expresados sobre estas células.

#### Anti-Tg

La Tg juega un papel importante en el desarrollo de ETAI; esta proteína es el producto principal sintetizado en la glándula tiroidea, y los anticuerpos anti-Tg son comunes en la ETAI (56). Los anticuerpos anti-Tg se encuentran en aproximadamente el 55% de pacientes con HT y 25% de pacientes con EG (57). Sin embargo, autoanticuerpos similares se presentan en el suero de numerosos individuos normales sin evidencia de enfermedad tiroidea. No obstante, los anticuerpos de pacientes con ETAI reconocen epitopos de la Tg que no son identificados usualmente por los individuos normales (58). Existen evidencias indirectas del papel de estos autoanticuerpos en la etiología de la ETAI. Así, los anticuerpos anti-Tg se encuentran en casi todos los pacientes con ETAI, tanto en la EG como en la TH (59, 60); además, la inmunización de animales experimentales con Tg induce ETAI (61), y se sabe que esta característica está asociada al MHC, implicando que es necesaria una interacción entre la Tg y las glicoproteínas del MHC para que se produzca la enfermedad (62). Más aún, se conocen los epitopos específicos de la Tg que estimulan el desarrollo de ETAI (63).

#### TSAc

El autoantígeno principal en la EG y la tiroiditis atrófica es el TSH-R, localizado sobre la superficie basal de las células foliculares tiroideas (64). En la EG los TSACs se enlazan al TSH-R y estimulan a la célula tiroidea a producir cantidades excesivas de hormonas tiroideas dando lugar a hipertiroidismo. En pacientes con tiroiditis atrófica el anticuerpo principal es el anticuerpo bloqueador del TSH-R (TBAC). Cuando se enlaza al receptor bloquea el enlace de la TSH, previniendo la estimulación de la célula tiroidea. Esto resulta en una disminución en la producción de la hormona tiroidea, atrofia de la glándula tiroidea y el

estado clínico de hipotiroidismo (65). Es decir, desde el punto de vista funcional se pueden considerar dos tipos de anticuerpos que interactúan con el TSH-R: uno que estimula (TSAc) y otro que inhibe (TBAc) su actividad. Estos anticuerpos pueden estar presentes en el suero del mismo paciente y su efecto depende de cual predomine (66, 67).

Estudiando la conversión *in vitro* de los TSAcs, se encontró que era posible convertir el anticuerpo de tipo bloqueador en estimulante por medio de anticuerpos anti-IgG humana, indicando que los tipos bloqueadores y estimulantes se enlazan al mismo epitopo del receptor, y que el anticuerpo TAc puede actuar en ambas formas por la influencia de otros factores, como anticuerpos anti-idiotipo (68).

La producción exagerada de la AMPc estimula la función de las células tiroideas así como el crecimiento de la glándula. Este segundo mensajero regula de manera indirecta la expresión de los genes de la Tg y de la mieloperoxidasa. Como consecuencia del estímulo permanente de la AMPc se produce hiperplasia de las células tiroideas y sobreviene el hipertiroidismo (69). El mejor ejemplo de lo anterior lo encontramos en la EG, en donde los TSAcs ejercen una acción estimulante de la función tiroidea causando un crecimiento de la tiroides (70).

Los TSAcs son heterogéneos y pueden mimetizar la acción de la TSH y causar hipertiroidismo, como se observa en la enfermedad de Graves o alternativamente, antagonizar la acción de la TSH y causar hipotiroidismo. La última tiene lugar más notablemente en el neonato como resultado de la transferencia pasiva de anticuerpo de la madre con ETAI (24).

#### Otros anticuerpos

Otro autoantígeno importante es el simporter de Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> (NIS). Un 31% de los sueros de pacientes con EG y 15% de la TH contienen anticuerpos que inhiben *in vitro* la captación de iodo mediada por NIS (71-73). Los anticuerpos que inhiben la función de NIS pueden parcialmente contrarrestar el efecto del TAc de la tiroides en la enfermedad de Graves. Esto podría explicar la falta

de correlación entre el nivel de anticuerpos estimulante de la tiroides (o anticuerpos NIS) y la severidad clínica de hipertiroidismo en algunos pacientes con EG (74). Los anticuerpos contra el simporter pueden también contribuir al hipotiroidismo en la TH, al menos en las fases iniciales del padecimiento, antes que la extensa destrucción tisular tenga lugar (37, 71, 75, 76). Sin embargo, otros autores encuentran que en las ETAIs los anticuerpos capaces de modular la actividad de NIS son raros (77). A pesar de estos reportes, aún se discute sobre si NIS representa o no un autoantígeno tiroideo que induce la formación de autoanticuerpos funcionalmente relevantes. Como ya se mencionó, existen evidencias de que estos autoanticuerpos ocurren con baja frecuencia en un buen número de muestras de pacientes con ETAI, pero no existen demostraciones de actividad inhibidora de la captación específica de iodo. Aunque esta controversia todavía no se resuelve, NIS no parece ser un antígeno funcionalmente relevante en las ETAIs (78).

Se han asociado otros autoanticuerpos con las ETAI, algunos posiblemente significativos para entender la fisiopatología del padecimiento, como los autoanticuerpos a p53 que sugieren que, un aumento en el daño al ADN y apoptosis puede estar asociado con la ETAI (79). Asimismo, en la EG la elevada prevalencia de anticuerpos antinucleares, antimúsculo estriado, y antitejido conectivo pueden ser indicativos de una enfermedad de tipo colágena del músculo estriado, tejido conectivo y la tiroides (80).

#### Significado clínico

Los anti-TPO y/o los anti-Tg se presentan frecuentemente en el suero de pacientes con ETAI (81, 82). Sin embargo, ocasionalmente los pacientes con ETAI presentan pruebas con resultados negativos para autoanticuerpos tiroideos. Los TSAcs se presentan en la mayoría de los pacientes con una historia de, o que actualmente tienen EG (83). Durante el embarazo, la presencia de TSAcs es un factor de riesgo para el feto o el neonato que pueden presentar alteraciones funcionales como resultado del paso transplacentario del anticuerpo materno TAc (84). La prevalencia de autoanti-

cuerpos tiroideos aumenta cuando los pacientes tienen un padecimiento autoinmune no tiroideo, como diabetes de tipo I o anemia perniciosa (85). El envejecimiento se asocia con la aparición de autoanticuerpos tiroideos (86). El significado clínico de niveles bajos de autoanticuerpos tiroideos en sujetos eutiroideos se desconoce (87); sin embargo, estudios longitudinales sugieren que los anti-TPO pueden ser un factor de riesgo para futuras alteraciones tiroideas, incluyendo tiroiditis postparto, así como el desarrollo de complicaciones autoinmunes por tratamiento con un número de agentes terapéuticos (88-90). El uso de determinaciones de autoanticuerpos tiroideos no se recomienda para el monitoreo del tratamiento de las ETAIs, ya que el mismo está dirigido a las consecuencias del padecimiento (alteraciones tiroideas) y no hacia la causa del mismo (autoinmunidad) (91, 92).

### Respuesta de células T

Tanto las células T CD4+, como las CD8+ ocurren en el infiltrado linfocítico de la tiroides con un predominio de las células T CD4+. Se observa un aumento de células T activadas que expresan los marcadores del tipo HLA-DR. Una amplia selección de citocinas entre ellas la interleucina (IL)-2, interferón (IFN)- $\gamma$ , factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , IL-4, IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, y IL-15 son producidas por los linfocitos con alguna variación entre pacientes (93). Las células tiroideas expresan moléculas del MHC de clase II así como otras moléculas inmunológicamente importantes y se comportan como células presentadoras de antígeno (APC). La expresión por timocitos de la molécula de adhesión intercelular (ICAM)-1, antígeno asociado a la función leucocitaria (LFA)-3, y moléculas del MHC de clase I ó tirocitos, es incrementada por la IL-1, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (94). Esta respuesta es aumentada por la capacidad de los linfocitos T citotóxicos a mediar lisis. La destrucción de células tiroideas es mediada tanto por células que contienen perforina, que se acumulan en la tiroides, como por mecanismos dependientes de Fas (95, 96). Las citocinas y otras moléculas tóxicas, como el óxido nítrico y metabolitos reactivos de oxígeno probablemente

también contribuyen directamente al daño tisular mediado por células.

Las células T y B, dendríticas y monocito/macrófago acumulan en la tiroides y presumiblemente juegan un papel importante como APCs, capaces de proporcionar señales coestimuladoras. Es posible que el monocito quimioattractante 1 derivado de la célula tiroidea, producido después de la estimulación del TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , o IL-1, sea el responsable de la acumulación de monocitos, los cuales son una fuente importante de citocinas (97).

### Mecanismo de daño a la célula tiroidea

El término apoptosis fue introducido por primera vez en 1972 por Kerr, Wyllie y Currie (98); también se le conoce como muerte celular programada o suicidio celular, y es un proceso regulado cuidadosamente que juega un papel importante en el desarrollo normal, morfogénesis y función inmune (99). Este proceso activo de autodestrucción requiere de la activación de un programa genético que puede conducir a cambios en la morfología celular, fragmentación del ADN, y entrecruzamiento de proteínas (100, 101). La muerte celular es un factor relevante en la patogénesis de varios padecimientos, entre ellos los autoinmunes. La regulación de la apoptosis en células en fase de proliferación, puede ser la clave para poner en reversa la progresión natural de estas enfermedades. La apoptosis involucra la activación secuencial de una serie de caspasas, que son enzimas proteolíticas que degradan un número de substratos de muerte (100). La apoptosis está involucrada en la homeostasis de las células foliculares de la glándula tiroides, así como en los mecanismos de destrucción de las ETAIs.

Los trastornos autoinmunes de la tiroides se caracterizan por la estimulación o inhibición, o ambas, de autoanticuerpos (102, 103). En el hipotiroidismo autoinmune los anticuerpos y mecanismos mediados por células contribuyen al daño de la tiroides. En general, en la TH la expresión en el tejido tiroideo de receptores de muerte como CD95, denominado también Apo1 o Fas, y ligandos de receptores de muerte como CD95L y TRAIL, parece ser mucho mayor cuando se

compara con su contraparte normal. Asimismo, la expresión de efectores positivos de la apoptosis, como caspasa 3 y 8, además de Bax y Bak parecen ser relativamente elevados en muestras de tiroiditis comparada con la de controles normales (96, 104-107). Este patrón de expresión claramente apoya una apoptosis elevada como el mecanismo subyacente en la pérdida de tirocitos en la TH. En contraste, un patrón opuesto parece ser la norma en la EG; una característica sobresaliente es la expresión muy elevada de moduladores negativos de la apoptosis tales como cFLIP, Bcl-2, Bcl-XL, y la expresión casi normal de caspasas en los tirocitos. Opuestamente, en la TH la regulación de la expresión de Fas/FasL/Bcl-2 promueve la apoptosis, daño tisular y una reducción gradual en el número de tirocitos ocasionando el hipotiroidismo (107). Es interesante mencionar que, aunque en ambos casos se presenta una expresión significativa de Fas/CD95 y su ligando, solamente en la TH los tirocitos sufren apoptosis (106). Estudios posteriores sobre apoptosis en la ETAI señalan nuevos hallazgos sobre la destrucción autoinmune de la diana, indicando la participación de receptores de muerte y vías apoptóticas reguladas por citocinas en la patogénesis de la EAIT (106). En el caso de la TH, una enfermedad Th1 caracterizada por destrucción celular e hipotiroidismo, la citocina IFN- $\gamma$  parece jugar un papel crucial en la patología de la enfermedad al aumentar la expresión de caspasas y favorecer la sensibilización de células hacia la apoptosis mediada por Fas (96, 99, 107). Por el contrario, en la EG manifestada por una hiperplasia de la célula tiroide e hipertiroidismo, las citocinas Th2 que predominan, favorecen una respuesta humoral en lugar de la inmunidad celular, aumentando la producción de autoanticuerpos producidos por los linfocitos B. Los pacientes con EG producen títulos elevados de anticuerpos IgG específicos para el TSH-R (TSAc). Estos anticuerpos funcionan como TSH activando al receptor, ocasionando un incremento en su función, manifestada por una hiperplasia de la célula tiroide e hipertiroidismo. Los TSH pueden tener un papel antiapoptótico, protegiendo a la célula tiroidea de la apoptosis. Tanto la TSH como la IgG de pacientes con EG disminuyen la expresión de Fas en tirocitos normales (108, 109).

Además, en la EG mediada por Th2, las citocinas IL-4 e IL-10 aumentan intensamente la expresión de dos proteínas antiapoptosis Bcl-XL y cFLIP, las cuales proporcionan resistencia a la apoptosis mediada por Fas (110, 111). Esto comprueba nuevamente el papel modulador necesario que juegan las citocinas Th1 y Th2 en el desarrollo de las enfermedades autoinmunes (6). El balance de citocinas producidas durante las fases iniciales de la reacción autoinmune probablemente determina la progresión de una respuesta inofensiva hacia otra que ocasiona enfermedad autoinmune (6, 103, 105, 106, 112).

### Conclusiones

Las ETAIs son el resultado de interacciones complejas entre factores genéticos y ambientales. La enfermedad resulta cuando los linfocitos autorreactivos escapan a la tolerancia o ignorancia inmune. Tanto la respuesta humoral como la mediada por células contribuyen al daño tisular en el hipotiroidismo autoinmune. En la EG la producción de anticuerpos anti-TSAc conlleva a hipertiroidismo. El desarrollo en múltiples pasos de la enfermedad, sugiere que puede ser posible restaurar la tolerancia normal y tratar la EG inmunológicamente. Actualmente la intervención médica terapéutica en las ETAIs incluyen el uso de anticuerpos monoclonales para depletar selectivamente subgrupos de linfocitos T específicos y bloquear la interacción entre el receptor de la célula T y el MHC, por vacunación con autoantígenos alterados químicamente.

Además, la muerte celular es un factor importante en la patogenia de varias enfermedades, entre ellas las enfermedades autoinmunes, infecciones virales, cáncer, síndrome de inmunodeficiencia adquirida, y enfermedades neurodegenerativas. La regulación de la apoptosis en células en proliferación puede ser la clave para revertir la progresión natural de estos padecimientos.

**Correspondencia:** Dr. Librado Ortiz-Ortiz, correo electrónico: [orlizfl@hotmail.com](mailto:orlizfl@hotmail.com)

## Referencias

1. Canaris, J., Manowitz, N.R., Mayor, G.M., Ridgway, E.C. 2000. The Colorado thyroid disease prevalence studies. *Arch. Int. Med.* 160:526-534.
2. Tomer, Y., Huber, A. 2009. The etiology of autoimmune thyroid disease: a story of genes and environment. *J. Autoimmun.* 32:231-239.
3. Brand, O., Gough, S., Heward, J. 2005. HLA, CTLA-4 and PTPN22: the shared genetic master-key to autoimmunity? *Expert Rev. Mol. Med.* 7:1-15.
4. Miralles García, J.M. 2001. Tiroides. En, *Enfermedades del Sistema Endocrino y de la Nutrición*. J.M. Miralles García, A. de Leiva Hidalgo, eds. 1a. Ed. Salamanca: Ediciones Universidad de Salamanca. p. 59-96.
5. Weetman, A.P., McGregor, A.M. 1994. Autoimmune thyroid disease: further developments in our understanding. *Endocr. Rev.* 15:788-830.
6. Prasad, K.V., Prabhakar, B.S. 2003. Apoptosis and autoimmune disorders. *Autoimmunity* 36:323-330.
7. Pohlenz, J., Refetoff, S. 1999. Mutations in the sodium/iodide symporter (NIS) gene as a cause for iodide transport defects and congenital hypothyroidism. *Biochimie* 81:469-476.
8. Fujiwara, H., Tatsumi, K., Tanak, S., et al. 2000. A novel V59E missense mutation in the sodium iodide symporter gene in a family with iodide transport defects. *Thyroid* 10:471-474.
9. McLachlan, S.M., Rapoport, B. 1992. The molecular biology of thyroid peroxidase. Cloning, expression and role as autoantigen in autoimmune thyroid disease. *Endocrine Rev.* 13:192-206.
10. Henry, M., Malthiery, Y., Zanelli, E., Charvet, B. 1990. Epitope mapping of human thyroglobulin. Heterogeneous recognition by thyroid pathologic sera. *J. Immunol.* 145:3692-3698.
11. Van de Graaf, S.A., Ris-Stalpers, C., Pauws, E., et al. 2001. Up to date with human thyroglobulin. *J. Endocrinol.* 170:307-321.
12. Parmentier, M., Libert, F., Maenhaut, C., et al. 1989. Molecular cloning of the thyrotropin receptor. *Science* 246:1620-1622.
13. Smanik, P.A., Liu, Q., Furninger, T.L., et al. 1996. Cloning of the human sodium iodide symporter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226:339-345.
14. McIntosh, R.S., Asghar, M.S., Kemp, E.H., et al. 1997. Analysis of immunoglobulin G $\kappa$  antithyroid peroxidase antibodies from different tissues in Hashimoto's thyroiditis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82:3818-3825.
15. Weetman, A.P. 1990. Thyroid peroxidase as an antigen in autoimmune thyroiditis. *Clin. Exp. Immunol.* 80:1-3.
16. Van Herle, A.J., Vassart, G., Dumont, J.E. 1979. Control of thyroglobulin synthesis and secretion. *N. Engl. J. Med.* 301:239-249.
17. Kuo, S.-W., Huang, W.S., Hu, C.-A., et al. 1994. (Effect of thyroxin administration on serum thyrotrophic receptor antibody and thyroglobulin levels in patients with Graves' hyperthyroidism during antithyroid drug therapy. *Eur. J. Endocrinol.* 131:125-130.
18. Malthiery, Y., Lissitzky, S. 1987. Primary structure of human thyroglobulin deduced from the sequence of its 8848-base complementary DNA. *Eur. J. Biochem.* 105:491-498.
19. Canayanniotis, G., Rao, V.P. 1997. Searching for pathogenic epitopes in thyroglobulin: parameters and caveats. *Immunol. Today* 18:83-88.
20. Brown, T.R., Zhao, G., Palmer, K.C. 1997. Thyroid injury, autoantigen availability and the initiation of autoimmune thyroiditis. *Autoimmunity* 27:1-12.
21. Laurent, E., Mochel, J., Van Sande, J., et al. 1987. Dual activation by thyrotrophic of the phospholipase C and cAMP cascades in human thyroid. *Mol. Cell. Endocrinol.* 52:273-278.
22. Szkudlinski, M.W., Fremont, V., Ronin, C., Weintraub, B.D. 2002. Thyroid-stimulating hormone and thyroid-stimulating hormone receptor structure-function relationships. *Physiol. Rev.* 82:473-502.
23. Minich, W.B., Lenzner, C., Morgenthaler, N.G. 2004. Antibodies to TSH-receptor in thyroid autoimmune disease interact with monoclonal antibodies whose epitopes are broadly distributed on the receptor. *Clin. Exp. Immunol.* 136:129-136.
24. Rapoport, B., Chazenbalk, G.D., Jaume, J.C., McLachlan, S.M. 1998. The thyrotrophic (TSH)-releasing hormone receptor: Interaction with TSH and autoantibodies. *Endocr. Rev.* 19:673-716.
25. Buckland, P.R., Rickards, C.R., Howells, R.D., et al. 1982. Photo-affinity labelling of the thyrotropin receptor. *FEBS Lett.* 145:245-249.
26. Misrahi, M. et al. 1994. Processing of the precursors of the human thyroid-stimulating hormone receptor in various eukaryotic cells (human thyrocytes, transfected L cells and baculovirus-infected insect cells). *Eur. J. Biochem.* 222:711-719.
27. Chazenbalk, G.D., Jaume, J.C., McLachlan, S., Rapoport, B. 1997. Engineering the human thyrotrophic receptor ectodomain from a non-secreted form to a secreted, highly

- immunoreactive glycoprotein that neutralizes autoantibodies in Graves' patients' sera. *J. Biol. Chem.* 272:18959-18965.
28. Romball, C.G., Weigle, W.O. 1982. T and B cell reactivity in experimental autoimmune thyroiditis. *Life Sc.* 32:127-138.
29. Akkaraju, S., Canaan, K., Goodnow, C.C. 1997. Self-reactive e B cells are not eliminated or inactivated by auto antigen expressed on thyroid epithelial cells. *J. Exp. Med.* 186:2005-2012.
30. Rapoport, B., McLachlan, S.M. 2001. Thyroid autoimmunity. *J. Clin. Invest.* 108:1253-1259.
31. McLachlan, S.M., McGregor, A., Smith, B.R., Hall, R. 1979. Thyroid-autoantibody synthesis by Hashimoto thyroid lymphocytes. *Lancet* 1:162-163.
32. Smallridge, R.C. 1996. Postpartum thyroid dysfunction: A frequently undiagnosed endocrine disorder. *Endocrinologist* 6:44-50.
33. Lazarus, J.J. 1998. Prediction of postpartum thyroiditis. *Europ. J. Endocrinol.* 139:12-13.
34. McIntosh, R., Watson, P., Weetman, A. 1998. Somatic hypermutation in autoimmune thyroid disease. *Immunol. Rev.* 162:219-231.
35. Ajjan, R.A., Weetman, A.P. 1999. Pathogenesis of autoimmune thyroid disease. En, *Autoimmune Reactions*. S. Paul, Ed. Humana Press, New Jersey. pp. 31-59.
36. Nilsson, M., Husmark, J., Bjokman, U., Ericson, L.E. 1998. Cytokines and thyroid epithelial integrity: Interleukin-1  $\alpha$  induces dissociation of the junctional complex and paracellular leakage in filter-cultured human hydrolysates. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83:945-952.
37. Saravanan, P., Dayan, C.M. 2001. Thyroid autoantibodies. *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 30:315-335.
38. Knight, J.P., Laing, P. Knight, D., et al. 1986. Thyroid-stimulating autoantibodies usually contain only  $\lambda$ .light chains: evidence for the "forbidden clone" theory. *J. Clin. Endocrinol.* 62:342-347.
39. Williams, R.C., Marshall, N.J., Kilpatrick, K., et al. 1988. Kappa/Lambda immunoglobulin distribution in Graves' thyroid-stimulating antibodies. *J. Clin. Invest.* 82:1306-1312.
40. Weetman, A.P., Byfield, P.G., Black, C., Reimer, C.B. 1990. IgG heavy-chain subclass restriction of thyrotrophic-binding inhibitory immunoglobulin in Graves' disease. *Eur. J. Clin. Invest.* 20:406-10.
41. McLachlan, S.M. Feldt-Rasmussen, U., Young, E.T. et al. 1987. IgG subclass distribution of thyroid autoantibodies: a "fingerprint" of and individual's response to thyroglobulin in thyroid microsomal antigen. *Clin. Endocrinol.* 26:335-346.
42. Steel, N.R., Weightman, D.R., Taylor, J.J., Kendall-Taylor, P. 1984. Blocking activity to action of thyroid stimulating hormone in serum from patients with primary hypothyroidism. *Br. Med. J.* 288:1559.
43. Prabhakar, B.S., Fan, J.L., Seetharamaiah, G.S. 1997. Thyrotropin-receptor-mediated diseases: A paradigm for receptor autoimmunity. *Immunol. Today* 18:437-442.
44. Chiovato, L., Bassi, P., Santini, F. 1993. Antibodies producing complement-mediated thyroid cytotoxicity in patients with atrophic or goitrous autoimmune thyroiditis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 77:1700-1705.
45. Rodien, P., Madec, A.m., Ruf, J., et al. 1996. Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity in autoimmune thyroid disease: relationship to antithyropoxidase antibodies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81:2595-2600.
46. Rees Smith, B. 2001. Thyroid autoantibodies. *Scan J. Clin Lab. Invest.* 61 (suppl. 235):45-52.
47. Chardés, T., Chapal, N., Bresson, D., et al. 2002. The human anti-thyroid peroxidase autoantibody repertoire in Graves' and Hashimoto's autoimmune thyroid diseases. *Immunogenetics* 54:141-157.
48. Mariotti, S., Caturegli, P., Piccolo, P., et al. 1990. Antithyroid peroxidase autoantibodies in thyroid diseases. *J. Clin Endocrinol. Metab.* 71:661-669.
49. McLachlan, S.M, Rapoport, B. 2000. Autoimmune response to the thyroid in humans: Thyroid peroxidase - The common autoantigenic denominator. *Inter. Rev. Immunol.* 19:587-618.
50. Rebuffat, S.A., Nguyen, B., Roberto, B., et al. 2008. Antithyropoxidase antibody-dependent cytotoxicity in autoimmune thyroid disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 93:929-934.
51. Bülow Pedersen, I., Laurberg, P., Knudsen, N., et al. 2005. A population study of the association between thyroid autoantibodies in serum and abnormalities in thyroid function and structure. *Clin. Endocrinol (Oxf)* 62:713-720.
52. Cooper, D.S. 2001. Subclinical hypothyroidism. *N. Eng. J. Med.* 345:260-265.
53. Silva, L.M., Chavez, J, Canalli, M.H., Zanetti, C.R. 2003. Determination of IgG subclasses and avidity of antithyroid peroxidase antibodies in patients with subclinical hypothyroidism - a comparison with patients with overt hypothyroidism. *Horm. Res.* 59:118-124.
54. Kohno, Y., Yamaguchi, F., Saito, K., et al. 1991. Antithyroid peroxidase antibodies in sera from healthy subjects and from patients with chronic thyroiditis: differences in

- the ability to inhibit thyroid peroxidase activities. *Clin. Exp. Immunol.* 85:459-463.
55. Del Prete, G.F., Maggi, E., Mariotti, S. et al. 1986. Cytolytic T lymphocytes with natural killer activity in thyroid infiltrate of patients with Hashimoto's thyroiditis: analysis at clonal level. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 62:52-57.
56. Tomer, Y. 1997. Anti-thyroglobulin autoantibody in autoimmune thyroid diseases: cross-reactive or pathogenic? *Clin. Immunol. Immunopathol.* 82:3-11.
57. McGregor, A.M. 2001. B cell and autoantibodies in endocrine disease. En, *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism*. K.L. Becker, ed. 3rd Ed. Chap. 16. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. p. 1765,
58. Saboori, A.M., Rose, N.R., Yuhasz, S.C., et al. 1999. Peptides in human thyroglobulin reactive with sera of patients with autoimmune thyroid disease. *J. Immunol.* 163:6244-6250.
59. Roitt, I.M., Campbell, P.N., Doniach, D. 1958. The nature of thyroid autoantibodies present in patients with Hashimoto's thyroiditis (lymph adenoid goitre). *Biochem. J.* 69:248-254.
60. Ericsson, U.B., Christensen, S-B., Thorell, J. 1985. A high prevalence of thyroglobulin autoantibodies in adults with and without thyroid disease as measured with a sensitive solid-phase immunosorbent radio assay. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 37:154-162.
61. Weigle, W.O. 1965. The production of thyroiditis and antibody following injection of unaltered thyroglobulin without adjuvant in rabbits previously stimulated with altered thyroglobulin. *J. Exp. Med.* 122:1049-1062.
62. Kong, Y.M., David, C.S., Lomo, L.C., et al. 1997. Role of mouse and human class II transgenes in susceptibility to and protection against mouse autoimmune thyroiditis. *Immunogenetics* 46:312-317.
63. Wan, Q., Motte, R.W., McCormick, D.J., et al. Primary hormonogenic sites as conserved autoepitopes on thyroglobulin in murine autoimmune thyroiditis: role of MHC class II. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 85:187-194.
64. Macchia, E., Concetti, R., Borgoni, F., et al. 1989. Assay of TSH-receptor antibodies in 576 patients with various thyroid disorders: Their incidence, significance and clinical usefulness. *Autoimmunity* 3:103-112.
65. Minich, W.B., Lenzner, C., Morgenthaler, N.G. 2004. Antibodies to TSH-receptor in thyroid autoimmune disease interact with monoclonal antibodies whose epitopes are broadly distributed on the receptor. *Clin. Exp. Immunol.* 136:129-136.
66. Kasagi, K., Takeda, K., Goshi, K., et al. 1990. Presence of both stimulating and blocking types of TSH-receptor antibodies in sera from three patients with primary hypothyroidism. *Clin. Endocrinol.* 32:253-260.
67. Orgiazzi, J. 2000. Anti-TSH receptor antibodies in clinical practice. *Endocrinology & Metabolism Clinics of North America* 29:339-355.
68. Amino, N., Watanabe, Y., Tamaki, H., et al. 1987. In-vitro conversion of blocking type anti-TSH receptor antibody to the stimulating type by anti-human Ig antibodies. *Clin. Endocrinol.* 27:615-624.
69. Dremier, S., Coulonval, K., Perpete, S., et al. 2002. The role of cyclic AMP and its effect on protein kinase A in the mitogenic action of thyrotropin on the thyroid cell. *Ann. N. York Acad. Sci.* 968:106-121.
70. Smith, B.R., McLachlan, S.M., Furmaniak, J. 1988. Autoantibodies to the thyrotropin receptor. *Endocr. Rev.* 9:106-120. Kohn, L.D., Shimura, H., Shimura Y., et al. 1995. The thyrotropin receptor. *Vitam. Horm.* 50:287-384.
71. Endo, T., Kogai, T., Nakazato, M., et al. Autoantibody against Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter in the sera of patients with autoimmune thyroid disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 224:92-95.
72. Ajjan, R.A., Findlay, C., Metcalfe, R.A., et al. 1998. The modulation of the human sodium iodide symporter activity by Grave's disease sera. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 83:1217-1221.
73. Spitzweg, C., Heufelder, A.E. 1997. Update on the thyroid sodium iodide symporter: a novel thyroid antigen emerging on the horizon. *Eur. J. Endocrinol.* 137:22-23.
74. Noel R.R., Raphael, B., Burck, C.L. 2002. Iodine: an environmental trigger in thyroiditis. *Autoimmunity Rev.* 1:97-103.
75. Raspé, E., Costagliola, S., Ruf, J., et al. 1995. Identification of the thyroid Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> cotransporter as a potential autoantigen in thyroid autoimmune disease. *Eur. J. Endocrinol.* 132:399:405.
76. Takata, I. Susuki, Y., Saida, K., Sato, T. 1980. Human thyroid stimulating activity and thyroid state in antithyroid treatment of juvenile Graves' disease. *Acta Endocrinol. (Copenh)* 94:46-52.
77. Su-Chin, H., Hsu-Chin, D., Morgenthaler, N.G., et al. 2000. Rarity of anti-Na<sup>+</sup>/I<sup>-</sup> symporter (NIS) antibody with iodide uptake inhibiting activity in autoimmune thyroid diseases (AITD). *J Clin. Endocrinol. Metab.* 85:3937-3940.
78. Heufelder, A.E., Joba, W., Morgenthaler, N.G. 2001. Autoimmunity involving the human sodium/iodide symporter: fact or fiction? *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 109:35-40.

79. Fenton, C.L., Patel, A., Tuttle, R.M., Francis, G.L. 2000. Autoantibodies to p53 in sera of patients with autoimmune thyroid disease. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 30:179-183.
80. Kiljanski, J.I., Peele, K., Stachura, I., et al. 1997. Antibodies against striated muscle, connective tissue and nuclear antigens in patients with thyroid-associated ophthalmopathy: should Graves's disease be considered a collagen disorder? *J. Endocrinol. Invest.* 20:585-591.
81. Amino, N., Hagen, S.R., Yamada, N., Refetoff, S. 1976. Measurement of circulating thyroid microsomal antibodies by the tanned red cell hem agglutination technique: Its usefulness in the diagnosis of autoimmune thyroid diseases. *Clin. Endocrinol.* 5:115-125.
82. Ohtaki, S., Endo, Y., Horinouchi, K., et al. 1981. Circulating thymoglobulin-antithyroglobulin immune complex in thyroid diseases using enzyme-linked immunoassays. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 52:239-246.
83. Gupta, M.K. 1992. Thyrotropin receptor antibodies: Advances and importance of detection techniques in thyroid disease. *Clin. Biochem.* 25:193-199.
84. Abalovich, M., Amino, N., Barbour, L.A., et al. 2007. Management of thyroid dysfunction during pregnancy and postpartum: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 92:S1-47.
85. Maugendre, D., Guilhem, M.D., Karacatsanis, C., et al. 2000. Anti-TPO antibodies and screening of thyroid dysfunction in type I diabetic patients. *Ann. Endocrinol. (Paris)* 61:524-530.
86. Hollowell, J.G., Staehling, N.W., Flanders, D., et al. 2002. Serum TSH, T3, and thyroid antibodies in the United States population (1988 to 1994): National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES III). *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87:489-499.
87. Goudie, R.B., Anderson, J.R., Gray, K.G. 1959. Complement-fixing anti thyroid antibodies in hospital patients with asymptomatic thyroid lesions. *J. Pathol.* 77:389-400.
88. Chavan, A., Kumar, M., Prasad, D., et al. 2010. A study on anti-thyroid peroxidase, thyroxin, tri-iodothyronine and TSH in the subclinical hypothyroidism. *Int. J. Chem. Tech. Res.* 2:219-223.
89. Walsh, P.J., Bremner, A.P., Bulsara, M.K. 2008. Subclinical thyroid dysfunction as a risk factor for cardiovascular disease. *Arch. Intern. Med.* 165:2467-2472.
90. Schott, M., Scherbaum, W.A. 2006. Autoimmune thyroid disease. *Dtsch. Arztebl.* 103:A3023-3032.
91. Weetman, S.P. 1999. Autoimmunity and endocrinology. *Expl. Clin. Endocrinol. Diabetes* 107 (suppl):S63-66.
92. Ai, J., Leonhardt, J.M., Heymann, W.R. 2003. Autoimmune thyroid diseases: Etiology, pathogenesis, and dermatologic manifestation. *J. Am. Acad. Dermatol.* 48:641-659.
93. Weetman, A.P., Ajjan, R.A., Watson, P.F. 1997. Cytokines and Grave's disease. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 11:481-497.
94. Weetman, A.P., Freeman, M.A., Borysiewicz, L.K. 1990. Functional analysis of intercellular adhesion molecule -1 expressing human thyroid cells. *Eur. J. Immunol.* 20:271-275.
95. Wu, Z., Podak, E.R., McKenzie, J.M. 1994. Perforin expression by thyroid infiltrating T cells in autoimmune thyroid disease. *Clin. Exp. Immunol.* 98:470-477.
96. Giordano, C., Stassi, G., De Maria, R. 1997. Potential involvement of Fas and its ligand on the pathogenesis of Hashimoto's thyroiditis. *Science* 275:960-963.
97. Simons, P.J., Delemarre, F.G.A., Drexhage, H.A. 1998. Antigen-presenting dendritic cells as regulators of the growth of hydrolytes. A role of interleukin-1b and interleukin-6. *Endocrinology* 139:3148-3156.
98. Kerr, J.F., Wyllie, A.H., Currie, A.R. 1972. Apoptosis: a basic biologic phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer* 26:239-257.
99. Borgerson, K., Bretz, J., Baker, J.Jr. 1999. The role of Fas-mediated apoptosis in thyroid autoimmune disease. *Autoimmunity* 30:251-264.
100. Elmore, S. 2007. Apoptosis. A review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 35:495-516.
101. Zhang, J.A., Xu, M. 2000. DNA fragmentation in apoptosis. *Cell Res.* 10:205-211.
102. DeGroot, L.J., Quintans, J. 1989. The causes of autoimmune thyroid disease. *Endocr. Rev.* 10:537-562.
103. Lin, J.-D. 2001. The role of apoptosis in autoimmune thyroid disorders and thyroid cancer. *Brit. Med. J.* 322:1525-1527.
104. Stassi, Todaro, M., Buchiari, F., et al. 1999. Fas/FasL ligand-driven T cell apoptosis as a consequence of ineffective thyroid immunoprivilege in Hashimoto's thyroiditis. *J. Immunol.* 162:263-267.
105. Stassi, G., Di Liberto, D., Todaro, M., et al. 2000. Control of target cell survival in thyroid autoimmunity by T helper cytokines via regulation of apoptotic proteins. *Nature Immunol.* 1:483-488.
106. Stassi, G., De Maria, R. 2002. Autoimmune thyroid disease. New models of cell death in autoimmunity. *Nat. Rev. Immunol.* 2:195-204.
107. Giordano, C., Richiusa, P., Bagnasco, M., et al. 2001. Differential regulation of Fas-mediated apoptosis in both thymocyte and lymphocyte cellular compartments correla-

tes with opposite phenotypic manifestations of autoimmune thyroid disease. *Thyroid* 11:233-244.

108. Kawakami, A., Eguchi, K., Matsuoka, N., et al. 1997. Modulation of Fas-mediated apoptosis in human thyroid epithelial cells by IgG from patients with Graves' disease (GD) and idiopathic myxoedema. *Clin. Exp. Immunol.* 110:434-439.

109. Kawakami, A., Matsuoka, N. Tsuboi, M., et al. 2000. CD4+ T cell-mediated cytotoxicity toward thyrocytes: the importance of Fas/Fas ligand interaction inducing apoptosis of thyrocytes and the inhibitory effect of thyroid-stimula-

ting hormone. *Lab. Invest.* 80:471-484.

110. Nagayama, Y., Mizuguchi, H., Hayakawa, T., et al. 2003. Prevention of autoantibody-mediated Graves' like hyperthyroidism in mice with IL-4, a Th2 cytokine. *J. Immunol.* 170:3522-3527.

111. Wang, S.H., Baker, J.R.Jr. 2007. The role of apoptosis in thyroid autoimmunity, *Thyroid* 17:975-979.

112. Stafford, E.A., Rose, N.R. 2000. Newer insights into the pathogenesis of experimental autoimmune thyroiditis. *Int. Rev. Immunol.* 19:501-533.

## INTRUCCIONES PARA LOS AUTORES

1. La RMEP publica Trabajos Originales, Revisiones, Cartas al editor y Reporte de Casos Clínicos en Español o Inglés, que contribuyan al avance del conocimiento en biología humana o animal. Los manuscritos inéditos pueden ser enviados a través de dos vías: 1) vía correo ordinario, en triplicado (dos copias impresas y el archivo en formato Word grabado en un CD) a la sede de la Extensión Portuguesa de la Facultad de Medicina de la Universidad de Los Andes. Prolongación Av. El Limonero de la Urbanización Andrés Bello Blanco, Guanare, O  
2) VÍA CORREO ELECTRÓNICO: [rev.med.ext.portuguesa.ula@gmail.com](mailto:rev.med.ext.portuguesa.ula@gmail.com), en formato word (.doc). el manuscrito enviado vía online, debe prepararse en un solo archivo, que incluya el texto, gráficos, tablas y figuras

2. El ordenamiento general de los artículos debe ser el siguiente:

a. Título: Breve y preciso, concordante con la nomenclatura Internacional de las enfermedades (O.M.S.), con un máximo de 12-15 palabras. El título del artículo, los nombres de los autores y las direcciones de las instituciones donde se realizó el trabajo deben aparecer en la primera hoja. Asimismo, debe incluirse la dirección completa, número telefónico, número de fax y correo electrónico del autor responsable del manuscrito. Además, debe incluirse un título corto del artículo que no exceda 10 palabras.

b. En general los artículos deben contener: 1) Resumen en español: La segunda página debe contener un resumen estructurado, no mayor de 250 palabras, el cual debe contener el propósito de la investigación, procedimientos básicos y conclusiones principales. Además el Resumen en Inglés (Abstract): Debe ir precedido del título en inglés. El resumen en inglés debe tener el mismo contenido que el resumen en español. Al final del mismo deben colocarse palabras claves en inglés (key words), 2) Introducción: Corta pero precisa, 3) Material y Métodos, donde se describa claramente como se seleccionaron los sujetos de investigación, sus características, cómo y por qué se realizó el estudio en una manera particular. Cómo se colectaron los datos. Identificar los métodos, aparatos y procedimientos. En resumen, con información suficiente que permita reproducir el trabajo. En caso de que el trabajo fue realizado en humanos y animales, debe indicarse si recibió aprobación de la comisión de bioética de la institución. 4) - Resultados, presentarlos en una secuencia lógica en el texto, cuadro e ilustraciones, 5) Discusión, donde se discutan los resultados obtenidos en función de hallazgos relacionados reportados en la literatura y su relevancia, 6) Agradecimientos, en caso de que el trabajo recibió apoyo financiero, debe indicarse el código del mismo, 7) -Referencias. Las referencias bibliográficas deben citarse en el texto, entre paréntesis y en números arábigos sucesivos, por ejemplo: (1,2). Ejemplos para citar referencias:  
Revista: Acosta, G., Campos, R. 1983. Secretory IgA antibodies from bile of immunized rats reactive with trophozoites of *Entamoeba histolytica*. J. Exp. Med. 409,760-765.

Capítulo en Libro: Walsh, J. A. 1988. Prevalence of *Entamoeba histolytica* infection. En Amebiasis. Human infections by *Entamoeba histolytica*. J. I. Ravdin ed. Churchill Livingstone, London. 83-105.

Libro: Wallace, D.J., Dubois, E.L.O. 1998. Lupus Erythematosus. Lea & Febiger, Philadelphia. 46-77.

No deben ser incluidas en la lista de referencias las "observaciones no publicadas", "comunicación personal", ni "trabajos en prensa".

-Las ilustraciones deberán ser fotografiar sin montar, en papel brillante, y consecutivamente numeradas en el reverso con una etiqueta. La ampliación de las microfotografías debe indicarse. Se aceptaran fotografiar en color solamente si el autor cubre los costos de la impresión. Cada figura debe tener una leyenda y todas las leyendas deben imprimirse en orden numérico, a doble espacio en hoja aparte. Se requiere original y dos copias de las ilustraciones. En el texto se debe indicar la ubicación de las ilustraciones.

- Tablas: Las tablas deben ser numeradas consecutivamente con números arábigos, impresas individualmente en hoja aparte a doble espacio. Cada tabla debe tener un título breve y las aclaratorias, de ser necesarias, se incluirán en notas al pie de la misma. Las mediciones estadísticas deberán ser bien identificadas. En el texto se debe indicar la ubicación de las tablas.

Ningún trabajo publicado en la REVISTA MEDICA DE LA EXTENSION PORTUGUESA-ULA puede ser publicado en ninguna otra parte, total ni parcialmente, sin la debida autorización, por escrito, del editor. El autor, al enviar el trabajo, deja claramente entendido que el mismo es inédito, por lo cual exime de toda responsabilidad a la revista y a sus editores por los eventuales reclamos judiciales por Derecho de Autor (Copyright). Los trabajos publicados en la RMEP, son responsabilidad absoluta de los autores y no expresa opiniones de la revista.

### Sistema de Arbitraje

Todos los trabajos serán sometidos a la Revista, serán enviados a arbitraje, siempre y cuando cumpla con las normas editoriales mínimas. El arbitraje, para los Trabajos Originales, Revisiones y Reporte de Casos será realizado por al menos dos expertos en el área. Los árbitros tendrán un plazo de tiempo no mayor a tres meses para enviar su respuesta. Si las opiniones de dos de los árbitros coinciden, el Editorial podrá aceptar la respuesta de dos árbitros, en caso de discrepancia, se podrá consultar árbitros adicionales. Las opiniones de los árbitros, así como la autoría de los trabajos, son estrictamente confidenciales. Los autores recibirán las opiniones completas de los árbitros consultados. La Revista dará un plazo no mayor a dos meses a los autores, para responder a las opiniones de los árbitros y realizar las modificaciones sugeridas. Si éstos toman más tiempo del estipulado el trabajo será rechazado o considerado como nuevo.

Revista Médica de la Extensión Portuguesa - ULA  
ISSN: 2856-9781

Órgano oficial de la Universidad de Los Andes, Facultad de Medicina, Extensión Portuguesa  
Mérica - Venezuela

## INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

1. RMEP publishes Original Papers, Reviews, Letters to the Editor and Case Reports in Spanish or English, contributing in human or animal biology knowledge. Unpublished manuscripts can be sent throughout two ways: 1) by regular mail, in triplicate (two copies and a CD file in Word format), at the following address: Extensión Portuguesa de la Facultad de Medicina de la Universidad de Los Andes. Prolongación Av. El Limonero de la Urbanización Andrés Eloy Blanco, Guanare, or 2) by EMAIL: rev.med.ext.portuguesa.ula @ gmail.com., In Word format (. Doc). Manuscripts for online submission should be prepared as a SINGLE file containing the text, tables and figures

2. The general arrangement of the articles must be: a. The manuscript should contain a covering (title) page bearing the title of the paper (not exceeding 12-15 words); a short title; the name and postal address of the corresponding author, all together with the name of the institution where the work was done; and the email address of the corresponding author. Also, up to 10 keywords should be supplied.

b. Generally, papers should be divided into the following parts and in the order indicated: (1) Summary/abstract: not exceeding 250 words; in English and Spanish (2) Introduction: containing the reasons for doing the work; (3) Materials and Methods: sufficient information must be included to permit repetition of experimental work; Papers involving human subjects should receive local Ethical Committee approval and the informed consent of all subjects. Experiments involving animals should be conducted in accordance with the relevant local legislation (4) Results: these should be given concisely; (5) Discussion; (6) Acknowledgements (which must include details of financial support); (7) References , should be cited in the text in brackets and consecutive Arabic numerals, eg (1.2).

Examples of citing references:

Papers: Acosta, G., Campos, R. 1983. Secretary IgA Antibodies from reactive bile of immunize rats with trophozoies of *Entamoeba histolytica*. J. 409.760-765 Exp Med.

Chapter: Walsh, J. A. 1988. Prevalence of *Entamoeba histolytica* Infection. In Amebiasis. Human Infections by *Entamoeba histolytica*. J. I. Ravdin ed. Churchill Livingstone, London. 83-105.

Book: Wallace, D.J., Dubois, E.L.O. 1998. Lupus Erythematosus. Lea & Febiger, Philadelphia. 46-77.

Should not be included in the reference list of "unpublished observations", "personal communication" or "work in the press.", and 8) figure legends

The illustrations should be in photographs on glossy paper, and numbered consecutively on the back with a label. Color photographs will be accepted only if the author covers the printing cost. Tables: Tables should be numbered consecutively with Arabic numerals, printed individually on a separate sheet double spaced. Each table should have a brief title and the explanatory. Statistical measures must be clearly identified. The text should specify the location of the tables.

Papers published in REVISTA MEDICA DE LA EXTENSION OF PORTUGUESE-ULA can not be published elsewhere, without permission writing from the publisher. The author, when submitting the job, quite clearly understood that it is unpublished and therefore disclaims all liability to the journal and its editors for any legal claims by Copyright (Copyright). Papers published in RMEP, are the authors responsibility exclusive and do not show the Journal opinions.

## Arbitration

All manuscripts submitted for publication are considered by the Editorial Board if they should be sent to review if does not meet minimal editorial requirements. Original Research Articles, Reviews and Clinical

Case Reports will be reviewed by two experts in the area object of the communication. The reviewers will be given three months to send their evaluations. If the opinions of two of the reviewers coincide, the Editorial Board could accept these evaluations. In case of discrepancy, it could require additional reviewers.

Both the reviewer's evaluations and the manuscript authorship will remain strictly confidential. The authors will receive the complete reviewer's evaluations. The Editorial Committee will give the authors two months to respond to the reviewer's opinions and make the suggested modifications. If the authors take more time to answer than that fixed, the manuscript will be rejected or considered as a new submission.

Revista Medica de la Extension Portuguesa – ULA ISSN:  
2856-9781

Official organ of the Universidad de Los Andes, Facultad de  
Medicine, Extensión Portuguesa  
Mérica - Venezuela

Depósito Legal

PP200702ME3234

ISSN: 1856-9781

Impreso: Decanato de la Facultad de Medicina de la Extensión Portuguesa, 2010

Editorial Thays Gamboa de Gómez

1000 ejemplares

Formato online disponible en <http://www.saber.ula.ve/revistamedica> o [www.medic.ula.ve/idic](http://www.medic.ula.ve/idic)

# FACULTAD DE MEDICINA REVISTA MEDICA EXTENSIÓN DE LA EXTENSIÓN PORTUGUESA EXTENSIÓN PORTUGUESA-ULA

## CONTENIDO

Pág.

### Artículos Originales

- Papel de la asociación de Nef-VIH-1 con p22-phox  
Role of Nef-VIH-1 and p22-phox association  
Siham Salmen, Melisa Colmenares, Darrel L. Peterson, Lisbeth Berrueta. 1

### Revisiones

- Muerte celular programada: II. Papel en el desarrollo y función de las células linfoides del sistema inmune.  
Programmed cell death: II. Role in the development and function of lymphoid cells in the immune system  
Masyelly Rojas, Siham Salmen, Lisbeth Berrueta 6
- Enfermedad tiroidea autoinmune  
Autoimmune thyroide disease  
Librado Ortiz-Ortiz 17