

Niveles glutatión reducido y estado redox celular en pacientes pediátricos con inmunodeficiencias

Reduced glutathione levels and cellular redox status in pediatric patients with immunodeficiencies

Gretel Riverón Forment^{1*} <https://orcid.org/0000-0001-6332-7113>

Yaíma Zúñiga Rosales¹ <https://orcid.org/0000-0001-9483-9971>

Bárbara Torres Rives¹ <https://orcid.org/0000-0001-9729-5172>

Jacqueline Pérez Rodríguez¹ <https://orcid.org/0000-0001-8291-0822>

Lilia Marín Padrón¹ <https://orcid.org/0000-0001-9819-4648>

Ivette Camayd Viera¹ <http://orcid.org/0000-0002-6847-3686>

¹Centro Nacional de Genética Médica. La Habana, Cuba.

*Autor para la correspondencia: gretel.riveron@infomed.sld.cu

RESUMEN

Introducción: Las alteraciones en el estado redox celular se han descrito como factores causales en diversas enfermedades. La depleción del glutatión reducido se ha asociado fundamentalmente a enfermedades neurodegenerativas, pulmonares, hepáticas, cardiovasculares e inmunológicas.

Objetivo: Determinar las concentraciones de glutatión reducido y el estado redox celular en pacientes pediátricos con inmunodeficiencias.

Métodos: Se estudiaron 21 pacientes con inmunodeficiencias procedentes de la consulta de Inmunogenética, en edades comprendidas entre 1 y 8 años, de ambos sexos, y 8 niños en el mismo rango de edad de los pacientes, como grupo control, con estudios de inmunidad humoral y celular normales. Los pacientes con diagnóstico de inmunodeficiencia se dividieron para su estudio en 2 grupos según el componente afectado de la respuesta inmune: humoral y celular. Fueron determinadas las concentraciones intraeritrocitarias de glutatión reducido y oxidado, mediante un método de HPLC-UV. Para evaluar el estado redox celular se calculó la relación entre las formas reducidas y oxidadas del glutatión (GSH/GSSG).

Resultados: Las concentraciones de glutatión reducido y el estado redox celular se encontraron disminuidos en ambos grupos de pacientes en relación con los niños sin inmunodeficiencia ($p=0,031$ y $p=0,03$; respectivamente). El glutatión oxidado no mostró diferencias entre los grupos.

Conclusiones: En los pacientes con inmunodeficiencia se evidenció la afectación del estado redox celular como consecuencia de la disminución del glutatión reducido. Este primer acercamiento ofreció las potencialidades del empleo de estos biomarcadores en la evaluación integral de pacientes con inmunodeficiencia.

Palabras clave: inmunodeficiencia; pacientes pediátricos; glutatión reducido; estado redox; GSH/GSSG; HPLC.

ABSTRACT

Introduction: Alterations in the cellular redox state have been described as causal factors in various diseases. Reduced glutathione depletion has been fundamentally associated with neurodegenerative, pulmonary, liver, cardiovascular and immunological diseases.

Objective: To determine the concentrations of reduced glutathione and the cellular redox status in pediatric patients with immunodeficiencies.

Methods: We studied 21 patients with immunodeficiencies from the immunogenetic service, aged between 1 and 8 years and as a control group, 8 children in the same age range as the patients, with normal humoral and cellular immunity studies. Patients diagnosed with immunodeficiency were divided into two groups according to the affected component of the immune response: humoral and cellular. The intraerythrocyte concentrations of oxidized and reduced glutathione were determined by means of an HPLC-UV method. To evaluate the cellular redox state, the relationship between the reduced and oxidized forms of glutathione (GSH/GSSG) was calculated.

Results: Reduced glutathione concentrations and cellular redox status were found to be decreased in both groups of patients in relation to children without immunodeficiency ($p=0,031$ and $p=0,03$; respectively). Oxidized glutathione showed no difference between the groups.

Conclusions: In patients with immunodeficiency, the cellular redox state is affected as a consequence of the decrease in reduced glutathione. This first approach offers the potential for the use of these biomarkers in the comprehensive evaluation of patients with immunodeficiency.

Keywords: immunodeficiency; pediatric patient; reduced glutathione; redox status; GSH/GSSG; HPLC.

Recibido: 19/10/2021

Aceptado: 06/01/2022

Introducción

Las inmunodeficiencias son un grupo de trastornos que se caracterizan por un déficit cuantitativo o cualitativo en uno o más componentes del sistema inmunitario. En estas enfermedades se afecta la capacidad de defensa del organismo, que se manifiesta en la aparición de infecciones recurrentes. Las causas pueden estar presentes desde el nacimiento, que se identifican como inmunodeficiencias primarias o desarrollarse con el paso de los años a otra afección o condición, denominada inmunodeficiencias secundarias.

Según datos reportados en el Registro cubano de inmunodeficiencias primarias, las inmunodeficiencias de anticuerpos son las más frecuentes y dentro de ellas predomina la deficiencia selectiva de Inmunoglobulina A (IgA). Le siguen en frecuencia las inmunodeficiencias combinadas, las asociadas a defectos del fagocito, las deficiencias del complemento y en menor proporción otros síndromes bien definidos.^(1,2)

El glutatión reducido (GSH) es un tripéptido presente a nivel intracelular y sus concentraciones deben ser adecuadas para un correcto funcionamiento de los procesos que son controlados por el ambiente redox celular; tales como, la proliferación celular, la diferenciación o la apoptosis. Dadas sus funciones vitales como antioxidante y como regulador del ambiente redox celular, se describe que las alteraciones en la homeostasis de GSH pueden estar implicadas en la etiología y/o progresión de una serie de enfermedades humanas.⁽³⁾

En el caso particular del sistema inmunológico, se describe que el GSH participa en la proliferación y diferenciación de los linfocitos T, en la actividad fagocítica de los polimorfonucleares, en la función de las células dendríticas y de las células asesinas naturales (del inglés, *NK*). Por otra parte, estudios realizados indican que las fluctuaciones en las concentraciones intracelulares de GSH a nivel de los linfocitos, tienen efectos sobre eventos como la iniciación y la progresión de la activación linfocitaria, la diferenciación y la citotoxicidad mediada por estas células, evidencias que apuntan a la importancia de este tripéptido para mantener una función adecuada de las células T. Teniendo en cuenta las evidencias anteriormente descritas, los niveles de GSH deben ser adecuados para un óptimo funcionamiento del sistema inmune. En este sentido, son varios los reportes en la literatura que relacionan las alteraciones de la homeostasis del GSH con la aparición y progresión de estados inflamatorios y autoinmunes.^(4,5)

Sin embargo, existe escasa información disponible sobre las concentraciones intracelulares de GSH y de su forma oxidada, el glutatión oxidado (GSSG), así como del estado redox celular en los pacientes pediátricos con inmunodeficiencias. De ahí, que el objetivo del presente estudio fue determinar las concentraciones de glutatión reducido y el estado redox celular en pacientes pediátricos con inmunodeficiencias.

Métodos

Se realizó un estudio observacional, analítico, de casos y controles, que incluyó 21 pacientes con diagnóstico clínico e inmunológico de inmunodeficiencias, en edades comprendidas entre 1 y 8 años (11 niños y 10 niñas) y 8 niños aparentemente sanos de ambos sexos (5 niños y 3 niñas), como controles, en el mismo rango de edades de los pacientes (1 a 9 años).

Los pacientes con diagnóstico clínico de inmunodeficiencia se dividieron para su estudio en 2 grupos, según el componente afectado de la respuesta inmune (humoral o celular), atendiendo a los resultados de los estudios inmunológicos realizados. De ellos, 10 niños tenían inmunodeficiencia humoral y 11 niños inmunodeficiencia celular. El estudio se llevó a cabo antes de comenzar cualquier tipo de tratamiento inmunomodulador con estos pacientes.

Para la selección del grupo control, se comprobó previamente el estado de salud mediante anamnesis, examen físico y pruebas de laboratorio clínico (pruebas de función hepática, glicemia, creatinina, lipidograma, hemoglobina y leucograma). Además, se tuvo en cuenta que estos niños tuvieran estudios de inmunidad humoral y celular normales.

En ambos grupos se precisó que no estuvieran utilizando suplementos vitamínicos o antioxidantes en el momento del estudio.

Todos los participantes fueron remitidos desde la consulta de Inmunogenética del Centro Nacional de Genética Médica (CNGM), en el periodo comprendido de julio de 2017 a mayo de 2018, para la realización de los estudios en el Laboratorio de Genética Bioquímica del CNGM.

En este estudio se utilizó como muestra biológica sangre venosa. La extracción se realizó en el laboratorio clínico del referido centro asistencial, en condiciones de ayuna de 12 h.

Para las determinaciones de las concentraciones de GSH y GSSG, se extrajeron 5 mL de sangre en un tubo con ácido etilendiaminotetraacético dipotásico (EDTA-K₂) como anticoagulante. Para la obtención del hemolisado; una vez separado el plasma, los eritrocitos fueron lavados 3 veces con solución fría de cloruro de sodio (NaCl) al 0,9 % y se provocó la lisis celular con agua destilada fría (1:4).

Las concentraciones intraeritrocitarias de GSH y GSSG fueron medidas simultáneamente empleando un método isocrático en fase reversa de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC-UV) con detección ultravioleta a 215 nm.⁽⁶⁾ Para la separación cromatográfica de los compuestos se utilizó columna de fase reversa LiChrospher® RP-18 (5 µm, 125 x 4 mm) y una pre-columna 4x4 mm (LiChroCART®), se trabajó a un flujo de 1 mL/min y a 30°C de temperatura. La fase móvil consistió en agua/acetonitrilo (96/4, v/v), ácido trifluoracético (TFA) al 0,1 % y 12 mg/mL de perclorato de sodio. El volumen de inyección fue de 20 µL de la muestra desproteinizada. El tiempo de corrida fue de 5,5 min. Los tiempos de retención fueron de 2,2 min y de 3,4 min para el GSH y el GSSG, respectivamente. El programa LabSolution (Shimadzu, Japón) fue utilizado para la adquisición y procesamiento de los datos cromatográficos. Las concentraciones del GSH y el GSSG se estimaron mediante curvas de calibración en el rango de concentraciones de 62,5 a 1000 µM para el GSH y de 25 a 1000 µM para el GSSG. Posteriormente a partir de los niveles de estos compuestos se calculó la relación GSH/GSSG como marcador del estado redox celular.

Todos estos procedimientos se llevaron a cabo dentro de las dos horas posteriores a la extracción. Los resultados se expresaron como medias +/- desviación estándar. Se compararon las medias aritméticas de cada una de las variables de respuesta para los grupos (pacientes y controles), mediante la prueba Kruskal-Wallis para muestras independientes. Como criterio de significación se tomó el valor de $p < 0,05$. Para el análisis estadístico nos servimos del programa SPSS versión 13.0 para Windows.

Todos los participantes fueron incluidos en el estudio luego de que sus representantes legales o tutores emitieran voluntariamente su consentimiento, siguiendo los principios éticos de la Declaración de Helsinki de 1975, modificada en el 2013. El protocolo de la investigación fue sometido a la aprobación del Comité de ética de las investigaciones del CNGM.

Resultados

A continuación, se relacionan los marcadores estudiados en los diferentes grupos de pacientes y controles. La edad promedio de los niños incluidos en el estudio fue de 3 años (Tabla 1).

Tabla 1 - Resultados de los marcadores estudiados en pacientes pediátricos con inmunodeficiencias y el grupo control

Marcadores	Pacientes con inmunodeficiencia		Grupo control (n=8)	p††
	Humoral(n=10)	Celular(n=11)		
Edad(años)*	3 (1 - 8)	2 (1 - 5)	3 (1 - 9)	0,720
GSH (μM) †	786,9 ± 510,9	845, 8 ± 682,8	1539,1 ± 339,3	0,030
GSSG (μM) †	237,8 ± 257,5	252,5 ± 175,2	116,2 ± 36,0	0,127
Relación GSH/GSSG†	7,2 ± 5,2	5,9 ± 6,5	14,1 ± 3,4	0,010

*Edad promedio (rango). † GSH, GSSG y la relación GSH/GSSG se expresan como media ± desviación estándar. ††Prueba de comparación Kruskal-Wallis

Las concentraciones intraeritrocitarias de GSH estaban disminuidas significativamente en ambos grupos de pacientes con inmunodeficiencias con respecto al grupo control (p=0,030) (Fig. 1). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en los niveles de GSSG entre los grupos (Tabla 1).

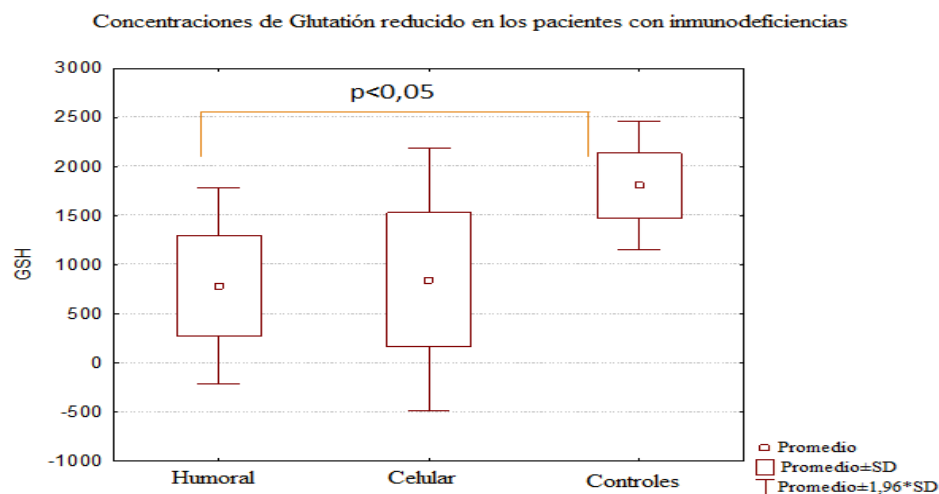


Fig. 1 – Niveles de glutatión reducido (GSH) en el grupo de pacientes pediátricos con inmunodeficiencias.

En relación con el estado redox celular, determinado por el cociente GSH/GSSG se obtuvo que no difiere entre los pacientes, pero en comparación con el grupo control se encontró disminuido significativamente (Fig.2).

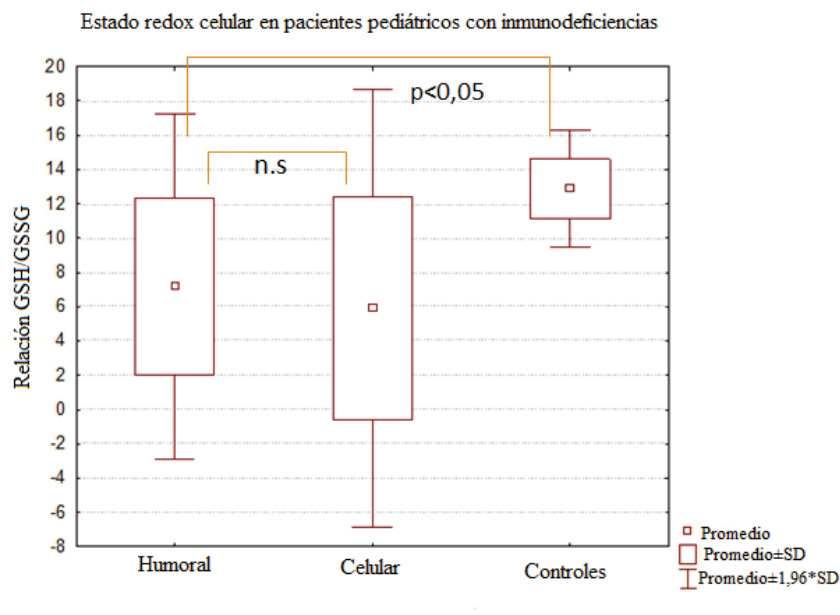


Fig. 2 – Estado redox celular (GSH/GSSG) en pacientes pediátricos con inmunodeficiencias.

Discusión

El glutatión reducido participa en múltiples funciones en las células, entre las más reconocidas está su papel en la detoxificación de compuestos oxidados, actuando como un potente antioxidante, en el mantenimiento del estado redox celular y en reacciones bioquímicas de importancia para un adecuado funcionamiento a nivel celular. De ahí que, las alteraciones en la homeostasis del GSH pueden influir en el curso de diversos procesos patológicos.^(3,5,7)

Los resultados derivados de la presente investigación indican que los pacientes con inmunodeficiencias, tanto humoral como celular, presentan bajas concentraciones intraeritrocitarias de GSH. Esta disminución en los niveles de GSH observada podría estar asociarse a dos eventos; primero a un incremento de la utilización de este compuesto para contrarrestar el aumento de procesos oxidativos y por otra parte, este déficit podría estar relacionado a una disminución en la síntesis del GSH, ya sea por deficiencias en el suplemento de sus aminoácidos precursores o por disminución en la actividad de las enzimas que participan en su síntesis.

Se ha descrito que, en los procesos patológicos pueden disminuir la captación o síntesis celular de la cisteína (Cys) y aumentar la salida de GSH debido a su oxidación acelerada.⁽⁸⁾ Sin embargo, en la investigación que nos ocupa no hay un aumento de las concentraciones de GSSG, por lo que podría plantearse que el suministro de las Cys podría ser el factor limitante en la reposición

de los niveles de GSH. Estudios realizados describen la importancia de los aminoácidos sulfurados, como la metionina y la Cys en la inmunorregulación debido a que su metabolismo está marcadamente alterado en respuesta a las infecciones. En el caso particular de la Cys, su disponibilidad es crítica para la función de las células T. La deficiencia de la Cys a nivel extracelular o del GSH intracelular, puede disminuir el número de células CD4, reduce la producción de interferón gamma (IFN γ), afecta la proliferación de los linfocitos T en respuesta a mitógenos y disminuye la actividad citotóxica de las células T.^(9,10)

Además, se obtuvo que los pacientes estudiados mostraban una disminución en relación entre el GSH/GSSG, lo que se indicativo de afectaciones en el estado redox intracelular. Cuando los valores de este cociente tienden hacia un estado mayoritariamente oxidativo se pueden activar cascadas de señalización que pueden reducir la proliferación celular e incrementar los procesos de apoptosis;⁽¹¹⁾ lo que podría repercutir en el funcionamiento adecuado del sistema inmune en estos pacientes.

Actualmente, no hay estudios disponibles sobre los niveles de GSH y el estado redox en pacientes pediátricos con inmunodeficiencias primarias. La mayoría de los estudios se han realizado en pacientes con inmunodeficiencia adquirida debido a la infección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH/SIDA). En estos pacientes se ha demostrado que el nivel de GSH disminuye a medida que avanza la enfermedad y que en pacientes con la enfermedad avanzada, los bajos niveles de GSH son predictivos de una menor supervivencia y una función deficiente de las células T.⁽¹²⁾

Teniendo en cuenta lo anterior, los hallazgos derivados de este estudio podrían ser el soporte teórico para investigaciones posteriores, en los que puedan ser evaluados un mayor número de pacientes y realizar la cuantificación de las concentraciones de los aminoácidos precursores del GSH, aspectos que no fueron incluidos en el presente trabajo y que constituyen limitaciones.

Los resultados de la presente investigación muestran que los pacientes pediátricos con inmunodeficiencias presentan bajos niveles intraeritrocitarios de GSH, con la consiguiente afectación del estado redox celular. En nuestro conocimiento este sería el primer acercamiento a la temática en Cuba y su principal aporte consiste en la potencialidad de estos biomarcadores para ser utilizados en la evaluación integral de los pacientes con inmunodeficiencia.

Referencias Bibliográficas

1. Alonso A, Candelaria B, Valdés L. Inmunodeficiencias primarias: un reto para la inmunogenética. Rev Cuba Reumatol. 2020 [acceso 23/12/2021];22(2): e828. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1817-59962020000200009&lng=es
2. Macías-Abraham C. Registro cubano de inmunodeficiencias primarias. Rev Cubana HematolInmunolHemoter. 2017 [acceso 23/07/2021];33(S1): Disponible en: <http://www.revhematologia.sld.cu/index.php/hih/article/view/791>
3. Ballatori N, Krance SM, Notenboom S, Shi S, Tieu K, Hammond CL. Glutathione dysregulation and the etiology and progression of human diseases. Biol Chem. 2009;390(3):191-214. DOI: <https://10.1515/BC.2009.033>
4. Dröge W, Breitkreutz R. Glutathione and immune function. Proc Nutr Soc. 2000; 59(4):595-600. DOI: <https://10.1017/s0029665100000847>
5. Gostner JM, Becker K, Fuchs D, Sucher R. Redox regulation of the immune response. Redox Report. 2013;18(3):88-94. DOI: <https://10.1179/1351000213Y.0000000044>
6. Simona LD, Cacho C, Leva P, Barrero J, Aguar P. Development of a HPLC-UV method for simultaneous determination of intracellular glutathione species in human cells. J Anal Bioanal Tech. 2015;6(4):259.
7. Polonikov A. Endogenous Deficiency of Glutathione as the Most Likely Cause of Serious Manifestations and Death in COVID-19 Patients. ACS Infectious Diseases. 2020;6(7):1558-1562. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsinfectdis.0c00288>
8. Ghezzi P, Lemley KV, Andrus JP, De Rosa SC, Holmgren A, Jones DP, Jahoor F, *et al.* Cysteine/Glutathione Deficiency: A Significant and Treatable Corollary of Disease. In: Frye R., Berk M. (eds). The Therapeutic Use of N-Acetylcysteine (NAC) in Medicine. Singapore: Adis; 2019. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-10-5311-5_20
9. Tomé D. Amino acid metabolism and signalling pathways potential target in the control of infection and immunity. Eur J Clin Nutr 2021;75:1319-27. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41430-021-00943-0>
10. Peng L, Yu-Long Y, Defa L, Sung WK, Guogao W. Amino acids and immune function. Br J Nutr 2007;98(2):237-52. DOI: <https://doi.org/10.1017/S000711450769936X>
11. Alkazemi D, Rahman A, Habra B. Alterations in glutathione redox homeostasis among adolescents with obesity and anemia. Sci Rep 2021;11,3034. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82579-5>

12. Kesarwani P, Murali AK, Al-Khami AA, Mehrotra S. Redox regulation of T-cell function: from molecular mechanisms to significance in human health and disease. *Antioxid Redox Signal*. 2013;18(12):1497-1534. DOI: <https://10.1089/ars.2011.40>

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

Contribuciones de los autores

Conceptualización: Gretel Riverón Forment.

Curación de datos: Gretel Riverón Forment.

Análisis formal: Gretel Riverón Forment.

Investigación: Gretel Riverón Forment, Yaíma Zúñiga Rosales, Bárbara Torres Rives, Jacqueline Pérez Rodríguez, Lilia Marín Padrón, Ivette Camayd Viera.

Metodología: Gretel Riverón Forment, Yaíma Zúñiga Rosales, Bárbara Torres Rives, Jacqueline Pérez Rodríguez, Lilia Marín Padrón, Ivette Camayd Viera.

Administración del proyecto: Gretel Riverón Forment.

Recursos: Yaíma Zúñiga Rosales, Bárbara Torres Rives,

Supervisión: Gretel Riverón Forment.

Validación: Gretel Riverón Forment.

Visualización: Gretel Riverón Forment.

Redacción del borrador original: Gretel Riverón Forment, Yaíma Zúñiga Rosales.

Redacción revisión y edición: Yaíma Zúñiga Rosales, Bárbara Torres Rives, Jacqueline Pérez Rodríguez, Lilia Marín Padrón, Ivette Camayd Viera.