

00346

3

Jy



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**EFFECTO DEL FACTOR TIMICO HUMORAL
SOBRE DISTINTAS SUBPOBLACIONES
DE LINFOCITOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
**MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)
P R E S E N T A
ANA MARIA ESPINOSA GARCIA**

DIRECTOR DE LA TESIS: DR. JORGE A. REYES ESPARZA
CO-TUTOR: DRA. MARTA ROMANO PARDO

México, D. F.

1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

259997



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACION
DISCONTINUA

PAGINACIÓN
DISCONTINUA

Este trabajo se realizo en el Instituto Nacional de Cancerología, en
la división de Investigación basica..

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Jorge Reyes Esparza. Director de esta tesis.

Así como a los Doctores que formaron parte del jurado.

Dr. Guillermo Alfaro Martínez

Dr. Edgar Zenteno Galindo

Dr. Ricardo Lascurian Ledezma

Dr. Alejandro Zentella Dehaba

Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete

Y en especial a la Dra. Marta Romano Pardo, quien además fungio como co-asesor de este trabajo

Gracias a todos por los comentarios finales al manuscrito.

DEDICATORIA:

A Yariela
con todo mi amor
por ser una luz en mi camino

INDICE

| | página |
|--|--------|
| Resumen | I |
| I.- Introducción | |
| 1.1.- Generalidades..... | 1 |
| 1.2.- El timo..... | 3 |
| 1.2.1.- Histología..... | 5 |
| 1.3.- Los receptores | 6 |
| 1.3.1.- El TCR | 6 |
| 1.3.2.- Los correceptores CD4 y CD8..... | 9 |
| 1.4.- Progenitores linfoides tímicos (TLPs)..... | 10 |
| 1.4.1.- Etapas de diferenciación tímica temprana..... | 12 |
| 1.5.- Desarrollo de las células T | 15 |
| 1.6.- Modulación de la maduración de los linfocitos T, por citocinas, factores tímicos y hormonas | 17 |
| 1.7.- Proceso de Selección..... | 18 |
| 1.8.- El péptido del CPH de la célula reticular | 24 |
| 1.9.- Salida de células T del timo..... | 25 |
| 1.10.- Los linfocitos T | 26 |
| 2.- Antecedentes | |
| 2.1.- Función endócrina del timo..... | 28 |
| 2.2.- Hormonas tímicas..... | 30 |
| 2.3.- El factor tímico humoral | 32 |
| 2.4.- Efecto biológico del THF- γ 2..... | 32 |
| 3.- Objetivos | 36 |

4.- Materiales y métodos.

| | |
|--|----|
| 4.1.- Reactivos..... | 37 |
| 4.2.- Péptidos..... | 37 |
| 4.3.- Animales..... | 38 |
| 4.4.- Métodos..... | 38 |
| 4.4.1.- Obtención de timocitos | 38 |
| 4.4.2.- Caracterización de la expresión de los antígenos CD4 y CD8 mediante citometría de flujo | 38 |
| 4.4.3.- Análisis del contenido de DNA y de ciclo celular mediante citometría de flujo..... | 39 |
| 4.4.4.- Análisis de apoptosis por citometría de flujo..... | 40 |
| 4.4.5.- Cultivo de timocitos..... | 41 |
| 4.4.6.- Ensayo de proliferación celular..... | 42 |
| 4.4.7.- Tratamiento con fitohemaglutinina (PHA) | 43 |
| 4.4.8.- Tratamiento con concanavalina A (Con-A)..... | 43 |
| 4.4.9.- Estimulación con THF- γ 2 | 43 |
| 4.4.10.- Estimulación con Con-A y THF- γ 2..... | 44 |
| 4.4.11.- Estimulación con Con-A y PA..... | 44 |
| 4.4.12.- Análisis estadístico..... | 44 |

5.- RESULTADOS

| | |
|--|----|
| 5.1.- Caracterización de la población de timocitos de rata recién nacida..... | 45 |
| 5.2.- Cultivo de timocitos..... | 46 |
| 5.3.- Efecto <i>in vitro</i> del THF- γ 2 sobre el fenotipo de los timocitos de rata..... | 48 |
| 5.4.- Efecto, <i>in vitro</i> , del THF- γ 2 sobre el fenotipo de los timocito de rata coestimuladas con un agente mitógeno..... | 50 |
| 5.4.1.- PHA..... | 51 |
| 5.4.2.- Con-A..... | 52 |

| | |
|---|-----------|
| 5.5.- Efecto de la Con-A sobre el fenotipo de los timocitos de rata recién nacida..... | 53 |
| 5.6.- Efecto del THF- γ 2 sobre el fenotipo de rata recién nacida coestimuladas con Con-A..... | 54 |
| 5.7.- Efecto del THF- γ 2 sobre la expresión de los correceptores CD4 y CD8 por timocitos de rata recién nacida coestimulados con Con-A..... | 55 |
| 5.8.- Efecto del THF- γ 2 sobre la proliferación celular, de timocitos de rata recién nacida, inducida mediante Con-A..... | 59 |
| 5.9.- Efecto del péptido análogo sobre el fenotipo y la proliferación celular de timocitos, de rata recién nacida coestimulados con Con-A..... | 60 |
| 5.9.1.- Efecto del PA sobre la proliferación celular inducida por Con-A en timocitos rata recién nacida..... | 61 |
| 5.9.2.- Efecto del PA sobre el fenotipo de los timocitos, de rata recién nacida, coestimulados con Con-A..... | 62 |
| 6.- DISCUSION..... | 63 |
| 7.- CONCLUSIONES..... | 77 |
| 8.- SUGERENCIAS..... | 78 |
| 8.- BIBLIOGRAFIA..... | 79 |
| 9.- ANEXOS | 86 |

RESUMEN

Durante el proceso de maduración de los timocitos se presenta una serie de sucesos controlados por el retículo epitelio tímico. La interacción de las células epiteliales tímicas con los prelinfocitos T se da en base a la interacción del pre-TCR y del TCR con moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de las células epiteliales. Asimismo, se da una interacción humoral entre ambas estirpes celulares. Como resultado de estas interacciones los linfocitos que cumplen con una serie de requisitos como son: TCR no autoreactivo y expresión adecuada del correceptor CD4 ó del CD8, según la afinidad por moléculas de clase I ó clase II.

Si bien no se conoce completamente el tipo de moléculas que participan en la regulación de la maduración de los linfocitos T, se ha demostrado que la participación de la IL-7 es fundamental para este proceso. Además, se plantea la participación de otras citocinas como IL-3, IL-6 y el factor de células "stem" (SCF), a cuales al parecer potencian la acción de la IL-7. El THF- γ 2 es un octapéptido producido por el epitelio tímico que es capaz de potenciar el efecto mitogénico y estimula la producción de interleucinas, sobre células de bazo y cordón umbilical, y es capaz de estimular la proliferación de células hematopoyéticas.

El objetivo de este trabajo fue identificar la participación de THF- γ 2 en la maduración de los linfocitos T; particularmente, la expresión de los correceptores CD4 y CD8, las poblaciones que expresan los mismos, y la proliferación de los timocitos; así como comparar los efectos de este factor con los de un péptido análogo. Se utilizaron timocitos de rata, los cuales fueron cultivados en suspensión. Se realizaron ensayos curso temporales y dosis-respuesta del efecto del THF- γ 2 sobre los timocitos. La expresión de los antígenos CD4 y CD8 y las poblaciones celulares que expresan estos antígenos se realizó mediante citometría de flujo utilizando dos fluorocromos como mardadores.. La proliferación celular inducida por THF- γ 2, se cuantificó por el método de la incorporación de timidina. Se caracterizó la población de timocitos de rata recién nacida en base al fenotipo (CD4 y CD8), ciclo celular y cantidad de células en apoptosis. Se evaluó el efecto del cultivo celular durante 24 h, sobre los parámetros mencionados anteriormente, así como también el efecto de la Concanavalina A (Con-A) sobre el fenotipo celular de los timocitos, proliferación celular y presencia de apoptosis. Se observó que la Con-A preserva las células, evitando los cambios que se presentan por efecto del cultivo.

Los resultados obtenidos muestran que el THF- γ 2 es capaz de disminuir la expresión de CD8 en timocitos estimulados con Concanavalina (Con-A). Este efecto es dependiente de la concentración de THF- γ 2 utilizada en el ensayo, es máximo a 10^{-10} M, y se puede detectar a las 24 h. El THF- γ 2 incrementa la población de timocitos CD4 a casi el doble en los mismos timocitos. Así mismo, la potencia el efecto mitogénico de la Con-A sobre los timocitos y su efecto máximo se presenta, también a la concentración de 10^{-10} M. El péptido análogo utilizado presentó efectos similares a los del THF- γ 2, pero con menor potencia.

El THF- γ 2 produce un incremento en la población de timocitos CD4⁺. Este aumento se puede deber a una disminución en la expresión del antígeno CD8 por parte de las células dobles negativas o a la proliferación de los timocitos CD4⁺. Quizas, en este incremento de los timocitos CD4⁺ participen ambos mecanismos citados.

I.- INTRODUCCION

1.1.- Generalidades

El sistema inmune provee al organismo de mecanismos para resistir la invasión por agentes infecciosos y el parasitismo, así como para detectar y eliminar células propias que han sufrido transformación maligna (Roitt, 1996). Por ello a esta última función también se le conoce como vigilancia inmunitaria. El mecanismo por medio del cual el sistema inmune comienza la destrucción y eliminación de organismos invasores o de células malignas se inicia con la identificación de moléculas extrañas generadas por estos agentes. Parte de estas moléculas o determinantes antígenicos, suelen ser diferentes a las que existen en el huésped y por ello despiertan la respuesta inmune.

Las células que participan en la respuesta inmune incluyen a macrófagos, células asesinas naturales (NK), polimorfonucleadas, y principalmente los linfocitos; las células epiteliales y del estroma pueden actuar como células presentadoras de antígenos "no profesionales". Estas células, como todas las del organismo, se organizan en tejidos y órganos para hacer más eficiente su función. Hay dos clases de órganos linfoides, los primarios que incluyen a la médula ósea, el hígado fetal, el timo y la bursa de Fabricio en las aves; y los secundarios que incluyen el bazo, los ganglios linfáticos, amígdalas, placas de Peyer. A este conjunto de células, tejidos y órganos se le denomina sistema linfoide. Este sistema se encarga de la generación de los linfocitos, así como de crear un microambiente para la interacción, física y química, de los linfocitos con otras células del sistema inmune; además con los determinantes antígenicos para ser activados y desarrollar la respuesta inmune (Roitt, 1996; Alberts, *et al* 1994; y Paul, 1993).

La respuesta inmune posee varias características importantes como especificidad, diversidad, memoria, autolimitación y discriminación entre lo propio y lo extraño (Alberts, *et al* 1994; Roitt, 1996). Las células responsables de la especificidad de la respuesta inmune pertenecen a una clase de células conocida como linfocitos. En 1960, fue descubierto que las dos principales clases de respuesta inmune -humoral y celular- eran mediadas por dos diferentes clases de linfocitos: las células B y las células T, respectivamente. Los linfocitos B, son los productores de anticuerpos, que en mamíferos, como en el humano, se desarrollan en la etapa fetal en la médula ósea e hígado. Para las aves, en cambio existe un sitio especial de generación de células B conocido como la bolsa de Fabricio. Por otra parte, las células T se desarrollan tanto en los timos de aves como de mamíferos y éstas son las responsables de la inmunidad mediada por células. Si bien es cierto que cada uno de estos tipos celulares se encarga de un tipo de respuesta diferente, también lo es el que ambas deben ser coordinadas para que se presente una respuesta adecuada (Alberts, *et al* 1994; Paul 1993).

Es interesante notar que, la activación de los linfocitos B y T los saca de un estado de reposo "quiescente" (Go), fase no proliferativa del ciclo celular, estimulando su entrada al ciclo celular y a la mitosis. Por ello, estas señales son fundamentales para iniciar y amplificar la respuesta inmune específica mediada por células B y T (Weiss y Littman, 1994). Esta activación de los linfocitos produce, además de la proliferación de los mismos, la diferenciación a células plasmáticas y de memoria en el caso de los linfocitos B. Mientras que la activación de los linfocitos T CD4 Th0 los lleva a la diferenciación a Th1 y Th2 (Mosmann y Sad, 1994).

1.2.- El timo

El timo es un órgano primario del sistema inmune, se encuentra *localizado en la cavidad torácica, entre los grandes vasos y el esternón*. Está constituido por dos lóbulos, cada lóbulo se divide en lobulillos y a su vez cada uno de estos, *forman la médula y corteza tímica*. Ambas contienen una matriz estacionaria compuesta de células epiteliales, aún cuando son *característicamente diferentes (Roitt, 1996)*.

El timo humano normal es simétrico bilateralmente y está usualmente dividido en dos lóbulos de igual tamaño. Los lobulos están recubiertos por una cápsula que sigue el contorno del mismo. Básicamente puede dividirse al timo en tres distintas áreas: (1). La capsula que reviste al lóbulo, formada por fibras de colágena, fibroblastos y células "mayores", (2) la corteza, que consiste de una matriz; la cual contiene linfocitos inmaduros y células fagocíticas y (3) la médula, que contiene una red epitelial y linfocitos maduros en escasa cantidad (Cardarelli, 1989 y 1989a). La corteza es esencialmente lobulada con linfocitos pequeños. Se ha demostrado que en animales jóvenes sanos la corteza predomina, mientras que en animales viejos y en aquéllos que han sido sujetos a estrés o a tratamiento con corticosteroides, disminuye solo a un delgado borde. La médula ocupa la porción central de los lobulillos del timo y contiene alrededor de 15% de tejido tímico en animales jóvenes sanos (Paul, 1993; Cardarelli, 1989a).

El timo tiene su origen embrionario en el cuarto arco branquial; las células epiteliales de la corteza y la médula tienen diferentes orígenes embrionarios y expresan diferentes marcadores de superficie. El timo presenta entre otras características histológicas, una trama de células epiteliales, las

cuales forman una red en la cual se encuentran densos grupos de linfocitos, en diferentes etapas de maduración (Cardarelli, 1989).

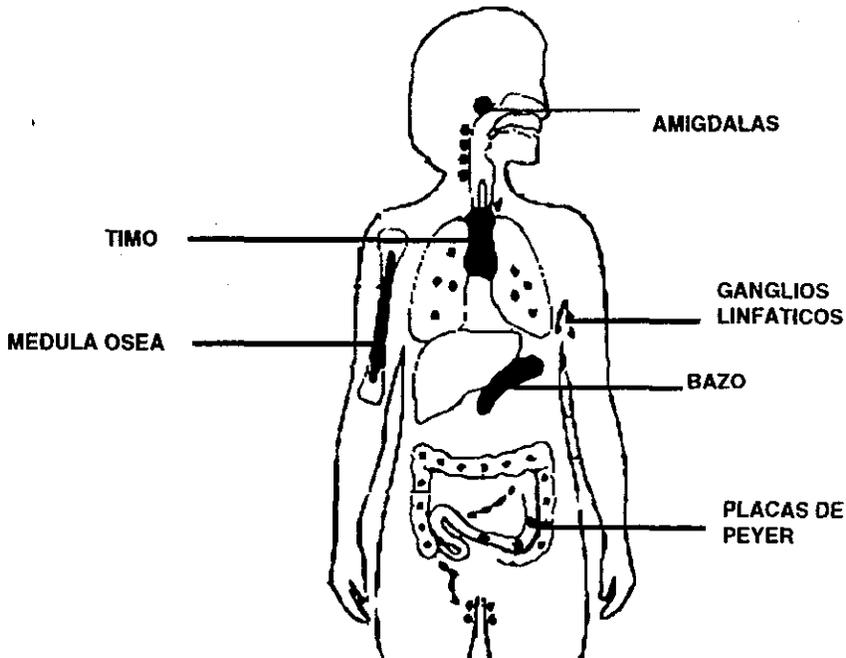


Figura 1.- Esquema de los órganos linfoides primarios o centrales y secundarios o periféricos; el timo y la médula ósea representan los órganos linfoides primarios (tomado de Inmunología esencial, Roitt 1996)

El timo empieza a atrofiarse en la pubertad, con la llegada de la madurez sexual, probablemente por acción de los esteroides sexuales. La atrofia tímica es progresiva y alcanza niveles extremos en los viejos, sin embargo, el timo nunca desaparece (Cardarelli, 1989a). Esta involución se caracteriza por un decremento en el peso del órgano, debida esencialmente a la depleción de los linfocitos corticales; además de una infiltración grasa (Cardarelli, 1989a). Interesantemente, en ciertas situaciones, como la castración,

la atrofia tímica puede ser reversible (Fitzpatrick, *et al* 1985). Asimismo, se ha observado que varios desórdenes patológicos crónicos pueden causar una marcada involución del timo (Cardarelli, 1989a).

1.2.1.- Histología

El timo está constituido por una malla de células reticulares, las cuales son de origen epitelial. En la corteza asientan gran cantidad de linfocitos inmaduros, lo que dificulta la observación de la red de células reticulares. En la médula esta red es fácilmente visible. En esta zona se localizan los corpúsculos de Hassal, los cuales se encuentran constituidos por células muertas y capas de células reticulares dispuestas concéntricamente (Ham, 1967). Las células epiteliales, tienen un núcleo grande y se caracterizan por presentar poca cromatina nuclear; mediante un estudio ultraestructural pueden diferenciarse en el timo diferentes tipos de células epiteliales, todas ellas presentan los elementos característicos de un epitelio como tonofilamentos y desmosomas (Nabarra, y Andrianarison, 1987).

Las células epiteliales del timo tienen origen en el endodermo y ectodermo. La falta de alguno de ellos afecta enormemente el desarrollo del órgano, como es el caso de los ratones nu/nu donde se presenta ausencia del tejido ectodérmico. El mesodermo también participa en la formación del órgano, a través del arribo de células dendríticas, los prolinfocitos y macrófagos, todos ellos de origen mesodermal.

Los prolinfocitos T que anidan en el timo se han clasificado en base a la expresión de algunas moléculas. La expresión de éstos correlaciona con las etapas de madurez de los timocitos. Casi la totalidad de los timocitos expresa el antígeno CD3, por tanto células CD3⁺ se pueden observar en todo el timo. Por la

expresión de los antígenos CD4 y CD8, los timocitos pueden ser divididos en 4 poblaciones. Una pequeña porción de los timocitos (1-2%) no expresan moléculas CD4 y CD8; se localizan en la zona subcapsular. La mayoría de los timocitos (80-85%) coexpresan moléculas CD4 y CD8 y son "dobles positivas" (DP). Estas células se encuentran en la corteza. Las restantes 10-15% comprenden una mezcla de timocitos simples positivos. El 6-10 % de las células son CD4 (CD4⁺CD8⁻) y el restante 3-5 son CD8 (CD4⁻CD8⁺); estas células se localizan en los límites de la corteza y la médula.

En base a la expresión o no del precursor del receptor de células T ó complejo pre-TCR (pT α) (Jörg y von Boehmer, 1997). Los timocitos se clasifican en pre-TCR⁺ o pre-TCR⁻. los timocitos pre-TCR⁺ se localizan en el área subcapsular y corresponden a una subpoblación de células CD4⁺CD8⁻ (Roitt, 1996); Algunas células de la corteza, las cuales son CD4⁺CD8⁺, expresan las cadenas α y β del TCR, por separado. Las células maduras se localizan en los límites de la corteza y la médula. Son células simple positivo, es decir CD4⁺ ó CD8⁺ y que expresan además el complejo $\alpha\beta$ del TCR. Se pueden encontrar también timocitos que expresan la cadena γ del TCR y células que expresan las cadenas γ y δ del TCR, ya sea por separados o formando un complejo.

1.3. - Los receptores

1.3.1.- El TCR

Las células T expresan en su superficie un receptor, el receptor de células T (TCR), el cual interactúa con los antígenos. Los receptores de células T, son los responsables del reconocimiento específico de los péptidos

presentados por el CPH. En general se denomina TCR a las cadenas encargadas de la unión con el antígeno. Sin embargo, el complejo funcional del TCR incluye al complejo CD3 (tres cadenas transmembranales: γ , δ , ϵ) y además las cadenas ζ y η . El CD3 y las cadenas ζ y η forman el complejo de transducción de las señales.

El TCR está formado por un heterodímero de dos proteínas integrales de membrana, las cuales están unidas por un puente disulfuro. La naturaleza molecular del receptor de células T (TCR) fue descrita en 1980, varios años después de que fueron descritas las moléculas de las inmunoglobulinas (Ig) y sus genes. Los genes del TCR tienen homología con genes de las Inmunoglobulinas y de hecho pertenecen a la superfamilia de los genes de inmunoglobulinas (Roitt, 1996; Abbas, 1994).

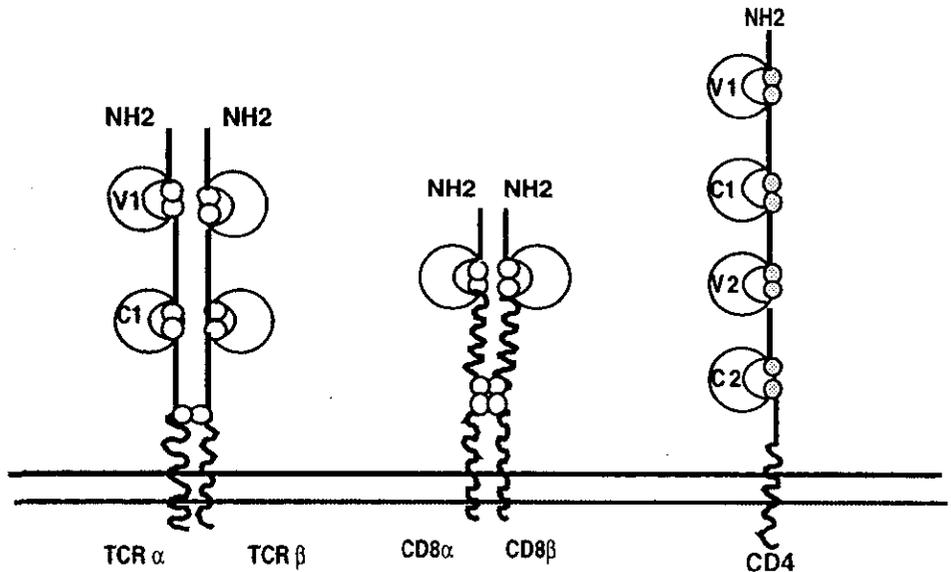


Figura 2.- Esquema de los receptores inmunes, superfamilias y subfamilias. Superfamilia de las inmunoglobulinas. Receptor TCR y correceptores CD4 y CD8. V1: regiones variables; C1,C2: regiones constantes; S uniones disulfuro (tomado de suplementos de *Immunology today* oct 1996)

La expresión del TCR es definitiva en el proceso de maduración de las células T, por el papel que tiene el TCR en la interacción con CPH de la célula del epitelio tímico, durante la selección positiva (Jemenson *et al.*, 1995). Existen dos tipos de TCR; el más abundante es el conocido como $\alpha\beta$ y el otro menos abundante es el $\gamma\delta$. Una célula T solo puede expresar uno de los dos receptores, nunca pueden expresar ambos simultáneamente. La mayoría de células T, incluidas las células T cooperadoras y linfocitos T citotóxicos (CTL), expresan el heterodímero $\alpha\beta$.

La cadena α es una glicoproteína básica de 40-50 kDa., sin carga. La cadena β es un polipéptido con peso molecular de 34 kDa. Ambas cadenas tienen, como las Ig, una región variable (v) y una constante (C). La región carboxilo terminal de la región variable es la unión entre las regiones V y C. Esta región de unión es codificada por un segmento del gen de unión (J). En el caso de la cadena β existe un segmento del gen de diversidad (D). La presencia de las regiones V,D,C y J es una característica de las Ig. La región variable de los heterodímeros $\alpha\beta$ reconocen complejos de péptidos procesados, generados de proteínas extrañas y moléculas propias, y unidos al CPH (Jemenson *et al.*, 1995; Abbas, *et al.*, 1994).

Los TCR $\gamma\delta$ son una segunda variedad de este receptor. Las cadenas peptídicas, también están unidas por puentes disulfuro y solo se expresan en una pequeña subpoblación de células T periféricas. Las proteínas $\gamma\delta$ también se asocian al complejo de transducción de la señal, al igual que el TCR $\alpha\beta$. Las células con TCR $\gamma\delta$, también maduran en el timo; aunque se desconoce su proceso de maduración. Ontogénicamente, las células con el TCR $\delta\gamma$ aparecen

primero que aquellas que expresan el TCR $\alpha\beta$ (Jemenson *et al.*, 1995; Roitt, 1996). Generalmente las células que expresan este tipo de TCR $\gamma\delta$ coexpresan el CD8. Estas células se dividen en dos poblaciones, una de ellas migra hacia la piel y otra que lo hace hacia epitelios como el pulmonar o intestinal. Una característica de estas células que son capaces de producir las mismas citocinas que las células que expresan el TCR $\alpha\beta$ (Benjamini *et al.*, 1996).

1.3.2.- Los correceptores CD4 y CD8

Los correceptores CD4 y CD8 son moléculas accesorias involucradas en la restricción del CPH y activación de células T. Se encuentran en la membrana del linfocito T cerca del TCR, pero sin que haya unión de tipo covalente entre ellas. CD4 y CD8 son glicoproteínas pertenecientes a la familia de las Ig. En los linfocitos maduros solo una de ellas es expresada en la superficie celular. Mientras que en algunas subetapas del proceso de maduración de los timocitos, son expresadas simultáneamente.

CD4 es una glicoproteína transmembranal, aproximadamente de 55 kD, la cual es expresada como monómero en la superficie de algunos timocitos y células T periféricas. El gen de CD4 está localizado en el cromosoma 12 en el humano. Esta molécula tiene dos funciones: unirse a la porción invariante del CPH tipo II; es decir, actuar como molécula de adhesión y como un transductor de la señal de activación del linfocito T.

La estructura de la molécula CD8 varía en algunas especies y en los diferentes estados de maduración de la célula. En el humano, en linfocitos T de sangre periférica, la molécula CD8 consiste de dos cadenas de glicoproteínas heterodiméricas unidas por 8 uniones disulfuro. Estas cadenas se denominan

CD8 α (32 kD) y CD8 β (34kD). Esta molécula, al igual que CD4, tiene dos funciones: unirse a la región invariante del CPH tipo I; y actuar como un transductor de la señal de activación del linfocito T (Jemenson *et al.*, 1995 ; Abbas *et al.*, 1994.).

CD4 y CD8 actúan como correceptores del receptor de las células T (TCR), en células T maduras. Evidencias experimentales de bloqueo con anticuerpos y mediante el uso de ratones Knockout, en los cuales CD4 y CD8, son eliminados indican que estas moléculas juegan un papel importante en la selección positiva (Jemenson *et al.*, 1995).

1.4.- Progenitores linfoides tímicos (TLPs)

Moore y Owen propusieron, hace más de 25 años, que los progenitores intratímicos de células T, se derivan de células hematopoyéticas pluripotenciales circulantes. Esta hipótesis ha sido comprobado al demostrar que las poblaciones de "protimocitos" de sangre fetal han servido para el análisis de las primeras etapas del desarrollo pretímico de células T. Estas células circulantes derivan, al igual que todas las líneas de células sanguíneas maduras, de células madre hematopoyéticas (CMH). Las células sanguíneas, entre ellas los linfocitos, dependen de una permanente regeneración de las CMH, para mantener una cantidad de células maduras o funcionales suficiente durante toda la vida (Rodewald, 1995) .

Las CMH son células "Stem" o pluripotenciales, las cuales se caracterizan por: (a) ser células no diferenciadas totalmente; (b) tener la capacidad de dividirse dando origen a células iguales a ellas mismas (como cualquier célula) o dando origen a una célula más madura que ella y (c) tener la

capacidad de proliferar sin límite. Estas características les permiten autorrenovarse y conservar su potencialidad para generar varios linajes, aún en la etapa adulta del individuo o de un animal (Alberts, *et al* 1994)

Las CMH al dividirse pueden autorrenovarse o dar lugar a células hijas pluripotenciales con menos potencialidades que ellas mismas. Es decir a células pluripotenciales de linaje progresivamente más restringido, hasta que finalmente quedan comprometidas para un solo linaje. En la actualidad se desconocen marcadores moleculares que identifiquen cada etapa de diferenciación y compromiso de las células pluripotenciales de linaje restringido. Una aproximación experimental que ha permitido salvar la falta de marcadores ha consistido en estudiar la pérdida de la capacidad para generar otros linajes celulares. Cuando esto sucede se decide la pérdida de opciones de diferenciación. Se dice entonces que las células han adquirido "compromiso" con una línea determinada (Rodewald, 1995).

La primera etapa de diferenciación de las CMH en la médula ósea, para dar lugar a linfocitos T, es la aparición de una población precursora de una línea linfoide la cual está restringida a la formación de linfocitos (B y T), células asesinas (NK) y células dendríticas.

Los prolinfocitos T se originan en la médula ósea a partir de los CMH. En una etapa de su maduración, estas células pierden las adhesinas que los mantienen en este órgano. Además de lo anterior, los prolinfocitos son atraídos al timo por factores quimiotácticos y probablemente por una serie de señales de contacto ("homming") con las células endoteliales de los vasos. Es en esta etapa cuando es posible localizarlas en sangre periférica o de cordón umbilical (Picker, 1994; Toug y Sprent 1995; Scolla y Godfrey 1995).

Evidencias experimentales sugieren que las CMH circulantes que darán origen a los linfocitos T adquieren el compromiso con el linaje T antes de arribar al timo. Por ejemplo, en sangre fetal murina se ha identificado una población celular caracterizada por el fenotipo Thy-1⁺ C-kit^{low} CD3⁻ la cual es capaz de reconstituir células T TCR $\alpha\beta^+$, *in vivo*. La mayoría de estos protimocitos de sangre fetal tienen genes de la cadena β del TCR sin rearreglo; solo una pequeña porción de esta población presenta rearreglo de los genes D (J) de la cadena β . En el timo es posible identificar células con este fenotipo, aunque en muy baja densidad. Se ha planteado que cuando estas células no arriban al timo se diferencian hacia células NK. Esta población celular podría, por tanto, ser una etapa intermedia de maduración entre las CMH de la médula ósea y los timocitos o las células NK, por lo que se les ha denominado precursores T/NK (Rodewald, 1995).

1.4.1.- Etapas de diferenciación tímica temprana.

Cada una de las etapas de diferenciación temprana son caracterizadas por distinciones celulares, moleculares y genéticas; la detección de las proteínas de superficie por citometría, es seguida generalmente para definir las etapas que precede la expresión de moléculas de TCR en la superficie (Zuñiga-Pfucker y Lenardo, 1996), así como también monitorear los cambios en el nivel de expresión de estas moléculas de superficie celular, incluyendo CD4, CD8, TCR/CD3, CD5, CD69, CD44, HSA-1 y Thy1.2 (Broussard *et al* 1996).

*Los progenitores linfoides o células triple negativas (TLPs), son células que expresan altos niveles de CD44 (Pgp-1) y CD117(receptor del factor de células-"stem," c-kit), bajos niveles de Thy-1 y del antígeno estable a calor

(HSA). Los progenitores linfoides tímicos son la mayoría conocidos como linfocitos inmaduros y no tiene un linaje exclusivo T.

*Células pro-T, se caracterizan por la expresión de CD25; las células continúan expresando CD44 y CD117; además se inicia el rearrreglo de los genes de la cadena β de TCR. El linaje T y la proliferación pueden afectarse en esta etapa.

*Células pre-T tempranas estas células dejan de expresar los marcadores tal como CD44 y CD117, pero continúa la expresión de CD25. El rearrreglo del gen de TCR- β y la expresión del gen pre-T α ha comenzado. El primer evento de selección en base a una señal de maduración a través del pre-T α .

*Las célula pre tardías, en esta etapa, los timocitos suspenden la expresión de CD25 y el rearrreglo necesario de la cadena β de TCR, y e inicia el rearrreglo de la cadena α . La línea esquemática de diferenciación temprana presentada en la figura 3 (Zuñiga-Pfúcker y Lenardo, 1996).

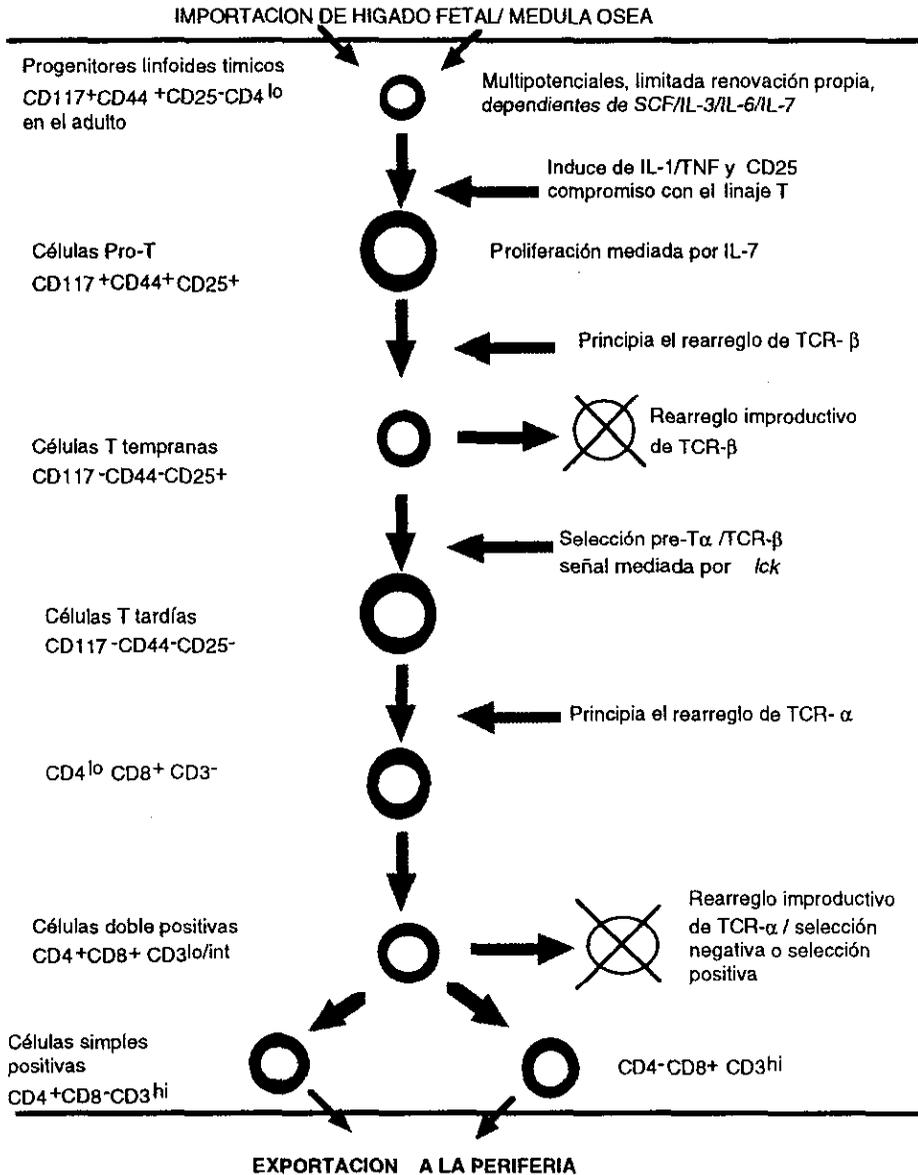


Figura 3.- Esquema simplificado de las etapas de diferenciación de las células T αβ que precede de la etapa de TCR⁺ CD4⁺ CD8⁺ (DP). El tamaño relativo de los símbolos de los timocitos indica su estado de proliferación relativo. Cada flecha indica una etapa irreversible de maduración de los linfocitos T. (Tomado de Zuñiga-Pflücker y Lenardo, 1996).

1.5- Desarrollo de células T

La maduración de los linfocitos T se realiza en el timo, aunque se ha demostrado la presencia de una pequeña población de estas células que se desarrollan fuera del timo y aún en ausencia de este órgano linfoide primario (Rodewald, 1995). Existen dos líneas de evidencias de que la mayoría de las células T se originan en el timo. La primera línea de evidencias fue aportada por estudios que consistieron en la remoción del timo durante las primeras etapas de la vida; esto produjo la no aparición de células T en órganos linfoides periféricos. Del mismo modo, en los animales con atimia congénita o adquirida en etapas tempranas de la vida se caracterizan por la ausencia de las células T en sus órganos linfoides secundarios. La segunda línea de evidencias fue aportada por estudios de marcaje intratímico de los timocitos. Estos estudios demostraron que los linfocitos T se originan en el timo y posteriormente salen de este órgano y migran hacia los tejidos linfoides periféricos (Roitt, 1996). Por otra parte, existen también evidencias de una maduración extratímica de los linfocitos T. Evidencias experimentales han mostrado la presencia de células T en los ratones nu/nu, los cuales son atímicos. Sin embargo en estos animales las células T son casi indetectables; La proporción de células CD4 es muy variable; estas células expresan típicamente el complejo $\alpha\beta$ de TCR; y se ha detectado la presencia de células autoreactivas en estos ratones.

La mayoría de las células T se originan en el timo, donde pasan distintas etapas de maduración. Arriban al timo los prolifocitos T que no expresan las moléculas del CD3, el TCR, ni los correceptores CD4 y CD8. Como parte de la iniciación del proceso de maduración estas células expresan el complejo CD3 y proliferan dentro de la zona subcapsular de la corteza tímica; se inicia el rearreglo de los genes de la cadena β del TCR, así como la expresión

membranal de la misma en un complejo molecular pT α (Jörg y von Boehmer, 1997).

Este complejo proteico interactúa con algún ligando tímico no conocido e inicia una cascada de eventos intracelulares que son las señales que permiten el paso hacia la siguiente etapa de maduración. Los timocitos que expresan un pre-TCR funcional, es decir que interactuaron con el ligando tímico, son seleccionados positivamente y continúan el proceso de maduración. Los que no lo hacen en cierto tiempo son seleccionados negativamente y eliminados por apoptosis, evitando con ésto último la acumulación de timocitos sin pre-TCR o con pre-TCR no funcional.

La siguiente etapa del proceso de maduración, se inicia con la expresión simultánea de los correceptores CD4 y CD8. Esta población celular prolifera de manera abundante y constituye del 70 al 80 % del total de las células del timo. Además de la coexpresión de los correceptores CD4 y CD8, esta etapa se caracteriza por el cese del rearreglo de los genes de la cadena β , y del pT α , y de la expresión del pre-TCR; así como el rearreglo de los genes de la cadena α del TCR. Durante una fase más avanzada, esta etapa se caracteriza por la expresión del dímero de las cadenas α y β del TCR. Es en esta fase cuando las células expresan el receptor de células T (TCR $\alpha\beta$) y son capaces de unirse a moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (CPH). La afinidad del TCR por moléculas del CPH clase I ó II determina si la célula será un linfocito CD8* (supresora o citotóxica) o CD4* (cooperadora). La interacción exitosa del TCR con el CPH de las células del retículo tímico es la señal para la selección positiva en esta etapa. Aquellas células que la realizan con éxito, son seleccionadas positivamente y continúa el proceso de maduración.

En la tercera etapa de maduración las células dejan de dividirse y cesan el rearreglo de genes de la cadena α . Además, dejan de expresar uno de los correceptores CD4 ó CD8 y pasan a la médula del timo, para salir del órgano hacia la circulación periférica y hacia los órganos linfoides secundarios (Roitt, 1996; Alberts, *et al* 1994; Paul, 1993; Anderson, 1996).

1.6.- Modulación de la maduración de los linfocitos T por citocinas, factores tímicos y hormonas.

La generación de células T inmunológicamente competentes requiere la influencia de microambientes tímicos adecuados. Generalmente es aceptado que las células no linfoides (estromales), situadas en varios compartimentos del timo proveen las "señales de educación" que orientan el desarrollo de las células T para madurar o bien inducir la muerte por apoptosis. Se ha sugerido la participación de factores humorales que regularían el proceso de maduración en el timo; sin embargo, no se conocen en detalle cuáles son ni cuál es su participación.

La interleucina 7 (IL-7), la cual es producida por las células estromales del timo, es un factor de crecimiento esencial para la supervivencia y repoblación (proliferación) de las células dobles negativas. (Zlotnik y Moore, 1995) Además de IL-7 se plantea la participación de otras citocinas como la IL-3, IL-6 y el factor de células stem (SCF), los cuales al parecer potencian la acción de IL-7. Se ha demostrado que las interleucinas que participan en la activación de los linfocitos no participan en la modulación del proceso de maduración de estas células. (Zlotnik, 1995). Mientras que para IL-1 α /TNF- α , se ha sugerido un papel importante en la maduración de las células en la etapa pro-T. (Zuñiga-Pfucker y Lenardo, 1996).

Por otro lado, se ha planteado que algunas hormonas, además de los esteroides sexuales influyen el proceso de maduración de los linfocitos T. Esto se ha podido demostrar mediante el empleo de la cepa de ratones "dwarf", los cuales se caracterizan por ser inmunodeficientes debido a que presentan una deficiencia de células T y un defecto de los linfocitos B. Esta inmunodeficiencia se ha observado que puede corregirse con la administración de hormonas tiroideas a los animales (Smithson, *et al* 1995; Montecino-Rodríguez, *et al* 1996).

Un aspecto importante y que destaca de la influencia de los factores tímicos en la diferenciación de células T es que las células DP no son capaces de producir ni responder a las citocinas, hasta que han concluido el proceso de selección positiva y negativa. Lo anterior sugiere que las citocinas no participan en el proceso de selección positiva, sino más bien participan en la selección negativa, sobre todo aquellas asociadas con el proceso de apoptosis (Zlotnik, 1995).

La modulación del microambiente tímico, así como las interacciones entre los timocitos y las células estromales son esenciales para el desarrollo tanto de los precursores de células T como del estroma tímico. El desarrollo normal de la médula tímica es dependiente de la presencia de timocitos (Anderson, *et al* 1996).

1.7.- Proceso de selección

La selección positiva es un proceso que permite el desarrollo de linfocitos aptos y capaces para desarrollar la respuesta inmune. Este proceso se desarrolla paralelamente al de selección negativa y a la maduración de los linfocitos dentro del timo. Podríamos decir que realmente no existe un proceso

de selección positiva y otro de selección negativa. Esta división es de tipo académico, en realidad se trata de un proceso de selección que permite la sobrevivencia de los linfocitos que cuentan con un TCR adecuado. A través del mismo se lleva a cabo la interacción con las moléculas coestimuladoras correspondientes al tipo de linfocito de que se trate, para que se lleven a cabo los mecanismos de transducción de señales necesarios, para que un linfocito cuente con los mecanismos para desarrollar la respuesta inmune. Por otra parte, este proceso de selección elimina a los linfocitos que han fallado en el rearreglo de los genes del TCR y por lo cual no expresan TCR, o expresan un receptor no funcional, que hace una combinación incorrecta de la afinidad del TCR hacia alguna clase de CPH o bien de los correceptores CD4 ó CD8; y finalmente, la eliminación de aquellos linfocitos cuyo TCR presenta afinidad por antígenos propios .

El proceso de selección se da en dos grandes etapas. La primera de ellas es durante la fase de células dobles negativas. Esto ocurre en la zona subcapsular de la corteza tímica, y se da en base al pre-receptor de células T que expresen los timocitos. Dado que la molécula de $pT\alpha$ y el CD3 son constantes y que en aquellos ratones TCR β deficientes se presenta una detención del proceso de maduración de los linfocitos, se considera que esta selección se da en base a la cadena β del TCR (von Boehmer, 1990; Kishi, *et al* 1991; Groettrup, *et al* 1992; Mombaerts, *et al* 1992; Shinkai, *et al* 1993; von Boehmer, *et al* 1994).

El pre-TCR, al parecer, interacciona con algún ligando interno, que no se ha identificado. La molécula CD3 inicia la transducción de la señal, lo que produce una movilización de calcio y la activación de la tirosina cinasa Ick o alguna otra tirosina cinasa. La cascada de eventos intracelulares que continua

estos eventos no se conocen; sin embargo, se sabe que ello conduce por un lado, a que el rearreglo de genes de la cadena β del TCR se detenga, con lo cual se asegura la expresión de un solo alelo de TCR β , y por otro que la proteína pT α deje de expresarse; y se inicie el rearreglo de los genes de la cadena α del TCR; así como, la proliferación celular y la maduración de los timocitos (Groettrup, *et al* 1992; Goettrup y von Boehmer, 1993a y 1993b; Molina, 1992; Levin, 1993; Uematsu, 1988; Kishi, *et al* 1991; Groettrup, *et al* 1993). Por otra parte, aquellos timocitos que presentan un TCR β no funcional y que por lo tanto fallan en la interacción con el ligando son seleccionados negativamente e inducidos a la apoptosis.

La segunda etapa del proceso de selección de los timocitos se presenta durante la fase de células dobles positivas, en los límites entre la corteza y la médula tímicas; la selección de los linfocitos se realiza en base al receptor de células T $\alpha\beta$ que presenta, por lo que se requiere la interacción célula-célula de los linfocitos con las células estromales. El TCR de los linfocitos inmaduros interacciona con un ligando intratímico, el cual en este caso se sabe que se trata del complejo principal de histocompatibilidad (CPH) de las células retículo epiteliales. La interacción del TCR con el CPH que no presenta el péptido específico reconocido por el TCR inicia la transducción de señales a través de la molécula ζ del CD3 ó de CD45 (von Boehmer, 1990; Love, *et al* 1993; Kishihara, *et al* 1993). Asimismo, se inicia una cascada de eventos intracelulares que conduce: (1) a la maduración de las células, sin la presencia de proliferación celular; (2) a la terminación de la actividad de las recombinasas RAG1 y RAG2; (3) al cese del rearreglo de genes de la cadena α del TCR; (4) a que se incremente la esperanza de vida del linfocito; y finalmente (5) a que se exprese el antígeno CD69 (Huesmann *et al*., 1991; Borgulya *et al*., 1992; Brände *et al*.,

1992; Egerton *et al.*, 1990; Bendelac y Matzinger, 1992; Swat *et al.*, 1993). Por otra parte, aquella gran cantidad de linfocitos inmaduros que no sean capaces de interactuar con los CPH propios o aquellos que interactúen con el CPH que presenta el péptido por el cual el TCR tiene especificidad son eliminados a través de la apoptosis.

La unión del TCR $\alpha\beta$ puede darse con CPH de clase I ó de clase II. La unión con moléculas de clase I solo seleccionará células cooperadoras CD4; mientras que de manera contraria, la unión del TCR $\alpha\beta$ con moléculas de clase II será la señal para seleccionar linfocitos supresores ó citotóxicos CD8 (Sha, 1988; Berg *et al.*, 1989; Kaye *et al.*, 1989; Zijistra *et al.*, 1990; Cosgrove *et al.*, 1991; Urdahl *et al.*, 1994, Jemenson *et al.*, 1995).

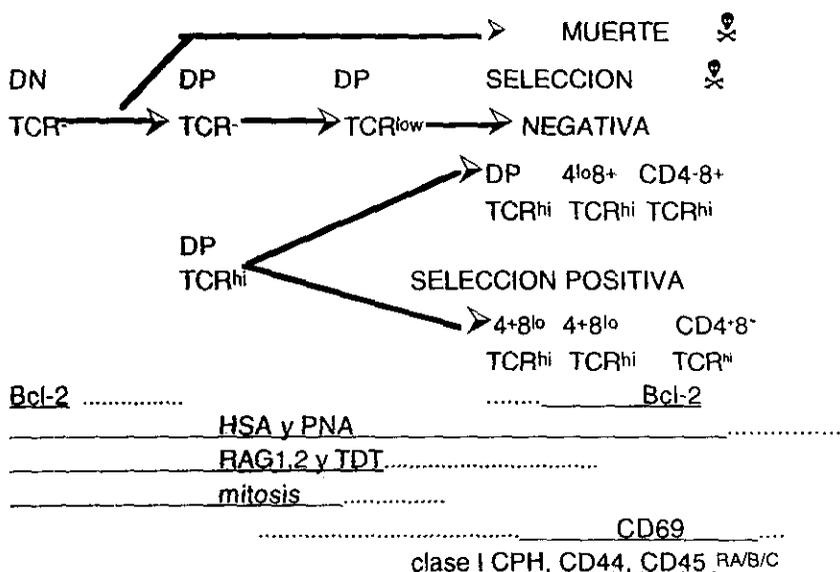


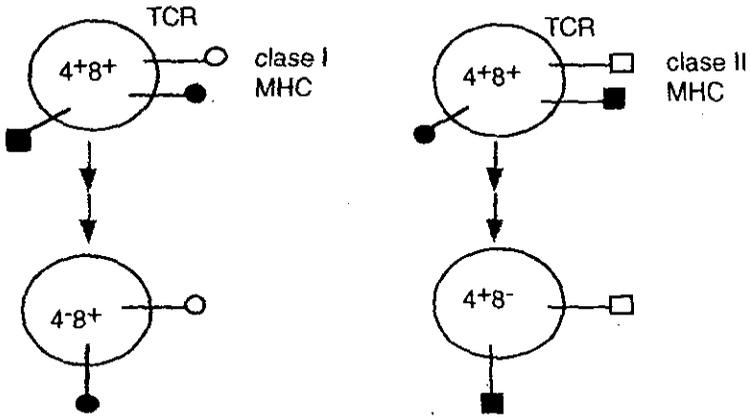
Figura 4.- Cambios fenotípicos asociados con la selección positiva de los timocitos. Las flechas muestran la progresión de los timocitos desde las primeras etapas de maduración. La expresión de varios marcadores es mostrada y la línea punteada indica cambios graduales en la expresión de estos antígenos (tomado de Jamenson y col. 1995).

La afinidad del TCR por el complejo CPH y el antígeno presente en la hendidura del mismo determinará a que CPH se unirá un TCR. Esto parece ser, al menos en la fase de selección, independiente del tipo de clase del CPH. El mecanismo mediante el cual se da la restricción de clase del CPH, para el TCR no está completamente dilucidado. Se han postulado dos diferentes modelos, el modelo "instructivo" y el modelo estocástico/selectivo (von Boehmer, 1986; Robey *et al.*, 1991).

El modelo instructivo, propone que las células del retículo tímico que presentan CPH de clase I al unirse al TCR del timocito dan a éste una señal de selección positiva, al mismo tiempo que le indicarían que deben dejar de expresar el correceptor CD4, por lo que esta célula se convertirá en un linfocito CD8. De la misma forma, los timocitos que se unieran a un CPH de clase II, recibirían la señal para dejar de expresar el correceptor CD8 y convertirse en una célula CD4 (Lundberg *et al.*, 1995). Este modelo presupone que la selección se da cuando las células son dobles positivas.

El modelo estocástico/selectivo presupone que la selección se da cuando la célula ya se ha convertido en simple positiva, CD4 ó CD8. Este modelo plantea que el linfocito doble positivo dejaría de expresar de manera estocástica uno u otro de los correceptores para convertirse en célula simple positivo; sin la intervención de la afinidad del TCR por uno u otro tipo de CPH. En una segunda fase el TCR de las células interaccionaría con el CPH de las células estromales. Los timocitos que han conservado la expresión del correceptor "adecuado" son capaces de interaccionar con las células estromales y de recibir una señal de selección positiva. Aquellas que han conservado el correceptor "incorrecto" no son capaces de esta interacción y por tanto no recibirán la señal de sobrevivencia y por tanto serán eliminadas por apoptosis (Lundberg *et al.*, 1995; Anderson *et al.*, 1996; Jemenson *et al.*, 1995; Broussard-Diehl *et al.*, 1996).

Instructivo



Estocástico/Selectivo

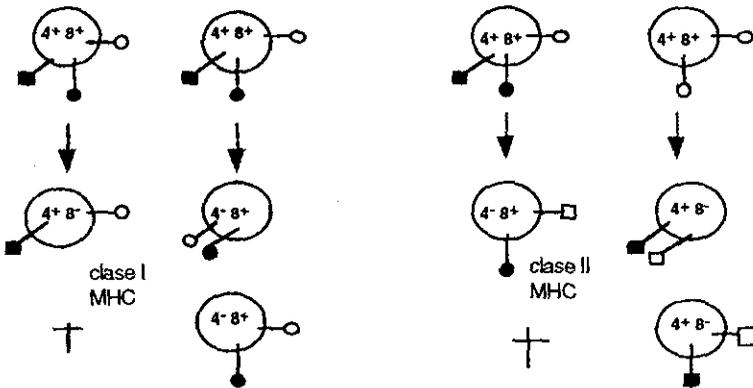


Figura 5.- Los modelos instructivo y estocástico/selectivo de los linajes concomitantes CD4/CD8, MHC clase I, MHC clase II, CD4, CD8 (tomado de von-Boehmer, 1994)

1.8.- El péptido del CPH de la célula reticular

El CPH es un complejo proteínico que posee una porción transmembranal, una porción intracelular, así como una porción extracelular. En el caso de las moléculas de clase I, consta de una cadena α y una molécula de β 2 microglobulina. La cadena α y la molécula de β 2 microglobulina son sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso y en ese mismo sitio son ensambladas junto con péptidos provenientes del citosol o del mismo retículo. La unión del péptido da estabilidad al complejo. Estas moléculas son movilizados a la superficie celular. Las moléculas de clase II son sintetizadas en el retículo endoplásmico rugoso; las cadenas α y β son ensambladas junto a una tercera molécula, la cadena invariante (Ii). La cadena Ii tiene la función de estabilizar el complejo y evitar la unión de péptidos a la hendidura del complejo. En las vesículas ácidas Ii es removida del complejo y péptidos derivados de antígenos foráneos se unen al complejo en la hendidura y lo estabilizan. El complejo es transportado a la membrana, donde es insertado. Como se mencionó anteriormente la unión del péptido al CPH estabiliza el complejo; lo cual permite una interacción estable por varias horas; lo anterior hace que sea muy rara la existencia de CPH sin péptido unido en su hendidura.

En el caso de las células epiteliales del timo no se conoce el mecanismo mediante el cual son estabilizados los CPH que presentarían afinidad por péptidos extraños. Al respecto se han planteado dos teorías: La primera plantea que la selección se da por la interacción del TCR con el péptido; por ello éstos son substituídos por péptidos endógenos. Para lo anterior las células epiteliales del timo tendrían la característica de sintetizar toda la variedad de péptidos que pudieran unirse a los CPH (Kourilsky, 1989) El TCR del linfocito inmaduro reconocería el ligando, de tal manera que el mismo ligando que le da el estímulo

para la selección positiva, sería el que posteriormente lo activaría. Para evitar que el linfocito sea "activado" y por tanto conducido a la apoptosis, la célula epitelial produciría estos péptidos en una concentración suficiente para dar el estímulo de la selección positivo, pero no para activar los linfocitos.

La segunda teoría plantea que lo importante para la selección es la interacción del TCR con el CPH y no con el péptido específico. Por ello el ligando que induce selección positiva no es necesariamente el mismo que es capaz de activar a las células. Para ello las células epiteliales generarían una variedad de péptidos "generales" capaces de inducir la selección de los linfocitos inmaduros.

Aunque cada una de las teorías explica este mecanismo existe la posibilidad de que en tal estabilización participen ambos mecanismos. El proceso de selección puede ser monitoreado a través de los cambios en la expresión de varias moléculas de superficie (Broussard-Diehl *et al.*, 1996). Por otra parte se conoce que para la selección positiva son necesarias las células epiteliales tímicas que expresan moléculas del complejo principal de histocompatibilidad clase I y clase II. Hasta el momento, no se conocen otros factores que participen en este proceso, ya que ni las moléculas coestimuladoras ni las citocinas participan en él. Se ha planteado por algunos autores que el apagamiento en la expresión de CD8 está dado por un mecanismo estocástico, muestra que la de CD4 se da a través de un evento de tipo instruccional (Anderson *et al.*, 1996; Jemenson *et al.*, 1995)

1.9.- Salida de células T del timo

Una vez que se ha completado el proceso de maduración y selección intratímica de los linfocitos T, estos emigran hacia los órganos linfoides

secundarios y la circulación periférica; esto ha sido demostrado mediante experimentos de marcaje *in situ* de timocitos, con ^3H -TDR o tiocianato de fluoresceína. Estos experimentos han mostrado que la mayoría de las células que emigran del timo son células simple positivas, Sin embargo, se ha observado también que una pequeña población de células inmaduras con el fenotipo de dobles positivas es capaz de salir del órgano. Las células migran rápidamente al bazo y ganglios linfáticos, circulación periférica y hacia el resto del organismo. Estas células aparecen en unas horas en el ducto torácico, lo que muestra que se hallan ya recorriendo todo el organismo (Paul 1993; Cardarelli, 1989b)

Los linfocitos T vírgenes permanecen en el ganglio donde serán activados por los antígenos. Una vez que han sido activados, los linfocitos T están en continuo tráfico hacia la piel y mucosas. Las células vírgenes permanecen en el ganglio por la acción de la adhesión de una molécula que expresan en su superficie, la L-selectina ó CD62L. Esta adhesina se une a un carbohidrato presente en la membrana de las células epiteliales de las vénulas del ganglio. Se cree que además participan la molécula LFA-1 del linfocito T, la cual se une a la molécula de ICAM-1 en las células epiteliales de las vénulas del ganglio. Una vez que los linfocitos son activados internalizan las moléculas involucradas en esta adhesión, CD62L por ejemplo, y pueden abandonar el ganglio y migrar hacia la piel y mucosas (Benjamini *et al.*, 1996).

1.10.- Linfocitos T

Son las células encargadas de la respuesta inmune de tipo celular. Se pueden clasificar en dos grandes grupos según el tipo de receptor que expresen; TCR ó TCR $\gamma\delta$. Los linfocitos que expresan el receptor tipo $\alpha\beta$ se dividen, a su vez, en CD4 y CD8. Existen dos subtipos de linfocitos CD8;

linfocitos supresores y linfocitos citotóxicos. Los linfocitos CD4 se denominan también cooperadores. Estos linfocitos ejercen su efecto a través de la producción y secreción de citocinas. En base al tipo de citocinas que producen los linfocitos CD4 se clasifican en: Th1 los que sintetizan interleucina 2 e interferon γ , Th2 los que producen interleucina 4 e interleucina 5. Existe un tercer grupo, las células Th0, las cuales se consideran precursores de los Th1 y Th2; y son capaces de producir IL-2, IL-4 e INF- γ . (Barrera -Rodríguez *et al.* , 1995; Sciammas *et al.*, 1994).

La similitud de los receptores TCR α/β y δ/γ sugiere que los dominios δ/γ interactúan con antígenos presentados por el CPH. De ser así, las cadenas δ/γ interactúan con elementos de restricción de polimorfismo limitado. Hay evidencias que apoyan la idea que el reconocimiento de los antígenos por este tipo de linfocitos no está restringido por moléculas del CPH; sin embargo, algunos de los experimentos realizados con ratones transgénicos contradicen estas evidencias. La función precisa de los linfocitos T TCR δ/γ aún se desconoce. Se ha reportado que estos linfocitos pueden secretar una variedad de citocinas: interleucinas (2 y 4), interferon- γ , factor de necrosis tumoral (TNF) y factores estimulantes de colonias (CSG-GM); además tienen actividad citolítica inespecífica, lo que sugiere que pueden estar involucrados en respuesta de tipo inflamatoria. En pacientes con linfoma de Burkitt, linfomas de células B, leucemia linfocítica crónica (LLC), carcinoma de pulmón tumor de Wilms, sarcoma y melanoma, se han obtenido linfocitos T δ/γ con actividad antitumoral, sin embargo su participación en el fenómeno aún no es clara (Jemenson *et al.* , 1995; Barrera-Rodríguez *et al.* , 1995; Abbas *et al.* , 1994).

2.- ANTECEDENTES

2.1.- Función endocrina del timo

Los primeros experimentos definitivos que muestran el papel crucial del timo en el desarrollo de células T fueron realizados en los años 60s. J. Miller investigó el papel del timo en la leucogénesis en ratones con uno o dos días de nacidos. Los roedores fueron timectomizados a esa edad lo que provocó una marcada deficiencia de linfocitos, falla en el rechazo a los trasplantes y los animales fueron susceptibles a infecciones oportunistas. En 1967, Miller y Osoba escribieron una revisión, que aportó las bases para el conocimiento actual de la importancia del timo, en la respuesta inmune (Anderson *et al.* 1996).

Actualmente es aceptado que el timo tiene un papel central en la linfopoyesis. Evidencias de modelos experimentales en animales establecen que el mecanismo endocrino media en parte la función reguladora del timo (Trainin *et al.*, 1994).

Estudios iniciales sugirieron que para la maduración de los linfocitos era necesario el contacto directo entre los prolinfocitos y las células epiteliales tímicas. Esto debido a que se observó que el primer paso para la adquisición de inmunocompetencia era la migración de los prolinfocitos al timo. Sin embargo estudios posteriores mostraron que la administración de extractos de timo a animales que habían sido timectomizados en la etapa neonatal podían sustituir, parcialmente al órgano extirpado. Asimismo, se observó que cuando se extirpaba el timo en la etapa neonatal y simultáneamente, se hacía un trasplante del mismo órgano dentro de una cámara que impidiera la entrada y salida de células, es decir de los precursores pretímicos, las deficiencias en la respuesta inmune provocadas por la timectomía disminuían (Cardarelli, 1989b, c).

Los experimentos anteriormente descritos demostraron que el timo tenía una función endócrina y por tanto era capaz de producir y secretar sustancias que influían en la maduración de los linfocitos y la respuesta inmune (Coto *et al.*, 1992; Hadden, 1992; Trainin, 1985). Actualmente se conocen varias sustancias que son consideradas productos endocrinos del timo. Estas incluyen timosina, timoestimulina, timopoyetina, factor tímico humoral y factor tímico sérico (Trainin *et al.*, 1983). Se han descrito varias funciones biológicas de estas hormonas, sin embargo estas funciones son en órganos linfoides secundarios y no en el timo. Estos efectos de las hormonas tímicas sugieren que el timo puede regular la respuesta inmune de los linfocitos de una manera endocrina (Coto *et al.*, 1992).

Con el descubrimiento de las hormonas tímicas, se reconoció que el timo era capaz de producir y secretar sustancias que actuaban como mensajeros químicos de tipo paracrino, autócrino o endócrino. Se pensó que debía existir una o algunas hormonas tímicas que actuaran de forma parácrina modulando la maduración de los linfocitos T. Por ello varios grupos se dedicaron a la obtención de extractos tímicos y a buscar la manera de demostrar algún efecto de los mismos en la maduración de los linfocitos. Sin embargo, la mayoría de los ensayos creados realmente "cuantificaban" la respuesta de células T, pero eran incapaces de mostrar efectos reales sobre la ontogenia de los linfocitos T (1989d).

Se obtuvieron extractos de timos de diferentes especies, edades y mediante diferentes procedimientos químicos. Estos extractos fueron evaluados como inductores de la maduración de los linfocitos T, así como su potencial terapéutico en caso de inmunodeficiencias en seres humanos y otras especies (Cardarelli, 1992d). Algunos de ellos rápidamente quedaron en el olvido, otros se están utilizando como armas terapéuticas en el caso de algunas inmunodeficiencias. Entre los primeros extractos descritos, podemos citar a: la

timofisina, el extracto tímico de Hanson, extracto tímico de Asher, y el extracto tímico de Bomkov. Estos extractos, por sus efectos, pudieron ser clasificados en dos grupos. Un grupo de extractos que acelera el crecimiento por mecanismos no conocidos; y un segundo grupo que afecta tumores (Trainin, *et al.*, 1985).

2.2.- Hormonas tímicas

En la actualidad han subsistido a las diversas pruebas algunas sustancias que se pueden considerar mensajeros químicos y que son secretadas por las células epiteliales del timo. En general se trata de péptidos de diversos tamaños, de los que se ha demostrado algún efecto biológico en órganos linfoides secundarios o "in vitro". Sin embargo, junto con las citocinas tímicas, constituyen el ambiente químico en el que se desarrolla el proceso de maduración y selección de los linfocitos T. Este ambiente químico se ha planteado que es generado por el epitelio tímico, aunque en el caso de las citocinas, algunas podrían ser producidas por los mismos linfocitos, lo cual no ha sido demostrado (Hadden, 1992). Entre las hormonas tímicas reconocidas podemos mencionar:

a) Timosina; un producto que se obtiene de la extracción con acetona, posterior a un tratamiento con calor a (80°C) del sobrenadante de un homogenado de timo de ternera. Después de la purificación por cromatografía de intercambio iónico y por filtración en gel se obtuvieron 11 polipéptidos en la región α y 4 en la región β ; de los cuales $\alpha 1$ y el polipéptido $\beta 1$ han sido caracterizados. Hay tres tipos de timosina la α -ácida con punto isoeléctrico menor de 5.5 (P.I. <5.5); la timosina β -timosina con punto isoeléctrico de 5.5-7 y básica γ -timosina con punto isoeléctrico mayor de 7.0 (P.I.>7). Ninguno de los productos ha sido purificado (Trainin, 1983). La fracción V de timosina es

conocida como tamalina, se trata de una mezcla de péptidos con peso molecular que varía de 1000 a 5000 Da. La timosina $\alpha 1$ aumenta la función del factor inhibitorio de la migración (MIF), así como de interferon γ y linfotoxina; además es capaz de proteger contra agentes oportunistas como la *Candida albicans*. Se ha descrito la existencia de una molécula precursora, la proT α que tiene una actividad biológica similar a la de timosina $\alpha 1$ (Trainin, 1992; Khystova et al., 1993). La tamalina es completamente diferente de timulina; no tiene secuencia homóloga con ningún factor tímico. La tamalina induce diferenciación en las células T (Khystova et al., 1993).

b) Timopoyetina, fue aislada de timo de bovino. Está compuesta de 49 aminoácidos con una secuencia conocida (Khystova et al., 1993). El principio activo de timopoyetina es un pentapéptido, denominado TP-5, que ha sido usado extensamente en la clínica en pacientes inmunocomprometidos, incluyendo a pacientes con SIDA e individuos viejos. El tratamiento con TP-5 en individuos viejos incrementa la actividad de las células NK en sangre periférica (Trainin, 1992).

c) Timoestimulina, fue preparada inicialmente de timo de ternera por extracción con acetato de amonio y posteriormente se purificó por métodos cromatográficos y fue llamada originalmente TP-1. Dos de los péptidos que han sido purificados son la fracción 6B, con peso molecular 5600 Da y la fracción 7B, la cual es similar a ubiquitina (Trainin et al., 1983).

d) El factor tímico sérico (FTS) o timulina, fue aislado de suero de cerdo, mediante técnicas de ultracentrifugación y ultrafiltración con corte en los 10,000 Da. Así como mediante cromatografía. Se trata de un nonapéptido neutro con la siguiente secuencia de aminoácidos: Glu-Ala-Lys-Ser-Glu-Gly-Gly-Ser-Asn, con

actividad sobre las células formadoras de colonias (Trainin *et al.*, 1983). Transformando a las células formadoras de colonias Thy1⁻ hacia Thy1⁺ y células sensibles a azathioprina. La timulina ha sido probado en la clínica en inmunodeficiencias humanas y artritis reumatoide (Trainin *et al.*, 1985).

2.3.- Factor tímico humoral

El factor tímico humoral (THF, por sus siglas en inglés), es una fracción soluble inmunológicamente activa, que fue aislada de timos de ternera, mediante técnicas de homogenización, centrifugación, diálisis, y cromatografía (Trainin y Linker-Israeli 1967; Zipori y Trainin 1975). El dializado activo fue purificado después por cromatografía en gel en columnas de Sephadex G-10 y G-25, y posteriormente por cromatografía de intercambio iónico y fase reversa de HPLC. El péptido tiene una masa molecular de 918 Da con un punto isoeléctrico 5.6-5.9. Su composición de aminoácidos es Leu-Glu-Asp-Gly-Pro-Lys-Phe-Leu, secuencia que no tiene homología con otros factores tímicos o citocinas descritos (Trainin *et al.*, 1983; Trainin y Linker-Israeli 1967). Desde mediados de los 80's se utilizó el THF- γ 2, el cual es un péptido sintético con la misma secuencia de aminoácidos y mismos efectos biológicos (Katorza *et al.*, 1987).

2.4.- Efectos biológico de THF- γ 2

Algunas de las células sobre las cuales se ha descrito que el THF- γ 2 tiene efectos biológicos, incluyen: células de médula ósea, linfocitos de cordón umbilical y linfocitos de bazo. En la médula ósea el THF- γ 2 potencia el efecto del factor estimulante de colonias sobre la proliferación de las células formadoras de colonias de granulocitos y macrófagos (Pechter *et al.*, 1993). En los linfocitos de cordón umbilical el THF- γ 2 produce un incremento en el porcentaje de células

CD4 y CD8, además de un incremento en la producción de interleucina-2 inducida con fitohemaglutinina (PHA) (Ben-Hur *et al.*, 1990). En los linfocitos del bazo, el THF- γ 2 produce un incremento en la producción de interleucina-2 inducida con Concanavalina A (Con-A) (Burstein *et al.*, 1988). El THF- γ 2 incrementó la respuesta de los linfocitos T incluyendo la proliferación ante lectinas (PHA y Con-A), la reacción de la mezcla de linfocitos, la producción de anticuerpos dependiente de células T (Ophir *et al.*, 1990 a); así como la actividad citolítica de los CTLs (Ophir *et al.*, 1990b).

La administración continua de THF- γ 2 a ratones timectomizados neonatalmente produce un incremento de la cantidad de linfocitos CD4⁺, Th1, en los bazos. Una sola administración de THF- γ 2 a un ratón viejo e inmunodeficiente produjo un incremento en la respuesta a agentes mitógenos, tanto de los timocitos, como de los esplenocitos. Asimismo, el THF- γ 2 produjo un incremento en la producción de interleucina-2 y en la actividad de los linfocitos T cooperadores (Goso *et al.*, 1992).

Se ha reportado que el THF- γ 2 es capaz de incrementar la actividad antiviral del sistema inmune. El primer reporte a este respecto muestra que la administración de THF- γ 2 a ratones disminuyó la mortalidad producida por el virus Sendai. Por otra parte, el THF- γ 2 es capaz de revertir la inmunosupresión inducida por el citomegalovirus murino (MCMV) restableciendo la respuesta proliferativa y la producción de IL-2 (Katorza *et al.*, 1987). En estudios *in vitro* con linfocitos periféricos de humano se ha observado que el THF- γ 2 es capaz de incrementar la proliferación ante el reto con un antígeno del virus de la varicela zoster (Trainin *et al.*, 1979). El THF- γ 2, *in vivo* fue capaz de restablecer la

inmunidad celular en pacientes inmunodeficientes que sufrían panencefalitis esclerosante subaguda (Handzel *et al.*, 1983).

Por otro lado, en pacientes con infecciones severas con el virus del herpes, incluyendo herpes zoster y varicela, la administración de THF- γ 2 produjo una regresión del cuadro e incremento de las subpoblaciones de linfocitos T (Handzel *et al.*, 1990). De la misma manera, en niños con sarampión grave y complicado, el THF- γ 2 produjo un incremento en la tasa de linfocitos CD4/CD8, así como un incremento de la respuesta proliferativa a PHA (Beatty *et al.*, 1984). En pacientes seropositivos al VIH, los cuales mostraban disminución de los linfocitos CD4, la administración de THF- γ 2 produjo un incremento de los linfocitos T CD4+ (Handzel *et al.*, 1987).

Recientemente el THF- γ 2 se utilizó en 9 pacientes con hepatitis B crónica, quienes habían recibido anteriormente interferon- α (IFN- α) recombinante sin efecto alguno. En estos pacientes, se dió un pretratamiento con THF- γ 2, seguido por una combinación de THF- γ 2 e IFN- α y finalmente el IFN solo. La terapia combinada produjo una disminución en los niveles séricos del ADN viral de aproximadamente el 90 % y 3 pacientes se volvieron ADN-HVB negativos. Estos resultados sugieren que el THF- γ 2 puede ser útil en tratamientos combinados contra portadores de hepatitis viral B aguda y/o de hepatitis crónica, y que tal vez sea capaz de evitar el desarrollo de cirrosis hepática en estos pacientes (Farhat *et al.*, 1995).

Los efectos *in vitro* e *in vivo* del THF- γ 2 muestran en suma que es capaz de actuar como un inmunoestimulador y que presenta gran potencial como herramienta terapéutica (Handzel *et al.*, 1992; Handzel *et al.*, 1987). Sin

embargo, no muestran que este factor sea capaz de modular la linfopoyesis T en el timo ya que no hay evidencias reportadas de lo anterior. Se consideró entonces importante investigar si el THF- γ 2 era capaz de modular la maduración intratímica de los linfocitos T. Siendo esta una pregunta capital, pues de ser así podría apoyar o descartar la hipótesis de su papel como hormona tímica que participaría en la modulación de la maduración de los linfocitos T en el timo. Siendo de gran importancia investigar si el THF- γ 2 tiene efectos sobre la maduración de los linfocitos T en el timo.

3.- OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto del factor tímico humoral (THF- γ 2), en el proceso de diferenciación de *in vitro* linfocitos T.

Como objetivos particulares:

- 1.- Establecer un cultivo de timocitos de rata recién nacida como modelo para el estudio del efecto del THF- γ 2 .
- 2.- Estudiar si THF- γ 2 *in vitro* es capaz de modificar la expresión de las moléculas de superficie CD4 y CD8 en timocitos de rata recién nacida.
- 3.- Estudiar si THF- γ 2 *in vitro* es capaz de modificar la relación entre las subpoblaciones de timocitos que expresan las moléculas de superficie CD4 y CD8 en timocitos de rata recién nacida.
- 4.- Estudiar si THF- γ 2 *in vitro* es capaz de modificar la proliferación de los timocitos de rata recién nacida.

4.- MATERIALES Y METODOS

4.1.- Reactivos:

Etanol, EDTA, formaldehído, albumina, glucosa, glutamina, ampicilina, cloruro de sodio, cloruro de potasio, hidróxido de sodio, fosfato de sodio monobásico, fosfato de potasio monobásico, concanavalina A, yoduro de propidio, β 2-mercaptoetanol (Sigma Chemicals Co, St. Louis Mo.); RPMI-1640, suero fetal de ternera (Gibco, Laboratorios, NY); triton-X100 (T.J. Baker, México); gentamicina (Promeco); interleucina-2 recombinante de rata (Genzyme); 7-amino-actinomicina D (Calbiochem, la Joya CA), anticuerpos ratón anti-rata contra CD4 conjugado con FITC, contra CD8 conjugado con R-PE, anticuerpo ratón anti-rata IgG1 conjugado con FITC y anti-rata IgG2 con R-PE (Serotec, Oxford); [3 H]-timidina (Amersham), THF- γ 2 y un péptido análogo fueron donados los Drs. Trainin, y Burstein del Departamento de Química Orgánica del Instituto de Ciencias Weizmann, Rehovot, Israel.

4.2.- Péptidos

El factor tímico humoral (THF- γ 2) y el péptido análogo (PA), utilizados en este estudio fueron sintetizados por técnicas de fase sólida y purificados por fase reversa de HPLC (Trainin, 1985). El péptido análogo es un octapéptido de 918 Da, compuesto por los mismos aminoácidos que el THF pero en diferente secuencia. La secuencia del PA es la siguiente: Leu-Glu-Pro-Asp-Gly-Phe-Lys-Leu (Trainin, comunicación personal). Los péptidos fueron resuspendidos en PBS.

4.3.- Animales

Ratas Wistar recién nacidas (de menos de 24 h), de ambos sexos, fueron obtenidos del Bioterio del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, México, D. F.

4.4.- Métodos:

4.4.1.- Obtención de timocitos

Los timos se obtuvieron por apertura de la cavidad torácica, previa crioanestesia y asepsia del tórax con etanol al 80 % (Ming *et al.*, 1992). Se lavaron con PBS; los lóbulos fueron disociados, haciendo pasar el tejido a través de una malla metálica de 100 mm², la cual se lavó con PBS. La suspensión celular obtenida se centrifugó (1000 rpm por 10 min a 4°C) para obtener las células y resuspenderlas en PBS. Las células fueron lavadas 2 veces repitiendo el proceso anterior. Se cuantificó la viabilidad de los timocitos aislados mediante la técnica de azul de tripan: La viabilidad de las células obtenidas por el procedimiento descrito fue mayor del 98%.

4.4.2.- Caracterización de la expresión de los antígenos CD4 y CD8 mediante citometría de flujo

Los timocitos (5×10^5 células) se resuspendieron en un amortiguador de fosfatos suplementado con glucosa (PGN); se les añadieron los anticuerpos contra CD4, el cual estaba conjugado con FITC, y los anticuerpos anti-CD8, los cuales estaban conjugados con R-PE. La dilución a que se utilizaron los anticuerpos fue de 1:50 de cada uno de estos respectivamente. Esta mezcla se

incubó durante 1 h a 4°C en la oscuridad. Posteriormente, los timocitos fueron lavados dos veces con 1 ml de un amortiguador de fosfatos, adicionado con glucosa y albumina (PGB), y se centrifugaron a 1000 rpm por 10 min a 4°C. Finalmente se resuspendieron en PGN y se fijaron agregando formaldehído en amortiguador de fosfatos hasta una concentración final de 0.2 %. Las células se conservaron a 4°C protegidas de la luz, hasta su análisis en el citómetro (Ming *et al.*, 1992).

Para el análisis citofluorométrico se utilizó un citómetro de flujo Becton Dickinson, modelo FACSort. Este aparato está equipado con un laser de argón que emite a 488nm de longitud de onda. Se usó el programa denominado Lysis II para el análisis de los datos. Se hizo un estudio simultáneo de dos colores de fluorescencia, verde (518nm) y amarillo-naranja (560nm), además de los parámetros de tamaño (FSC) y granularidad (SSC) en base a los cuales se seleccionó la población de timocitos; lo cual hace un total de 4 parámetros. En cada muestra se analizaron un mínimo de 10,000 eventos. Para cada grupo de muestras se ajustó las condiciones de voltaje de los fotomultiplicadores y los amplificadores en base a: autofluorescencia de las células, unión no específica, para lo cual se utilizaron anticuerpos monoclonales contra IgG1:FITC y contra IgG2:RPE. Para la compensación de los colores se utilizaron células a las que se añadieron solo los anticuerpos conjugados con un fluorocromo (FITC) y por separado, células incubadas con los anticuerpos conjugados con el otro fluorocromo (RPE) (Shimid I *et al.*, 1994; Swat *et al.*, 1991).

4.4.3.- Análisis del contenido de ADN y del ciclo celular mediante citometría de flujo

Se utilizó un método de cuantificación de ADN y análisis del ciclo celular basado en la obtención de los núcleos celulares mediante una técnica basada

en la digestión mediante detergente y proteólisis (Darzinewikz *et al.*, 1995), además de utilizar al yoduro de propidio como un fluorocromo con afinidad por el ADN.

Una alícuota de las células cosechadas (10^6 cel.) fue lavada dos veces con PBS; la pastilla celular fue resuspendida en 200 μ l e incubadas durante 10 min. a temperatura ambiente, en una solución de tripsina (30 μ g/ml en amortiguador de espermina); posteriormente se agregaron 160 μ l de una solución de inhibidor de tripsina de frijol de soya (277 μ g/ml) y RNAsa A (55 μ g/ml) en el amortiguador de espermina; las células se incubaron 10 min. a temperatura ambiente. Finalmente, se añadió una solución de yoduro de propidio (150 μ g/ml) y se incubaron a 4°C en la oscuridad, durante 10 min. La muestra se conservó a 4°C hasta su análisis en el mismo día.

Para cada grupo de muestras se ajustaron las condiciones de voltaje de los fotomultiplicadores y los amplificadores para los parámetros de intensidad de FL2 (560 nm), duración del destello de fluorescencia (FL2w) y el área bajo la curva de FL2/FL2w (FL2A). Para el ajuste anterior se utilizaron núcleos de timocitos de ternera y/o de eritrocitos de pollo. Se analizaron un mínimo de 10,000 eventos por muestra. Se realizaron los histogramas de FL2A y los porcentajes de células en las fases de G₀/G₁, S y G₂+M se calcularon utilizando el modelo matemático de RFIT (Becton Dickinson), (Doyon *et al.*, 1994). Se usó el programa denominado CellFit para el análisis de los datos.

4.4.4.- Análisis de apoptosis por citometría de flujo

Se utilizó un método basado en la afinidad del colorante por el ADN, así como la capacidad de la membrana celular de excluirlo. El método para medir

apoptosis con el colorante 7-amino actinomicina (7AAD), se validó en nuestro laboratorio, como se ha sugerido, mediante el análisis del ADN en geles de agarosa de muestras paralelas a las analizadas mediante citometría.

Una alícuota de células (5×10^5 cel.) se incubó en una solución de 7AAD (10 $\mu\text{g/ml}$) en PBS más formaldehído al 0.2 %, durante 30 min a 4°C, protegidas de la luz.

Para cada grupo de muestras se ajustaron las condiciones de voltaje de los fotomultiplicadores y los amplificadores para los parámetros de intensidad de FL3 (640 nm), tamaño y granularidad (FSC y SSC, respectivamente). La población de timocitos se seleccionó en base a los parámetros de FSSC y SSC. La población de timocitos desarrollando apoptosis se identificó en una gráfica de FSC/FL3. Para la identificación de esta población se incluyó el análisis de una muestra de timocitos tratada con cortisona (10 $\mu\text{g/ml}$) (cel. apoptóticas), otra con azida de sodio (0.4 %) (cel. necróticas) y otra sin ningún tratamiento (cel. vivas y sanas). Se identificó por comparación la región de células apoptóticas (células con menor tamaño (FSC) y que captan una intensidad intermedia de 7AAD (mayor que las células vivas y sanas y menor que las células en necrosis). Para cada muestra se analizó un mínimo de 10,000 eventos y se cuantificó el porcentaje de células de cada muestra en esta región. (Schimid *et al.*, 1994; Swat *et al.*, 1991). Se usó el programa denominado Lysis II para el análisis de los datos

4.4.5.- Cultivo de timocitos

Las células fueron cultivadas en placas de 24 pozos (Costar), en las siguientes condiciones: 1.5×10^6 células se cultivaron en un ml de medio RPMI

suplementado con 10% de suero fetal de ternera, 4 mM de glutamina, 10 µg/ml de gentamicina, ampicilina y 50 µM de β-2 mercaptoetanol (2-ME); a 37°C y en una atmósfera de 5 % de CO₂ y 95% de aire durante diferentes tiempos. Al finalizar el cultivo, las células se cosecharon con una pipeta Pasteur, el pozo se lavó con un ml de PBS. La suspensión celular se centrifugó durante 10 min. a 10,000 rpm. Se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en PBS (Takimoto 1992). Posteriormente se utilizaron para analizar la expresión de antígenos CD4 y CD8, cuantificar las células que expresan los antígenos anteriores, cuantificar las células en apoptosis, así como el análisis del ciclo celular de los timocitos.

4.4.6.- Ensayo de proliferación celular

Para cuantificar la proliferación celular se utilizó el método de la incorporación de [³H]-timidina. Al cultivo celular se adicionaron 0.5 µCi/ml de [³H]-timidina, en las últimas 24 h de cultivo. Una vez transcurrido el tiempo de cultivo las células fueron cosechadas, el plato se lavó con 1 ml de PBS, las células se centrifugaron a 170 g (10,000 rpm) por 10 min; se desechó el sobrenadante, la pastilla celular fue digerida por la adición de 50 µl de NaOH 1N y 50 µl de Tritón X-100 al 1%. Se colocaron en viales y se les agregaron 5 ml de líquido de centelleo, para ser analizadas posteriormente en un contador de centelleo (marca Pakard). Los resultados se estandarizaron como el porcentaje de estimulación que se calculó de la siguiente manera:

$$\% \text{ de estimulación} = \left(\frac{\text{CPM en el grupo tratado} \times 100}{\text{CPM en el grupo control}} \right) - 100$$

4.4.7.- Tratamiento con fitohemaglutinina (PHA)

Las células se cultivaron en las condiciones descritas. Una hora después de la siembra se les añadió la PHA. Se realizó un curso temporal de 24, 48 y 72 h, utilizando concentraciones de fitohemaglutinina desde 1 µg/ml hasta 100 µg/ml, en una dosis única. El efecto mitogénico se cuantificó por el método de incorporación de [³H]-timidina, como ensayo de proliferación celular. Los resultados se estandarizaron como el porcentaje de estimulación que se calculó como es descrito en el párrafo anterior.

4.4.8.- Tratamiento con Concanavalina A (Con-A)

Las células se cultivaron en las condiciones descritas. Una hora después de la siembra se les añadió la Con-A. Se realizó un curso temporal de 24, 48 y 72 h, utilizando concentraciones de concanavalina A de 1 µg/ml a 100 µg/ml, en una dosis única. El efecto mitogénico se cuantificó por el método de incorporación de [³H]-timidina, como ensayo de proliferación celular. Los resultados se estandarizaron como el porcentaje de estimulación que se calculó como es descrito anteriormente.

4.4.9.- Estimulación con THF-γ2

Las células se cultivaron en las condiciones descritas. Una hora después de la siembra se les añadió el THF-γ2. Se realizó un curso temporal de 24, 48 y 72 h, utilizando concentraciones de factor tímico humoral de 10⁻¹²M a 10⁻⁶M, en una dosis única. El efecto mitogénico se cuantificó por el método de incorporación de [³H]-timidina, como ensayo de proliferación celular.

4.4.10.- Estimulación con Con A y THF- γ 2

Las células se cultivaron en las condiciones descritas. Una hora después de la siembra se añadieron 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Con A y el THF- γ 2. Se realizó un curso temporal de 24, 48 y 72 h, utilizando concentraciones de factor tímico humoral de 10^{-12}M a 10^{-6}M , en una dosis única. El efecto mitogénico se cuantificó por el método de incorporación de [^3H]-timidina, como ensayo de proliferación celular.

4.4.11.- Estimulación con Con-A y PA

Las células se cultivaron en las condiciones descritas. Una hora después de la siembra se les añadieron 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Con-A y el PA. Se realizó un curso temporal de 24, 48 y 72 h, utilizando concentraciones del péptido análogo de 10^{-12}M a 10^{-6}M , en una dosis única. El efecto mitogénico se cuantificó por el método de incorporación de [^3H]-timidina, como ensayo de proliferación celular, los ensayos de expresión de los correceptores CD4 y CD8 se investigaron mediante citometría de flujo.

4.4.12.- Análisis estadístico

Se realizó un análisis de varianza ANOVA, para cada uno de los grupos, así como una prueba de "t" de Student, utilizando el programa STATA.

5.- RESULTADOS

5.1.-Caracterización de la población de timocitos de ratas recién nacidas

La población de timocitos de rata recién nacida (menos de 24 h), no había sido caracterizada previamente, por lo que en este trabajo se les identificó, en base a la expresión de antígenos CD4 y CD8, su ciclo celular y la cantidad de células que está desarrollando apoptosis. En la tabla 1 se muestran las cuatro subpoblaciones de timocitos, en base a la expresión de CD4 y CD8. Los timocitos se obtuvieron de ratas de menos de 24 horas de nacidas e inmediatamente se procedió a la caracterización de los mismos.

TABLA 1.- Análisis del fenotipo de la población de timocitos de rata recién nacida

| Porcentaje de células* | | | |
|---|---|--|---|
| DN (CD8 ⁻ CD4 ⁻) | DP (CD8 ⁻ CD4 ⁺) | CD4 (CD4 ⁺ CD8 ⁻) | CD8(CD8 ⁺ CD4 ⁻) |
| 3,4±0,4 | 76,8±4,08 | 11,9±1,98 | 5,8±0,14 |

*5 x 10⁵ células fueron incubadas con anti-CD4:FITC y anti-CD8:RPE y evaluadas por citometría de flujo de dos colores. Los datos expresan la media de tres ensayos por duplicado ± la desviación estándar.

En la tabla 2 se muestra la población de timocitos de rata recién nacida, en cada fase del ciclo celular. La población celular que estaba en apoptosis fue del 2.4 % en estos animales.

TABLA 2.- Análisis del contenido de DNA y ciclo celular de timocitos de rata recién nacida.

| Porcentaje de células* | | |
|------------------------|---------|-----------|
| G0/G1 | S | G2/M |
| 36,6±0,23 | 49±0,86 | 14,4±3,76 |

*5x10⁵ células fueron teñidas con yoduro de propidio y analizadas por citometría de flujo. Se analizó el histograma del área de F12 mediante el método matemático RFIT. Los datos se expresan como la media de tres ensayos por duplicado ± la desviación estándar.

5.2.- Cultivo de timocitos

Se procedió a establecer las condiciones óptimas para cultivo de timocitos. En la literatura se reporta la necesidad de utilizar IL-2 en cultivos de linfocitos T maduros; En este trabajo, tratando de evitar los efectos de esta citocina, se cultivaron los timocitos en suspensión en medio RPMI suplementado con 10 % de SBF, 50 μ M de mercaptoetanol, 4 mM de glutamina y antibióticos. Los cultivos se realizaron durante diferentes tiempos (4, 8, 12, 18, 24, 48, 72, 96 h.). Se cosecharon las células y se cuantificó la viabilidad celular por el método de azul de tripano. En la fig. 6 se muestran los resultados a los diferentes tiempos.

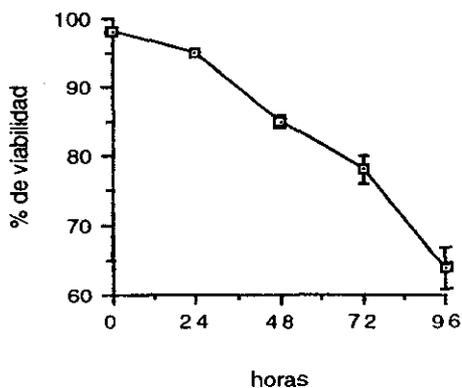


Figura 6.- Efecto del cultivo de timocitos sobre su viabilidad celular. Se utilizó el método de azul de tripan para cuantificar la viabilidad. Los valores representan el promedio de cuatro ensayos diferentes por triplicado \pm la desviación estándar.

Se consideró que los resultados de viabilidad celular eran "adecuados" a las 24 h. de cultivo, sin embargo, se decidió cuantificar la apoptosis "espontánea" en estas células, después de 24 h de cultivo en suspensión; se utilizó la citometría de flujo con el colorante 7-AAD. Se observó que la población de células en apoptosis fue de $4.2\% \pm 0.8$.

Posterior a esto se caracterizó entonces la población de timocitos de rata recién nacida después de 24 h de cultivo en suspensión, en base a su fenotipo y distribución en el ciclo celular. En la tabla 3 se muestra el efecto del cultivo en suspensión sobre el fenotipo de los timocitos de rata recién nacida. Se observa un incremento de la población de dobles positivos, y una disminución en las 3 poblaciones restantes, las cuales disminuyeron aproximadamente a la mitad de la población original.

TABLA 3.- Efecto del cultivo durante 24 h en medio suplementado, sobre el fenotipo de timocitos de rata recién nacida.

| | Porcentaje de células * | | | |
|---------------------|-------------------------|-----------------|-----------------|----------------|
| | DN | DP | CD4 | CD8 |
| RECIEN OBTENIDAS | 3.4 ± 0.4 | 76.8 ± 4.08 | 11.9 ± 1.98 | 5.8 ± 0.14 |
| CULTIVO | 1.3 ± 0.4 | 90.3 ± 4.08 | 5.7 ± 0.40 | 2.5 ± 0.24 |

* 5×10^5 células se incubaron con anticuerpos anti-CD4:FITC y anti-CD8:RPE y analizadas por citometría de flujo de dos colores. Los datos expresan la media de tres ensayos diferentes por duplicado \pm la desviación estándar.

Así mismo en la tabla 4 se muestra el efecto del cultivo sobre el contenido de ADN y la distribución en el ciclo celular de los timocitos. Se observa una gran disminución de la población de células en la fase de síntesis lo que se reduce a una tercera parte de la población *in vivo*. Posteriormente se produce un incremento proporcional de los timocitos en la fase G1 del ciclo celular.

Con los resultados anteriores se decidió que, a pesar de los cambios en el fenotipo celular y la disminución de la proliferación celular, las condiciones de cultivo eran adecuadas para el estudio y que un tiempo de 24 h de tratamiento con el THF- γ 2 eran suficientes para investigar sus efectos sobre la diferenciación y proliferación de los timocitos, *in vitro*. Ello se debe a que realmente no sabemos si los cambios en su totalidad se deban a las condiciones *in vitro*, o bien sean parte del proceso natural que ocurre durante el desarrollo del órgano.

TABLA 4.- Efecto del cultivo durante 24 h en medio suplementado sobre la distribución en las fases del ciclo celular de timocitos de rata recién nacida.

| | Porcentaje de células * | | |
|---------------------|-------------------------|-----------------|-----------------|
| | G0/G1 | S | G2/M |
| RECIEN OBTENIDAS | 36,6 \pm 0,23 | 49 \pm 0,86 | 14,4 \pm 3,76 |
| CULTIVO | 66.7 \pm 0.23 | 17.2 \pm 0,86 | 16,4 \pm 3,76 |

*Los timocitos fueron cultivados por 24 h con medio RPMI suplementado, a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de aire. 5 x 10⁵ células fueron teñidas con yoduro de propidio y evaluadas por citometría de flujo. Los histogramas del área de FL2A se analizaron por el método RFIT. Los valores representan la media de tres ensayos diferentes por duplicado \pm la desviación estándar.

5.3.- Efecto, *in vitro*, del THF- γ 2 sobre el fenotipo de los timocitos de rata

Habiendo establecido el modelo *in vitro*, se procedió a investigar si el THF- γ 2 era capaz de modificar el fenotipo de los timocitos. El fenotipo se caracterizó en base a la expresión de los antígenos CD4 y CD8. Se realizó una curva dosis-respuesta del efecto del péptido sobre el fenotipo de los timocitos. Asimismo, se realizó un curso temporal, sin obtener efecto alguno del factor sobre el fenotipo de los timocitos. En la tabla 5, se muestra el efecto del THF- γ 2 sobre el fenotipo de los timocitos. Las células se incubaron durante 24 h en presencia o ausencia del péptido.

TABLA 5.- Ensayo dosis-respuesta del efecto, *in vitro*, del THF- γ 2 sobre el fenotipo de timocitos de rata recién nacida.

| THF- γ 2 (M) | Porcentaje de células* | | | |
|---------------------|------------------------|------------------|----------------|-----------------|
| | DN | DP | CD4 | CD8 |
| (Control) 0 | 2.35 \pm 0.15 | 88.73 \pm 2.21 | 5.75 \pm 0.6 | 2.51 \pm 0.17 |
| 10 ⁻¹⁰ | 2.92 \pm 0.35 | 87.32 \pm 4.61 | 5.55 \pm 0.9 | 2.46 \pm 0.46 |
| 10 ⁻⁹ | 2.40 \pm 0.11 | 88.33 \pm 2.21 | 5.34 \pm 0.4 | 2.51 \pm 0.34 |
| 10 ⁻⁸ | 2.82 \pm 0.07 | 86.63 \pm 3.21 | 5.49 \pm 0.6 | 2.82 \pm 0.7 |
| 10 ⁻⁷ | 2.51 \pm 0.12 | 87.03 \pm 2.71 | 5.56 \pm 0.8 | 2.40 \pm 0.19 |
| 10 ⁻⁶ | 2.46 \pm 0.50 | 86.22 \pm 1.25 | 4.67 \pm 1.2 | 2.49 \pm 0.11 |

Los timocitos fueron cultivados por 24 h en medio RPMI suplementado, a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de aire. La fenotipificación en base a los antígenos CD4 y CD8 se realizó por citometría de flujo de dos colores. Los valores representan la media de 3 experimentos diferentes por duplicado \pm la desviación estándar.

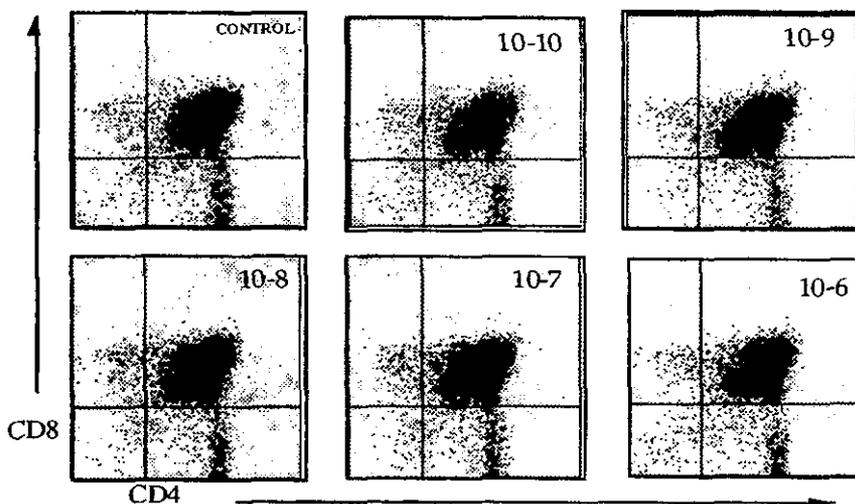


Figura 7.- Efecto, *in vitro*, de THF- γ 2, sobre el fenotipo de timocitos de rata recién nacida, realizando un ensayo dosis-respuesta. La figura muestra un ensayo representativo, las diferentes concentraciones se muestra en el ángulo superior derecho de cada cuadro. Los timocitos fueron cultivados por 24 h con medio RPMI suplementado, a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de aire. La figura muestra un ensayo representativo.

5.4.- Efecto, *in vitro*, del THF- γ 2 sobre el fenotipo de los timocitos de rata coestimuladas con un agente mitógeno

Evidencias experimentales reportadas, principalmente, por el grupo de Trainin (1985,1992,1995) sugieren que el THF- γ 2 actúa sobre linfocitos maduros estimulados y que el THF- γ 2 potencia el efecto en ambos tanto la proliferación celular, como en la producción de citocinas inducida por las lectinas. Por tal razón, se decidió estimular a los timocitos con algún agente mitogénico y simultáneamente exponer las células al THF- γ 2. No se sabía si los anticuerpos policlonales contra CD4 y CD8 podrían ejercer su efecto sobre los linfocitos T inmaduros o si eran capaces de modificar el proceso de maduración éstos.

Se consideró que el agente ideal para la inducción de la proliferación celular era la IL-7, pero al no existir comercialmente esta citocina para rata, se decidió investigar si las lectinas (comerciales como PHA y Con-A) eran capaces de estimular la proliferación en las células inmaduras como lo hacen en los linfocitos maduros. Sin embargo 1.- en la literatura no hay reportes del uso de Con-A y PHA en timocitos: 2.- Las dosis que han sido reportadas (Nakayama y Nakuchi 1992) para estas lectinas han sido obtenidas de ensayos en linfocitos de sangre periférica; y 3.- dichas dosis no produjeron respuesta mitogénica en los timocitos; por tanto se realizó una curva dosis respuesta, para cada uno de estos agentes mitogénicos: PHA y Con-A, con la finalidad de encontrar la concentración adecuada para nuestro estudio. Realizamos además, un curso temporal del efecto de estos agentes sobre la proliferación celular de los timocitos.

5.4.1 Fitohemaglutinina (PHA)

Se llevó a cabo un ensayo dosis-respuesta del efecto de PHA sobre la proliferación celular de timocitos de rata recién nacida. Las concentraciones estudiadas fueron de 1,10,20, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$. De manera similar se realizó además un curso temporal de 24 a 72 h del efecto de PHA sobre la mitosis de timocitos en cultivo (ver anexos). Los resultados, como se puede observar en la fig. 8, muestran que la PHA no induce un estímulo mitogénico a las 24 h. Así mismo el incremento más significativo fue menor del 50 % a las 48 h de exposición de las células al agente (ver Anexos).

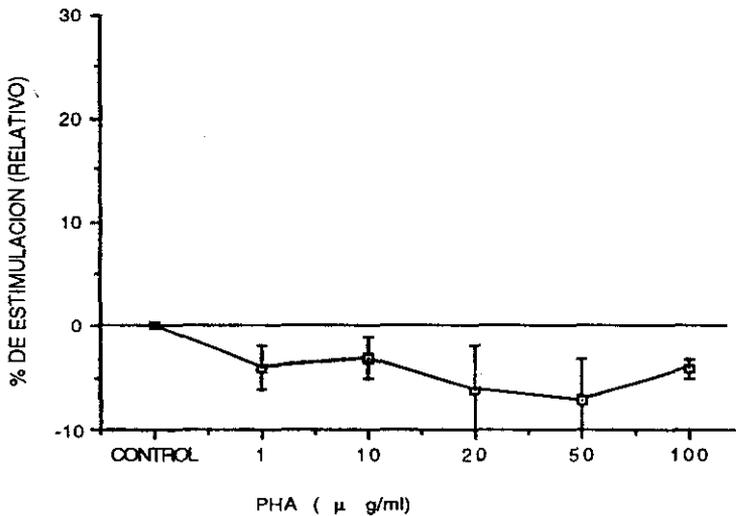


Figura 8.- Curva dosis-respuesta del efecto de PHA sobre la proliferación de timocitos de rata recién nacida. Los timocitos fueron cultivados por 24 h en medio RPMI suplementado, a 37°C, 5% de CO_2 y 95% de aire en presencia de 0.5 $\mu\text{Ci/ml}$ de ^3H -timidina. Las células se cosecharon 24 h después, se digirieron con NaOH y trítón- X100, se les añadió líquido de centelleo y fueron analizadas en un contador de centelleo. Los valores representan la media de 3 experimentos por duplicado \pm la desviación estándar.

5.4.2.- Con-A

Se realizó una curva dosis respuesta del efecto de Con-A sobre la proliferación celular de los timocitos de rata recién nacida. Las concentraciones de Con-A estudiadas fueron: 1, 10, 20, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$. Realizamos además, un curso temporal de 24 a 72 h del efecto de Con-A sobre la mitosis de timocitos en cultivo (ver anexos). Los resultados, como se puede observar en la fig. 9, muestran que esta lectina estimuló significativamente la proliferación celular de manera dosis dependiente. A la concentración de 100 $\mu\text{g/ml}$ se obtuvo el mayor efecto, y éste fue cercano al 100% de estimulación sobre el basal. Este efecto se obtuvo a las 24 h de cultivo.

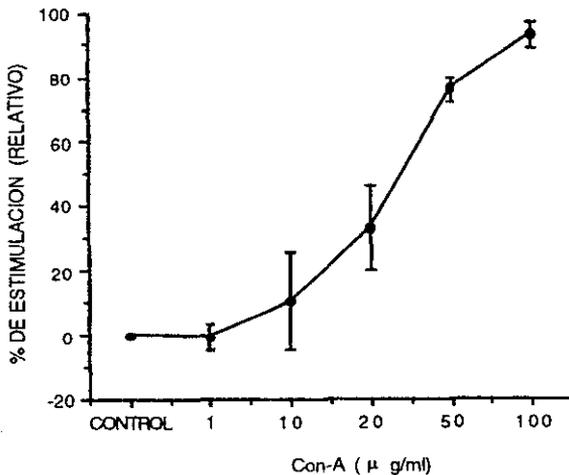


Figura 9.- Curva dosis-respuesta del efecto de Con-A sobre la proliferación de timocitos de rata recién nacida. Los timocitos fueron cultivados por 24 h con medio RPMI suplementado, a 37°C, 5% de CO_2 y 95% de aire en presencia de 0.5 $\mu\text{Ci/ml}$ de [^3H]-tímidina. Las células se cosecharon 24 h después, se digirieron con NaOH y tritón- X100, se les añadió líquido de centelleo y fueron analizadas en un contador de centelleo. Los valores representan la media de 3 experimentos por duplicado \pm la desviación estándar.

En base a los resultados obtenidos con las dos lectinas, adonde se observó que la Con-A se producía un efecto estimulador mayor y en menor tiempo, se decidió utilizar como agente mitogénico en los siguientes ensayos. De tal manera se decidió usar a este agente a la concentración submáxima de 50 µg/ml.

5.5.- Efecto de la Con-A sobre el fenotipo de los timocitos de rata recién nacida

Se investigó la influencia de la Con-A sobre el fenotipo de los timocitos de rata recién nacida ya que en los experimentos siguientes esta población sería nuestro control, y se debía determinar si el THF- γ 2 tiene efectos "propios" o sólo modula los efectos de la Con-A. En la tabla 6 se muestra el efecto de la Con-A sobre el fenotipo de los timocitos de rata recién nacida. Se observó una disminución de la población de dobles positivos, y un incremento en las 3 poblaciones restantes, las cuales aumentaron aproximadamente al doble de la población original. El efecto de la Con-A hace que esta población se asemeje a la población de timocitos recién obtenida del timo.

TABLA 6.- Efecto de la Con-A sobre el fenotipo de timocitos de rata recién nacida.

| | Porcentaje de células * | | | |
|---------|-------------------------|----------|----------|---------|
| | DN | DP | CD4 | CD8 |
| CONTROL | 1.3±0.4 | 90.3±4.0 | 5.7±0.4 | 2.5±0.2 |
| Con-A | 3.8±1.9 | 81.2±6.2 | 11.2±3.2 | 4.6±0.4 |

*Los timocitos fueron cultivados en presencia y ausencia de 50 µg/ml de Con-A durante 24 h. Las células fueron cosechadas y 5×10^5 células fueron incubadas con anti-CD4:FITC y anti-CD8:RPE y evaluadas por citometría de flujo de dos colores. Los datos expresan la media de tres ensayos por duplicado \pm la desviación estándar.

5.6.- Efecto de THF- γ 2 sobre el fenotipo de timocitos de rata recién nacida coestimulados con Con-A

Para estudiar el efecto del THF- γ 2 sobre el fenotipo de timocitos estimulados con Con-A (50 μ g/ml) se realizó una curva dosis respuesta de 10^{-12} a 10^{-6} M. El fenotipo se caracterizó en base a la expresión de los antígenos CD4 y CD8. En la tabla 7, se muestra esta curva dosis-respuesta. Como se puede observar, en las dosis menores el factor no modifica el fenotipo de las células; posteriormente incrementa la población con fenotipo CD4 y disminuye la población doble positiva. El efecto máximo se presenta a la concentración de 10^{-10} M; mientras que en las dosis mayores se mantiene una meseta y después disminuye.

TABLA 7.- Curva dosis-respuesta del efecto, *in vitro*, del THF- γ 2 sobre el fenotipo de timocitos de rata recién nacida, en células estimuladas con Con-A 50 μ g/ml.

| THF- γ 2 (M) | Porcentaje de células* | | | |
|---------------------|------------------------|---------------------|--------------------|------------------|
| | DN | DP | CD4 | CD8 |
| (Control) 0 | 3.89 \pm 1.63 | 81.20 \pm 6.28 | 11.27 \pm 3.2 | 4.60 \pm 0.4 |
| 10^{-12} | 2.25 \pm 0.22 | 82.82 \pm 0.94 | 10.77 \pm 0.5 | 4.15 \pm 0.9 |
| 10^{-11} | 4.44 \pm 1.45 | 75.66 \pm 4.03 | 12.30 \pm 2.3 | 7.60 \pm 0.2** |
| 10^{-10} | 6.20 \pm 3.14* | 67.47 \pm 5.74*** | 21.58 \pm 4.5*** | 5.16 \pm 1.4 |
| 10^{-9} | 6.37 \pm 3.46* | 69.72 \pm 7.17*** | 17.88 \pm 5.0** | 5.89 \pm 1.5 |
| 10^{-8} | 5.38 \pm 2.71 | 72.62 \pm 4.59*** | 16.37 \pm 3.7** | 5.57 \pm 0.8* |
| 10^{-7} | 5.12 \pm 2.66* | 66.39 \pm 5.0* | 13.51 \pm 3.3 | 5.55 \pm 1.2* |
| 10^{-6} | 4.62 \pm 3.02 | 77.10 \pm 6.08 | 12.83 \pm 3.4 | 5.14 \pm 1.0 |

*Los timocitos fueron cultivados por 24 h con medio RPMI suplementado, a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de aire, en presencia de 50 μ g/ml de Con-A y diferentes concentraciones del THF- γ 2. La fenotipificación en base a los antígenos CD4 y CD8 se realizó por citometría de flujo de dos colores. Los valores representan la media de 3 experimentos por duplicado; \pm la desviación estándar. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001.

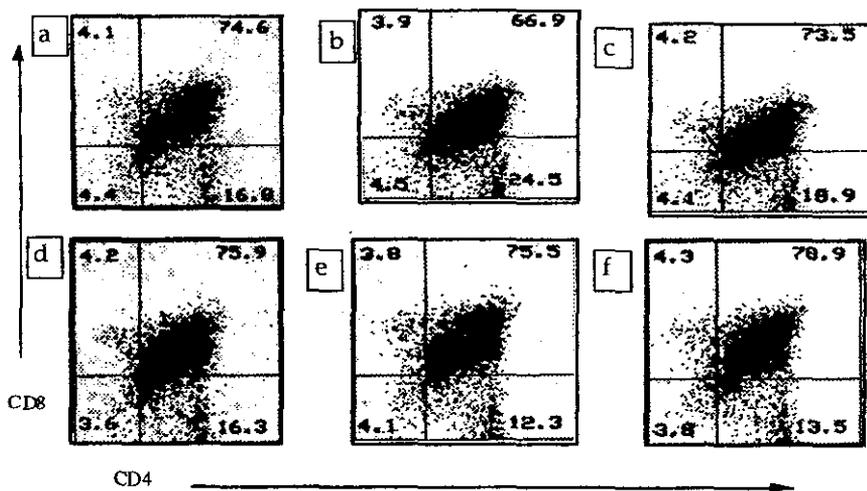


Figura 11.- Efecto de THF- γ 2, en la expresión de antígenos CD4 y CD8 en células coestimuladas con Con-A (50 μ g/ml) y THF- γ 2 simultáneamente . Los timocitos fueron mantenidos en cultivo a 37°C, 5% de CO₂ y 95% de aire. Marcados para citometría de flujo por tinción directa, Efecto dosis dependiente de THF- γ 2 a) control Con-A (50 μ g/ml) b) THF- γ 2 10⁻¹⁰ M c) THF- γ 2 10⁻⁹, d) THF- γ 2 10⁻⁸, e) THF- γ 2 10⁻⁷, f) THF- γ 2 10⁻⁶.

5.7.- Efecto de THF- γ 2 sobre la expresión de los correceptores CD4 y CD8 por timocitos de rata recién nacida coestimulados con Con-A

Con la finalidad de investigar si el efecto del THF- γ 2 sobre el fenotipo de los timocitos se debía a una modificación en la expresión de los antígenos o a la proliferación de algunas de las poblaciones de células, se decidió investigar el efecto del THF- γ 2 sobre la expresión de los correceptores CD4 y CD8 por los timocitos de rata recién nacida coestimulados con Con-A.

La expresión de los antígenos CD4 y CD8 por los timocitos se estudió mediante citometría de flujo monocromática. Se analizaron los histogramas de intensidad de fluorescencia de verde (CD4:FITC) y amarillo -naranja (CD8:R-PE)

las cuales son directamente proporcionales a la intensidad de antígeno expresado. En este análisis se utilizaron los datos de los experimentos descritos anteriormente para estudiar el efecto del THF- γ 2 sobre el fenotipo celular.

El THF- γ 2 no modificó (figuras 11 y 12) la expresión del antígeno CD4 por los timocitos de rata recién nacida en ninguna de las poblaciones celulares que lo expresan, DP y CD4. Sin embargo, este péptido disminuyó la expresión del antígeno CD8 en la población doble positiva. Este decremento en la expresión produjo, como se puede observar en la fig. 12, disminución de la población DP, la aparición de una población CD8^{hi} y un incremento de la población CD4 (fig 11).

Los resultados hasta ahora obtenidos sugieren entonces que el THF- γ 2 fue capaz de disminuir la expresión del antígeno CD8 por los linfocitos DP de rata recién nacida. En la figura 12 se comparó la expresión del correceptor CD8 por timocitos, en presencia y ausencia del THF- γ 2.

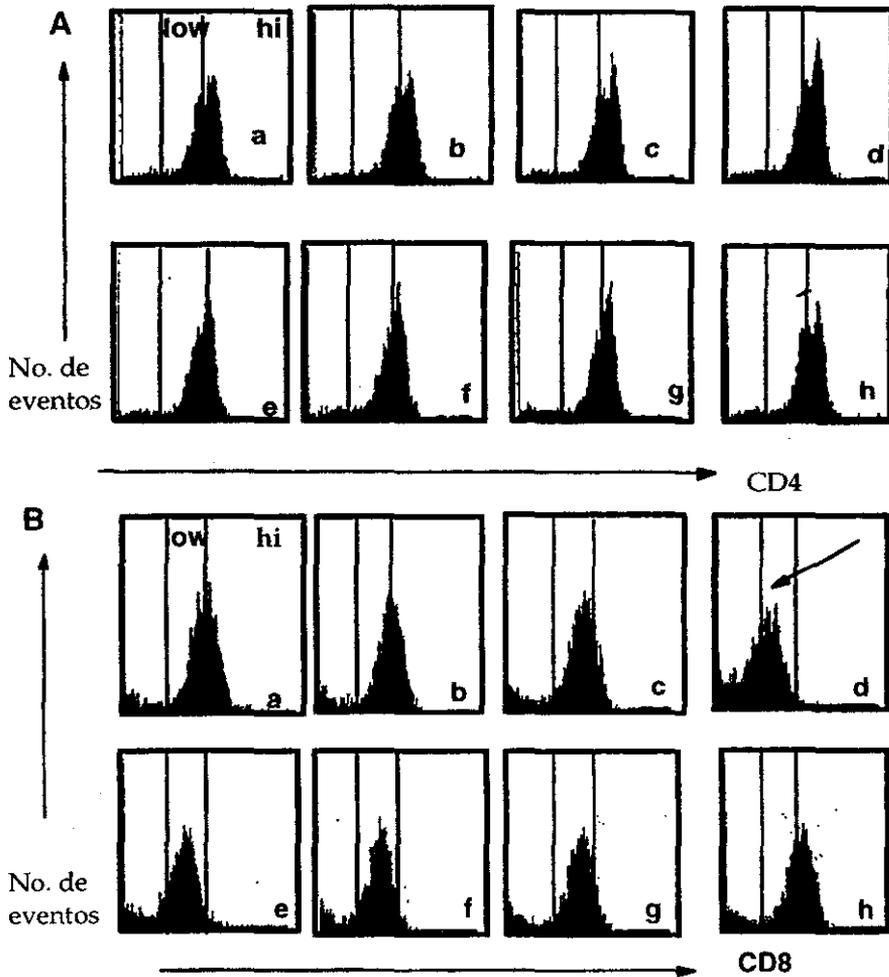


Figura 12.- Efecto de THF- γ_2 sobre la expresión de los correceptores CD4 y CD8 por timocitos de rata recién nacida coestimulados con Con-A. Los timocitos fueron cultivados en presencia de Con-A (50 μ g/ml) y diferentes concentraciones de THF- γ_2 durante 24 h. Las células fueron cosechadas y 5×10^5 células fueron incubadas con anti-CD4:FITC y anti-CD8:RPE y evaluadas por citometría de flujo de monocromática. La parte A muestra los histogramas de la expresión de CD4, La parte B presenta los histogramas de la expresión de CD8. Low y hi son las zonas positivas para la expresión del antígeno. Indicando la disminución de CD8 en la parte B a la concentración de THF- γ_2 10^{-10} con una flecha. a) control Con-A (50 μ g/ml) b) THF- γ_2 10^{-12} M c) THF- γ_2 10^{-11} , d) THF- γ_2 10^{-10} , e) THF- γ_2 10^{-9} , f) THF- γ_2 10^{-8} , g) THF- γ_2 10^{-7} M h) THF- γ_2 10^{-6} , Mostrando tres regiones negativa, low, hi, de la expresión.

Tabla 8.- Análisis del efecto del THF- γ 2, sobre los correceptores CD4 y CD8, en células estimuladas con Con-A.

| | <u>medi±sd *</u> | | |
|---------------------|------------------|------------|-------------|
| | <u>CD4</u> | | |
| | Negativo | Low | Hi |
| Control | 5.01±0.06 | 70.71±8.09 | 188.64±6.8 |
| 1x10 ⁻¹² | 5.01±0.41 | 69.59±7.26 | 194.10±7.38 |
| 1x10 ⁻¹¹ | 4.55±0.17 | 69.57±7.04 | 196.17±5.4 |
| 1x10 ⁻¹⁰ | 5.01±0.41 | 69.59±5.26 | 194.10±7.38 |
| 1x10 ⁻⁹ | 4.55±0.17 | 69.57±5.04 | 196.17±5.4 |
| 1x10 ⁻⁸ | 4.71±0.31 | 71.05±6.41 | 181.15±4.7 |
| 1x10 ⁻⁷ | 4.51±0.96 | 68.59±7.97 | 188.43±4.95 |
| 1x10 ⁻⁶ | 5.01±0.53 | 72.97±7.46 | 193.05±3.38 |
| | <u>CD8</u> | | |
| | Negativo | Low | Hi |
| Control | 2.33±0.06 | 64.75±4.23 | 156.67±0.09 |
| 1x10 ⁻¹² | 2.01±0.41 | 58.14±3.26 | 194.10±7.38 |
| 1x10 ⁻¹¹ | 3.55±0.17 | 56.57±4.04 | 196.17±5.4 |
| 1x10 ⁻¹⁰ | 4.13±0.41 | 45.88±3.26 | 126.53±7.38 |
| 1x10 ⁻⁹ | 3.26±0.17 | 32.77±5.04 | 139.82±5.4 |
| 1x10 ⁻⁸ | 3.22±0.31 | 39.28±5.41 | 126.14±4.7 |
| 1x10 ⁻⁷ | 2.47±0.96 | 55.10±4.97 | 134.54±4.95 |
| 1x10 ⁻⁶ | 3.16±0.53 | 49.99±3.46 | 135.93±3.38 |

*Este análisis fue realizado en base a los marcadores M1 como negativo, M2 y M3 como positivo Low y Hi respectivamente; para cada uno de los correceptores. La expresión de las moléculas CD4 y CD8 se realizó por citometría de flujo, monocromática. Los valores representan la media de 3 experimentos por duplicado \pm la desviación estándar.

5.8.- Efecto de THF- γ 2 sobre la proliferación celular, de timocitos de rata recién nacida, inducida mediante Concanavalina A (Con-A)

Con el resultado anterior no es excluyente la posibilidad de que la Con-A pueda estar estimulando la proliferación, especialmente de los linfocitos maduros, se decidió investigar el efecto del THF- γ 2 sobre la proliferación celular de los timocitos estimulados con Con-A. Para cuantificar la proliferación celular se utilizó el ensayo de incorporación de [3 H]-timidina. Se realizó entonces un ensayo curva dosis-respuesta del efecto de THF- γ 2 sobre la proliferación celular. Las células fueron estimuladas simultáneamente con Con-A (50 μ g/ml) y diferentes concentraciones de THF- γ 2 (10^{-12} a 10^{-6} M). El THF- γ 2 potenció el efecto mitogénico de Con-A sobre los timocitos. Este efecto se pudo observar a todas las concentraciones del péptido, sin embargo su efecto fue mayor entre 10^{-12} y 10^{-10} M y fue del 30% aproximadamente, ver fig 13.

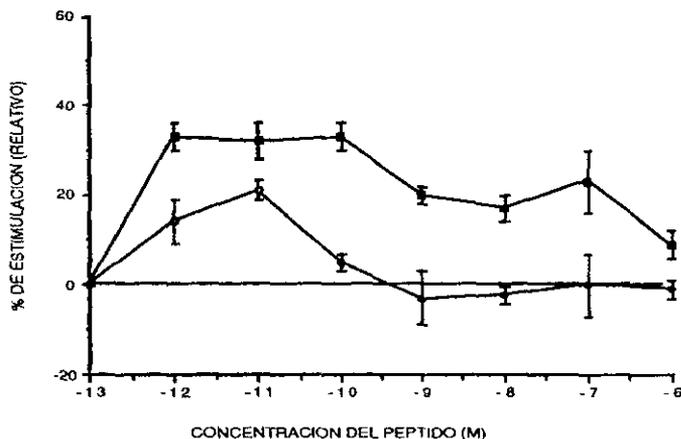


Figura 13.- Los timocitos fueron cultivados y estimulados con Con-A (50 μ g/ml) y diferentes concentraciones de THF durante 24 h, en presencia de 0.5 μ Ci/ml de 3 H-timidina. Las células se cosecharon, se digirieron con NaOH y tritón X100, se les añadió líquido de centelleo y fueron analizadas en un contador de centelleo. Los valores representan la media de 3 experimentos por duplicado \pm la desviación estándar. Los círculos (o) THF- γ 2; los cuadros (□) PA.

Estos resultados sugieren la posibilidad de que los cambios observados en el fenotipo de los timocitos incubados en presencia de Con-A y THF- γ 2 se deban a la proliferación de las células. Por la metodología empleada no se estaría en posibilidades de determinar cual de las poblaciones de timocitos es la que prolifera.

5.9.- Efecto del péptido análogo sobre el fenotipo y la proliferación celular de timocitos de rata recién nacida, estimulados con Con-A

Los resultados anteriores fueron muy alentadores; encontrar que THF- γ 2 ejerce un efecto sobre los timocitos no maduros y parece favorecer la maduración de los mismos hacia el linaje CD4 pareció muy importante. Sin embargo se consideró que es necesario e importante conocer la especificidad de estos efectos. Con la finalidad de descartar que los efectos del THF- γ 2 sean a través del TCR y no de tipo hormonal, se decidió estudiar el efecto de un péptido análogo (PA).

Se consideró que el péptido debería ser de tamaño similar al del THF- γ 2. Las características del PA se describen en materiales y métodos. Decidimos utilizar las condiciones a las que observamos los efectos del THF- γ 2. Esto es, coestimular los timocitos con Con-A y realizar una curva dosis-respuesta del efecto del PA sobre el fenotipo de los timocitos, así como del efecto del PA sobre la proliferación celular inducida por la Con-A.

TABLA 9.- Curva dosis-respuesta del efecto del PA sobre el fenotipo de los timocitos de rata recién nacida, coestimulados con Con-A.

| | <u>Porcentaje de células</u> | | | |
|-------------------|------------------------------|--------------|-------------|------------|
| | DN | DP | CD4 | CD8 |
| Control | 3.89±1.93 | 81.20±6.28 | 11.27±3.2 | 4.60±0.4 |
| 10 ⁻¹² | 6.44±0.41 | 71.85±3.57** | 16.69±0.9 | 6.05±0.5 |
| 10 ⁻¹¹ | 5.51±2.05 | 74.86±5.45 | 15.45±1.5 | 6.00±1.7 |
| 10 ⁻¹⁰ | 5.16±1.98 | 73.34±3.01 | 16.74±1.0* | 4.77±2.2 |
| 10 ⁻⁹ | 6.99±1.15* | 72.75±3.28 | 14.69±1.9** | 5.98±1.9 |
| 10 ⁻⁸ | 7.17±2.83 | 74.84±0.73** | 13.90±2.6** | 6.17±0.2 |
| 10 ⁻⁷ | 3.71±0.25 | 73.23±2.61 | 14.22±3.7 | 6.07±2.2** |
| 10 ⁻⁶ | 6.62±1.69 | 72.22±1.51 | 15.13±2.5 | 5.34±1.5* |

Los timocitos fueron cultivados en presencia de 50 µg/ml de Con-A y diferentes concentraciones del PA durante 24 h. Las células fueron cosechadas y 5×10^5 células fueron incubadas con anti-CD4:FITC y anti-CD8:RPE y evaluadas por citometría de flujo de dos colores. Los datos expresan la media de tres ensayos por duplicado \pm la desviación estándar. *P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001 n=2

5.9.1 Efecto del PA sobre la proliferación celular inducida por Con-A en timocitos de rata recién nacida

Se realizó la curva dosis-respuesta del efecto del PA sobre la proliferación celular inducida por Con-A. Para cuantificar la proliferación celular se utilizó el ensayo de incorporación de [³H]-timidina. Las células fueron estimuladas simultáneamente con Con-A (50 µg/ml) y diferentes concentraciones del PA (10⁻¹² a 10⁻⁶ M). El PA, como se observa en la figura 12, potenció el efecto mitogénico de Con-A sobre los timocitos. Este efecto se observa sólo en las concentraciones menores (10⁻¹² a 10⁻¹⁰) del péptido empleadas; sin embargo su efecto fue menor que el obtenido con THF-γ2.

5.9.2.- Efecto del PA sobre el fenotipo de los timocitos, de rata recién nacida, coestimulados con Con-A

Se realizó un ensayo dosis-respuesta del efecto del PA sobre el fenotipo de los timocitos, de rata recién nacida, coestimulados con Con-A. El fenotipo se caracterizó en base a la expresión de los antígenos CD4 y CD8. Esta expresión fué cuantificada por citometría de flujo de dos colores. Las células fueron estimuladas simultáneamente con Con-A (50 $\mu\text{g/ml}$) y diferentes concentraciones de PA ($10^{-12}, 10^{-11}, 10^{-10}, 10^{-9}, 10^{-8}, 10^{-7}, 10^{-6}$ M). El PA, como se observa en la tabla 9, incrementó la población con el fenotipo CD4; asimismo, produjo un incremento de las poblaciones con fenotipo doble negativo y CD8. El incremento en DN fue de casi 4 veces el control. Sin embargo estos no fueron estadísticamente significativos. Estos resultados sugieren que el PA no tiene exactamente los mismos efectos que el THF- $\gamma 2$.

Efecto del PA en timocitos estimuladas con Con-A

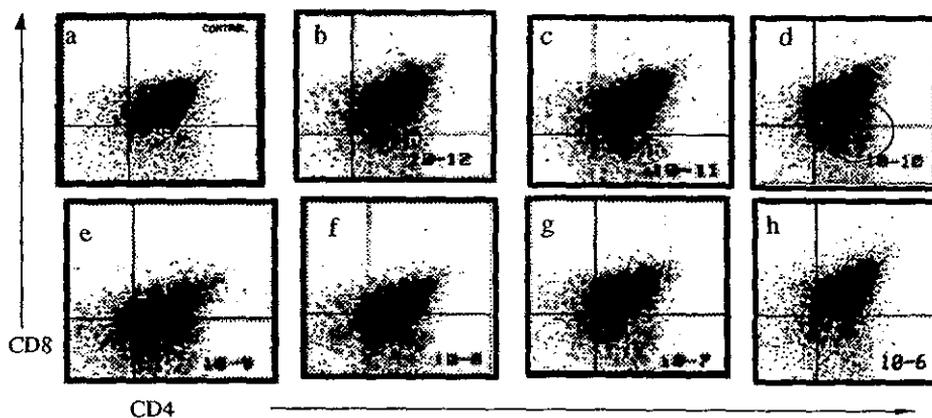


Figura 14.- Ensayo dosis-respuesta del efecto del PA sobre el fenotipo de los timocitos coestimulados con Con-A. Los timocitos fueron cultivados durante 24 h, en presencia de Con-A (50 $\mu\text{g/ml}$) y diferentes concentraciones del PA (mostradas en el ángulo inferior derecho). Las células fueron cosechadas y 5×10^5 células fueron incubadas con anti-CD4:FITC y anti-CD8:RPE y evaluadas por citometría de flujo de dos colores. Los datos expresan la media de tres ensayos por duplicado \pm la desviación estándar. La figura muestra un ensayo representativo.

6.- DISCUSION

El objeto de esta tesis fué el estudio de la influencia del factor tímico humoral sobre el proceso de maduración de los linfocitos T. Trabajos previos del grupo del Dr. Trainin han demostrado que el THF- γ 2 es capaz de revertir parcialmente los efectos de la timectomía neonatal en el ratón (Umiel *et al.*, 1984, Katorza *et al.*, 1987); así como su efecto que no es especie específico. Por otra parte, existen indicios de la presencia de receptores al THF- γ 2, de tipo específico, en los timocitos de rata recién nacida. Asimismo, de que el THF- γ 2 es capaz de modificar los niveles basales del GMPc en estas mismas células. Sin embargo estos trabajos no aportaron evidencias de un efecto biológico del THF- γ 2 sobre los timocitos, ni especialmente sobre la diferenciación de las células T. Se consideró entonces importante investigar si el THF- γ 2 era capaz de modular la maduración intratímica de los linfocitos T. Esta es una pregunta capital, pues de ser así podría apoyar o descartar la hipótesis de su papel como hormona tímica que participaría en la modulación de la maduración de los linfocitos T en el timo.

Para estudiar si el THF- γ 2 modula la diferenciación de los linfocitos T no se contaba con un modelo referenciado en la literatura. Se compararon los distintos modelos descritos como el cultivo de órgano tímico fetal (FTCO), cultivo de todas las células tímicas en suspensión, cultivo de poblaciones celulares puras (enriquecidas), (Ashton-Rickard *et al.* 1994; Anderson *et al.* 1994; Fairchild y Austin 1995; Barthlott *et al.* 1997). En cada uno de los modelos diferentes modelos se evaluaron las posibles ventajas y desventajas, que ofrecían. Por ejemplo, trabajar con poblaciones celulares puras o enriquecidas ofrecía el atractivo de saber si en tal o cual población el THF- γ 2 tenía directamente o no

efecto biológico, sin embargo dejaría el riesgo de que al perder las interacciones físicas y químicas con otros tipos celulares simplemente se dejaría de lado elementos importantes del proceso y por tanto se obviarían eventos que ocurrirían en otras condiciones.

Se decidió utilizar, en primera instancia, el modelo de cultivo de células de timo en suspensión. Este modelo permitiría proveer un sistema en donde se podrían controlar la mayoría de las variables presentes en el órgano; probablemente era más seguro y fácil que los nutrientes, estímulos, etc. llegaran a todas y cada una de las células. En segundo lugar era posible evitar tanto la necrosis del órgano, así como la salida de los timocitos que se presenta en el modelo de cultivo de órgano.

Para estudiar el efecto del THF- γ 2 sobre la maduración de los linfocitos T en el timo se contaba básicamente con dos opciones en cuanto a la especie animal a estudiar, el ratón y la rata. El ratón ofrecía como principal ventaja la existencia de mayor información acerca del proceso de maduración de los linfocitos T, asimismo la existencia de mayor variedad de anticuerpos comerciales contra los posibles antígenos a estudiar. La rata ofrecía como ventaja el hecho de que se hubieran realizado estudios previos acerca de la existencia de receptores para el THF- γ 2 en los timocitos. La principal desventaja de esta especie es la menor variedad de anticuerpos comerciales disponibles. Como se planteó como objetivo el estudio del efecto del THF- γ 2 sobre la expresión de los correceptores CD4 y CD8, y dado que existen anticuerpos comerciales de tipo monoclonal contra estas moléculas y que no se ha descrito la no especificidad de especie del THF- γ 2, se decidió utilizar a la rata como modelo experimental.

Se decidió asimismo utilizar timocitos de animales recién nacidos, ya que en la literatura existe un gran número de reportes que indican que la principal producción y maduración de células T es en la etapa perinatal. La rata se ha utilizado previamente como modelo para el estudio de la maduración de los linfocitos T (Ming *et al.*, 1992; Takimoto *et al.*, 1992). En el timo de animales recién nacidos el proceso de maduración está al máximo de su capacidad, en cuanto a producción de células maduras. A esta edad están representadas todas las poblaciones celulares descritas para el órgano, sin que hayan sido modificadas las proporciones por los esteroides sexuales (Tsuchida *et al.*, 1994). Además se sabe que si se extirpa el órgano después de los tres días de nacido, en el caso del ratón, no se producen efectos importantes en el animal, ya que los órganos linfoides secundarios han sido ocupados con linfocitos maduros. En tanto que el timo del adulto empieza a atrofiarse en la etapa de la pubertad, con la llegada de la madurez sexual, alcanzando niveles extremos en los viejos (Cardarelli, 1989c). Si bien se hubieran podido utilizar timocitos de animales de menor edad (15 a 20 días de gestación), esto sería más complicado por el escaso número de células en el órgano (observaciones realizadas en el laboratorio).

Para evaluar el proceso de maduración de los linfocitos T se han identificado varias moléculas que podrían emplearse como marcadores de cada etapa; entre éstas destacan el CD3, las cadenas α y β del TCR, la expresión de las proteínas TAP, los correceptores CD4 y CD8, la expresión de las moléculas CD117, CD44, CD25. Se decidió evaluar únicamente la expresión de los correceptores CD4 y CD8 ya que ello permitiría dividir el proceso en 3 etapas: la primera en la que no se expresan estos antígenos; la segunda en que ambos antígenos son expresados y finalmente, la tercera en que sólo uno de los correceptores es expresado por los timocitos. Estas etapas generan 4 poblaciones de timocitos las cuales pueden ser fácilmente identificadas

mediante citometría de flujo, células dobles negativas; células dobles positivas; células simples positivas CD4 y células simples positivas CD8.

La citometría de flujo de dos colores permite analizar simultáneamente dos parámetros a una misma muestra; la expresión de los antígenos y la proporción de las poblaciones celulares que los expresan. Es decir, si la expresión del antígeno aumenta, la intensidad de fluorescencia incrementará proporcionalmente o viceversa. Lo anterior es fácilmente cuantificable mediante un histograma de la intensidad de fluorescencia para cada antígeno (fluorocromo). La proporción de las poblaciones celulares que expresan los antígenos se puede, fácilmente cuantificar mediante una gráfica de puntillado, en donde se relaciona la fluorescencia correspondiente a CD4 (FITC) contra la correspondiente a CD8 (R-PE). Esta gráfica se divide en cuadrantes de tal manera que cada uno de ellos corresponde a cada una de las poblaciones descritas como DN, DP, y SP.

Como preámbulo del trabajo se caracterizaron las poblaciones de timocitos presentes en timos de ratas recién nacidas. Como era de esperarse se obtuvo una población mayoritaria de células CD4⁺ CD8⁺ (DP) de aproximadamente el 80 %. El resto de la población inmadura fue del 2% al 3% de células dobles negativas. Las células maduras, representadas por las células CD4⁺ ó CD8⁺ fue del 12% para CD4 y 6 % para CD8, aproximadamente. Estos resultados concuerdan, en lo general, con los resultados obtenidos por Tsuchida *et al.*, 1994 quienes analizaron las poblaciones de timocitos de rata (Lewis) adulta (11 semanas de edad) y encontraron que las células DN son el 3%; las DP son el 80 %; las CD4 son el 7.4 %; y las CD8 son el 10%. La principal diferencia con estos resultados lo constituye el hecho que la población de las células CD8 sea mayor que la de células CD4. Las diferencias pueden deberse

a variaciones biológicas, a la cepa de ratas utilizada, y las condiciones de hospedaje, etc.

En el timo, durante toda la vida, los timocitos están proliferando abundantemente en comparación con otras células del organismo. Esta proliferación celular forma parte del proceso de maduración de los timocitos. En las etapas fetales y neonatales permite la generación de la suficiente cantidad de timocitos para cubrir toda el espectro de posibilidades en cuanto a las afinidades del TCR. En la etapa adulta esta proliferación celular disminuye, al parecer solo tiene el objetivo de reponer las células "vírgenes" (que no han entrado en contacto con antígenos) que se mueren al terminar su ciclo biológico. Se estudió el contenido de ADN de los timocitos y analizamos el ciclo celular de los mismos. En los resultados obtenidos destaca que aproximadamente la mitad de la población celular de los timos de rata recién nacida se encuentra en la fase de síntesis del ciclo celular.

Asimismo, en este órgano una cantidad importante de células son eliminadas mediante la apoptosis. La apoptosis celular es el proceso fisiológico de muerte celular. Se presenta como un componente normal e importante dentro del proceso de la embriogénesis y desarrollo celular, a través de eventos de selección de células que han sido capaces de modificar la expresión de su genoma en respuesta a señales ambientales o de aquellas que han adoptado un modelo determinado de expresión genética. Los eventos de la selección negativa de aquellos linfocitos que fallan en la expresión del TCR, de los correceptores o la combinación ambos, así como la eliminación de los timocitos auto-reactivos son mediados por la apoptosis inducida a través de una molécula de superficie celular llamada fas. Fas (CD95) es una glicoproteína transmembranal de 45 Kda. perteneciente a la familia del receptor de TNF/CD40, que es ampliamente expresada por muchas células, especialmente los timocitos (Godfrey D.I. y

Zlotnik A 1993; Alan M. S. 1996; Boehmer H.V. 1994). Al estudiar la cantidad de células del timo que están en apoptosis. Los resultados mostraron que esta población representa entre el 2 y 3 % de los timocitos.

Posteriormente se caracterizó la población de los timocitos obtenidos de rata recién nacida, después de un cultivo de 24 horas de los timocitos, en las condiciones descritas. El cultivo modificó discretamente la proporción de las poblaciones, pero no la expresión de los antígenos CD4 y CD8. Las células en la fase de síntesis del ciclo celular representa el 17.2 % y sólo el 4.2% se encuentra en proceso de apoptosis. Las diferencias con la población de timocitos recién extraídos del timo pueden deberse a varios factores; entre ellos puede ser la falta de ingreso de nuevas inmigrantes al timo, la permanencia en el plato de cultivo de las células maduras, a diferencia de que en el timo saldrían; la falta de algunos factores séricos, etc.

Se realizó un ensayo dosis respuesta del efecto del THF- $\gamma 2$ (10^{-10} a 10^{-6} M) sobre la proliferación celular, así como una curva temporal (24 a 72 h). Si bien los resultados mostraban una tendencia de incremento de la proliferación celular, esto no fué significativo. Para comprobar que el modelo utilizado era adecuado se decidió estimular los timocitos con un agente mitógeno. Se conocen varias sustancias que tienen la capacidad de estimular la proliferación y diferenciación de clones de linfocitos T. Estas sustancias reciben el nombre genérico de mitógeno. Los mitógeno más utilizados para linfocitos T son la concanavalina A (Con-A) y la fitohemaglutinina (PHA), así como los superantígenos tanto exógenos como endógenos. Estas lectinas activan linfocitos T a través del receptor de células T (TCR). La Con-A sus señales mitógenicas son transmitidas por entrecruzamiento con el complejo TCR-CD3, sin requerir de la participación de células presentadoras de antígenos; Mientras que para la PHA esta, se une al heterodimero $\alpha\beta$ o la cadena γ de TCR. Sin

embargo se ha planteado que los efectos de las lectinas representan la suma de los efectos de la unión de ellas al TCR y otras moléculas de los linfocitos T (Paul, 1993), lo que finalmente produce proliferación celular. Asimismo la célula iniciará la producción de interleucinas, especialmente ha sido reportado el caso de la IL-2.

No se encontró en la literatura consultada reporte del empleo de lectinas como agentes mitóticos de timocitos inmaduros y por tanto de una dosis adecuada. Se decidió realizar una curva dosis-respuesta del efecto mitogénico de Con-A y PHA a tres distintos tiempos: 24, 48 y 72 horas. La mejor respuesta se obtuvo con la Con-A. Esta fue de un incremento del 80% de la proliferación celular. Esta dosis es 50 veces mayor a la utilizada en linfocitos maduros. En el caso de la PHA dió como respuesta un incremento de la proliferación celular del 60 % aproximadamente. Con estos resultados se concluyó este modelo era funcional y adecuado, al menos para estudiar un posible efecto del THF- γ 2 sobre la proliferación celular.

Ante la falta de un efecto del THF- γ 2 sobre la proliferación celular de los timocitos, se decidió investigar si este péptido era capaz de modificar la respuesta proliferativa a la Con-A, por ser la Con-A el mitógeno que generó una mejor respuesta a las 24 h, tiempo en el cual se obtuvo la mayor viabilidad del cultivo (95%). Seleccionó la dosis de 50 μ g/ml ya que generó una estimulación subóptima de aproximadamente el 60 %. En base a lo anterior se procedió a realizar los ensayos posteriores en un cultivo de 24 h, y con 50 μ g/ml de Con-A como estímulo. Se trataron los timocitos con diferentes concentraciones de THF- γ 2 (10^{-10} a 10^{-6} M) en presencia de la Con-A. Los resultados que se obtuvieron sugieren que el THF- γ 2 es capaz de potenciar el efecto mitogénico de la Con-A sobre los timocitos de rata recién nacida en cultivo. Como se obtuvo un efecto

máximo a la dosis de 10^{-10} M mismas, se decidió utilizar dosis menores del péptido. 10^{-11} y 10^{-12} M. Se observó que estas dosis menores tienen un efecto menor al de 10^{-10} M.

Otro de los parámetros importantes en la diferenciación de los timocitos es la expresión de los correceptores CD4 y CD8. Ya que esta variable pudiera depender del ambiente endocrino del timo, se estudió el efecto del THF- γ 2 sobre la expresión de estos antígenos, así como de la proporción de las poblaciones que los expresan. Se realizó una curva dosis-respuesta (10^{-10} a 10^{-6} M) a 24 h. Los resultados obtenidos fueron poco alentadores, el THF- γ 2 no modificó la expresión de los antígenos, ni la proporción de las células que los expresaban.

En base a los resultados de los estudios del efecto del THF- γ 2 sobre la proliferación inducida con Con-A, así como de los reportes de la literatura de que este péptido modifica la respuesta a agente mitogénicos como Con-A y PHA de linfocitos periféricos, tanto en la proliferación, como en la producción de IL-2 (Ben-Hur *et al.*, 1990; Calenda *et al.*, 1993), se decidió investigar si la coestimulación de Con-A y THF- γ 2 era capaz de modificar la expresión de los correceptores mencionados y la proporción de las células que los expresan.

Los timocitos fueron estimulados con diferentes concentraciones de THF- γ 2 (10^{-12} a 10^{-6} M) en presencia de la Con-A (50 μ g/ml) para estudiar el efecto del factor sobre la expresión de las moléculas CD4 y CD8 por los timocitos estimulados con la lectina. Los resultados obtenidos sugieren que el THF- γ 2 es capaz de disminuir o apagar la expresión del correceptor CD8, especialmente de los timocitos DP. Cuando analizamos el efecto de lo anterior sobre las poblaciones, de timocitos, los resultados sugieren que el THF- γ 2

incrementa la población de timocitos CD4, disminuyendo la población de timocitos DP (fig. 11).

Los resultados obtenidos, al igual que los reportados para otros modelos, en que se estudia el efecto *in vitro* de THF- γ 2 (células de bazo, células de cordón umbilical y de médula ósea) muestran que los linfocitos T, maduros o inmaduros, deben estar activados o coestimulados para que se manifieste el efecto de THF- γ 2; o visto de otra manera, que el THF- γ 2 potencia el efecto de las lectinas. Estos datos nos llevan a plantear las posibles interacciones del THF- γ 2 con la Con-A, para lo cual se analizará el mecanismo de acción de estas glicoproteínas de origen vegetal.

La Con-A es un agente mitogénico que actúa entrecruzando con el TCR de manera inespecífica y activando la señal por la vía de PKC (Fowlkes y Sheweighoffer, 1995). Se ha planteado que las células vírgenes, requieren de un coestímulo para ser activadas por la Con-A. Mientras que en el caso de los superantígenos se ha descrito que en estos, se unen a segmentos específicos de la cadena β del TCR, los cuales son expresados por aproximadamente 10% de los linfocitos T, independientemente del tipo de cadena α que tenga el TCR. Se ha planteado, además, la posibilidad de que el mecanismo de transducción utilizando para esta activación, sea diferente del complejo principal de histocompatibilidad y el péptido.

La Con-A, en estos experimentos de alguna manera modificó el medio ambiente en el cultivo, aunque con estos resultados no se puede decir con exactitud de qué manera. Existen dos posibilidades de interacción de la Con-A y el THF- γ 2 que conduzcan a la manifestación del efecto de THF- γ 2. Primero.-

los linfocitos activados por la lectina produzcan y secreten al microambiente una serie de citocinas, las cuales a su vez estimularían a las mismas células o a otras circunvecinas de tal manera que este estímulo las sensibilice al THF- γ 2. Segundo.- los timocitos requieren de un coestímulo distinto y simultáneo a la Con-A para ser activados.

De manera natural la Con-A nunca llegaría a estimular a los timocitos, así que no se darían ninguna de las dos posibilidades descritas anteriormente. Esto resulta interesante por que sugiere la existencia de una substancia presente normalmente en el microambiente tímico que interactuaría con el THF- γ 2, en el lugar de la Con-A, pueden ser algún tipo de lectinas; esta función se ha atribuido a la IL-1 (Abbas, 1992). La corteza tímica es una área restringida o libre de antígenos "extraños", por lo anterior normalmente los timocitos corticales nunca serían activados por este tipo de antígenos. En este modelo experimental, se ha destruido la arquitectura tisular normal; con ellos las barreras naturales a los antígenos y de esa manera los linfocitos inmaduros pueden entrar en contacto con los antígenos como la Con-A.

En el caso de los linfocitos T maduros; la Con-A sí puede llegar a interactuar con los linfocitos de manera natural, directamente con su TCR. Los estudios, *in vitro* de Trainin y col. realizados en células de bazo (células maduras) y cordón umbilical (población mayoritaria de células maduras y minoritarias de inmaduras, básicamente de CMH e incluyendo cel. pre-tímicas) muestran que el THF- γ 2 potencia el efecto de las lectinas (Con-A y PHA) sobre la proliferación celular y la producción de IL-2.

No es posible hacer una comparación directa de los efectos de las lectinas sobre los timocitos y los linfocitos T maduros. Sabemos que en ambos

estos antígenos clonales inducen proliferación y que, al menos en los linfocitos maduros, también la producción de algunas citocinas. El efecto común de que estamos seguros es la proliferación. En ambos tipos de células no hemos visto efectos del THF- γ 2 por sí solo. Ello nos sugiere que es probable que el factor tímico solo tenga efecto(s) sobre las células en proliferación.

Los resultados aquí obtenidos sugieren que el factor tímico humoral (THF- γ 2) tiene un efecto sobre la diferenciación de las células T. En este trabajo se presentan evidencias de que el THF- γ 2 influyó en la maduración de timocitos inmaduros (DP) hacia simples positivos (SP), ya sea un mecanismo directo o indirecto, disminuyendo asimismo la expresión las moléculas de superficie CD8, lo que condujo a un incremento de la población de timocitos CD4. Este es el primer estudio de los efectos del THF- γ 2 sobre la diferenciación de células T *in vitro*. Los estudios *in vitro*, previos, reportados en la literatura, han sido realizados en células de cordón umbilical, bazo, y médula ósea (Ben-Hur *et al.*, 1990; Calenda *et al.*, 1993), en los cuales la población celular es de linfocitos maduros. Los estudios, *in vivo*, muestran que el THF- γ 2 es capaz de incrementar la respuesta inmune en varios aspectos (Trainin, 1990; Urdahl *et al.*, 1994). En lo general esos estudios sugieren que el efecto de este factor es a través de incrementar las células T cooperadoras (CD4) o su actividad (Ben-Hur H., *et al* 1990; Calenda V. *et al* 1993). Esos resultados concuerdan con los obtenidos por dicho trabajos, en los que observamos un incremento en la producción de células CD4 como efecto del THF- γ 2.

En el presente trabajo de tesis, el THF- γ 2 incrementa la población de timocitos CD4. Existen dos posibles mecanismos para ello. Primero, la proliferación de esta población; segundo, una maduración de los timocitos DP

hacia SP CD4. Es posible que ambos mecanismos pueden estar involucrados y no sean excluyentes. El THF- γ 2 disminuye la expresión del correceptor CD4 en las células dobles positivas. Esto se traduce en un incremento de una población CD4+CD8^{low}, así como un incremento en la población de linfocitos CD4. Por otra parte, el factor potencia el efecto mitogénico de la Con-A induciendo una mayor proliferación. Es claro que no se sabe en cual o cuales de las subpoblaciones de timocitos se presenta este efecto.

Existen dos posibilidades, básicamente, del mecanismo a través del cual pueda estar actuando el THF- γ 2. Primero a través de un receptor membranal específico y segundo a través del TCR. Nosotros nos inclinamos a que este factor actúa mediante el primer mecanismo por las razones que se plantean: Primero, el tamaño del péptido. Los péptidos extracelulares deben ser procesados y presentados por el CPH de clase II. En general se trata de proteínas que son fragmentadas en los proteosomas a péptidos de 10 a 30 aa, unidos al CPH de clase II y presentados a las células T CD4. Segundo, la cantidad de células activadas: suponiendo que el péptido pudiera unirse al CPH ya sea por el proceso clásico o por desplazar a otras moléculas del CPH presente en las membranas celulares, la población de timocitos con afinidad por este péptido y por tanto activadas sería muy pequeña. De tal manera que no se podría esperar que en 24 h se duplicara la población de células CD4. Si este fuera el mecanismo de estimulación los eventos celulares pasarían inadvertidos. Recordando que ésta fue una de las limitaciones para estudiar activación de células T antes de contar con los animales transgénicos; por eso se debía y debe recurrir a la activación con métodos experimentales como las lectinas, los anticuerpos contra CD3, etc. Tercero. Las constantes de disociación de las hormonas peptídicas, como las citocinas, son del orden de 10^{-12} a 10^{-10} M, mientras que para los péptidos y el CPH son del orden de 10^{-6} M. Esto quiere

decir que a la concentración de 10^{-10} M en la que observamos los efectos máximos de THF- γ 2 no se daría la unión de THF- γ 2 al CPH.

Se decidió utilizar como control un péptido análogo a este factor para comparar sus efectos. Se utilizó un octapéptido que contiene los mismos aminoácidos que el THF- γ 2, pero en diferente secuencia. Como dato importante vale mencionar que el péptido análogo y el THF- γ 2 poseen los mismos aa (Leu) en sus extremos terminales. Se realizaron los experimentos para estudiar el efecto del PA sobre la proliferación inducida por la Con-A, así como su efecto sobre la expresión de los correceptores CD4, CD8 en las poblaciones de células que los expresan. Las condiciones que las utilizadas en estos experimentos fueron las mismas que para el THF- γ 2. Los resultados obtenidos muestran que el PA, en lo general, produce los mismos efectos que el THF- γ 2, sin embargo con menor potencia.

Si el THF- γ 2 estuviera actuando a través de un mecanismo no específico deberíamos haber obtenido los mismos resultados con el PA, tanto en "calidad" como en "potencia". El hecho de que sean muy similares en "calidad", pero que el PA tenga menor potencia sugiere que existe un receptor específico para el THF- γ 2, el cual une al PA con menor afinidad y probablemente este no sea capaz de producir todos los efectos biológicos del THF- γ 2. Es probable que las dos leucinas de los extremos terminales participen en la unión al receptor. Este resultado concuerda con resultados preliminares obtenidos por Burstein, Trainin (1993). Ellos probaron este PA en el ensayo de linfocitos de bazo y observaron que el PA potencia la proliferación celular inducida por Con-A, así como la producción de IL-2 (comunicación personal). Sería conveniente utilizar

otros péptidos análogos, pero cambiar al menos uno de los extremos del péptido, para poder determinar su especificidad.

Por el tipo de experimentos realizado, y porque no fue nuestro objetivo, no se conoció el mecanismo a través del cual THF- γ 2 es capaz de modular la expresión del correceptor CD8, la proliferación celular de los timocitos, ni cómo incrementa la proporción de las células CD4. Consideramos importante continuar este proyecto con una serie de experimentos que podría ayudar a contestar estas preguntas.

Será conveniente realizar experimentos de triple marcaje, agregando BrdU a los ensayos para identificar la(s) población(es) celulares que proliferan en respuesta a la Con-A y más específicamente al THF- γ 2. Esto nos permitiría concluir si la población de células CD4 aumenta por este mecanismo o no. Paralelamente se deberá realizar estudios para identificar y caracterizar el receptor de THF- γ 2, ver en qué tipo de células se encuentra y conocer la posible vía de transducción de señales.

La evaluación de la expresión de otras moléculas de superficie que han sido descritas estar involucradas en la diferenciación de células T, serían de gran ayuda para validar el sistema, así como la medición de la producción de citocinas. Ante la dificultad para realizar los puntos anteriores, se podría profundizar en el estudio de la especificidad del receptor al THF- γ 2, utilizando en ensayos similares al empleado en este trabajo péptidos diferentes al PA que se uso en nuestro caso. Sería importante cambiar cada uno de los aa terminales por grupos similares o químicamente diferentes para analizar el papel de las leucinas en la interacción con el receptor.

7.- CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten concluir que:

- 1.- El factor tímico humoral (THF- γ 2) produce una disminución de la expresión de CD8, cuando los linfocitos se coestimulan con Con-A.
- 2.- El THF- γ 2 no tiene un efecto por sí solo sobre la expresión de las moléculas CD4 y CD8, ni en las subpoblaciones de los linfocitos que lo expresan
- 3.- El THF- γ 2 en células estimuladas con Con-A, produce un incremento en el número de células CD4⁺
- 4.- El THF- γ 2 potencia el efecto mitogénico de Con-A en la proliferación celular, aumentándola esta hasta en un 30%., siendo además un efecto dosis dependiente.
- 5.- El PA potencia el efecto mitogénico de Con-A pero con menor potencia que el THF- γ 2
- 6.- El PA tiende a modificar las subpoblaciones de timocitos que expresan CD4 y CD8, pero este dato no fue estadísticamente significativo.

8.- SUGERENCIAS

- * Sería conveniente cuantificar la producción de IL-2 en este sistema.

- * Realizar experimentos de triple marcaje, agregando BrdU a los ensayos para identificar la población celular que prolifera en respuesta a la Con-A y particularmente al THF- γ 2.

- * La evaluación del nivel de expresión de otras moléculas, en este sistema tal como CD44, CD117, CD69, Thy-1, podrían ser de gran utilidad para validar el modelo.

- * Caracterizar el receptor de THF- γ 2 , localizar en qué tipo celular se encuentra y enlazar esto con la posible vía de transducción de señales.

- * Utilizar estudios similares a éste con diferentes péptidos , en los que se podrían cambiar a cada uno de los aminoácidos terminales por grupos similares ó químicamente diferentes, para analizar el papel de las leucinas en la unión del péptido al receptor.

- * Realizar ensayos con células fetales (14 días de gestación) para realizar cultivo primario y evaluar la modulación de la expresión de moléculas CD4 y CD8 inducidos por THF- γ 2.

9.- BIBLIOGRAFIA

- Abbas A. K., Lichtman A.H., y Pober J.(1992) T cell maturation in the thymus en: Cellular and molecular Immunology. 2nd. edición Saunders company Philadelphia. p 166-186
- Abbas A. K., Lichtman A.H., y Pober J.(1992) The major histocompatibility complex en: Cellular and molecular Immunology . 2nd. edición Saunders company Philadelphia. p 96-114
- Alam M.S., Travers P.J., Wung J.L. Nasholds W., Redpath S., Jamenson S.C. y Gascoigne N.R.J, (1996). T-cell receptor affinity and thymocyte positive selection. *Nature* 381:616-620
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J.D. (1994) Differentiated cells and the maintenance of tissues. en: Molecular biology of the cell. 3th De. Garland Publishing, Inc. New York. pp. 1139- 1193
- Anderson G; Jenkinson E.J., Moore N.C., Owen J.J.T. (1993). MHC class II-positive epithelium and mesenchyme cell are both required for T-cell development in the thymus. *Nature* 362:70-73
- Anderson J.S. y Perlmutter M.R. (1995). A signaling pathway governing early thymocyte maturation.
- Anderson G., Moore N.C., Owen J.J.T. y Jenkinson E.J. (1996) Cellular interactions in thymocyte development. *Annu Rev Immunol* 14:73-99
- Barrera-Rodríguez R., Peralta-Zaragoza O. y Madrid Marina V. (1995) Bases moleculares de la inmunología del cáncer. *Salud Publica Mex* 37:344-353.
- Bebatún K-M., Suss D. y Krammer P.H. (1994) Differential expression of APO-1 on human thymocytes: implications for negative selection. *Eur J Immunol* 24:753-758
- Bendelac A., Matzinger K Seder A.R., Paul W.E. y Schwartz R.H.(1992) Activation events during thymic selection. *J. Exp. Med* 175,731
- Ben-Hur H., Pecht M., Netzer L., Borenstein R., Blickstein I., Burstein Y. y Trainin N., (1990). Immune modulation exerted by thymic humoral factor (THF- γ 2) on T-cell subsets and IL-2 production of umbilical cord blood lymphocytes. *Immunophar Immunotox* 12(1):123-133
- Benjamini, E., Sunshine, G., and Leskowitz, S. 1996, Biology of the T lymphocyte. In: Immunology, a short course. 3th editonWylry-liss De. New York. p 115-185
- Berg L.J., Fazekas de St. Groth, B., Pullen A.M., y Davis, M.M. (1989). Alteration of negative selective in T cel receptor $\alpha\beta$ transgenic mice. *Nature* 340, 559-562.
- Brände D., Müller C., Rüllicke T., Hangartner H y Pircher H., (1992) Engagament of T-cell during positive selection in the thymus down regulates RAG-1 expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 9529-9533
- Broussard-Diehl C., Bauer S.R., y Scheuermann R.H., (1996). A role for *c-myc* in the regulation of thymocyte differentiation and possibly positive selection. *J Immunol* 156:3141-3150

- Burgulya P., Kishi, H., Uematsu, Y., y von Boehmer H. (1992) Exclusion and inclusion of α β T cell receptor alleles. *Cell* 69, 529-537
- Calenda V., Silvy F. y Chermann (1993) Effects of thymus humoral factor gamma-2 (THF- γ 2) on lymphohaematopoietic progenitor cells: an *in vitro* study. *Res Immunol* 144:395-406.
- Cardarelli F.N. (1989) Developmental anatomy and morphology of the thymus en: The thymus in health and senescence. vol I Thymus and Immunity CRC Press Boca-raton, Florida.
- Cardarelli F.N. (1989a) Involution, age and puberty en: The thymus in health and senescence. vol I Thymus and Immunity CRC Press Boca-raton, Florida.
- Cardarelli F.N. (1989b) The thymus and Immunology en: The thymus in health and senescence. vol I Thymus and Immunity CRC Press Boca-raton, Florida.
- Cardarelli F.N. (1989c) Thymic extracts en: The thymus in health and senescence. vol I Thymus and Immunity CRC Press Boca-raton, Florida.
- Cardarelli F.N. (1989d) Thymic hormones: an introduction en: The thymus in health and senescence. vol I Thymus and Immunity CRC Press Boca-raton, Florida.
- Clavers H. C., Oosterwegel M.A. y Georgopoulos K. (1993) Transcription factor in early T-cell development. *Immunology Today* 14(12):591-596
- Cosgrove D., Gray D., Dierich A., Kaufman J., Lemur M. Benoist C, y Mathis D. (1991). Mice lacking MHC class II molecules. *Cell* 66, 1051-1066.
- Coto J.A., Hadden E.M., Sauro M., Zorn N. y Hadden J.W. (1992) Interlukin 1 regulates secreción de zinc-thymulin by human thymic epithelial cell and its action on T-lymphocytes proliferation and nuclear protein kinase C. *Prot Natl Acad Sci* 88:7752-7756.
- Davies, A.J.S, (1975) Thymic hormones. *Ann NY Acad Sci* 249:61-67
- Doyon I., Hanna Z., Jolicœur P. y Sékaly R-P. (1994) Early expression of human CD4 delays thymic differentiation in transgenic mice. *Res Immunol* 145:5-16
- Dyall R., y Nikolic-Zugic J. (1995), The majority of post selection CD4+ single positive thymocytes requieres the thymus to produce long-lives functional T-cell. *J Immunol* 181:235-245.
- Egerton M., Scollay, R. y Shortman K. (1990). The kinetics of mature T cell development in the thymus. *Proc Natl. Acad.Sci. USA* 87, 2576-2582.
- Farhat B.A. , Marinas G., Daniels H., Naoumonv N., y Williams R., (1995) Evaluation on efficacy and safety of thymus humoral factor-gamma 2 in the management of chronic hepatitis B. *J Hepatol* 23:21-27
- Fitzpatrick, F.T.A., Kendall, M.D., Wheeler, M.J., Adcock, I.M. and Greenstein, B.D. (1985) Reappearance of thymus of ageing rats after orchidectomy. *J. Endocrinology* 106:R17-R19
- Fowlkes B.J. y Shweighoffer (1995). Positive selection of T cell. *Curr Opn Immunol* 7:188-195

Godfrey D. I. y Zlotnik A. (1993). Control points in early T-cell development. *Immunol Today* 14(11):547-53

Goso C., Frasca D., y Doria G., (1992) Effect of synthetic thymic humoral factor (THG- γ 2) on T cell activities in immunodeficient aged mice *Clin Exp Immunol* 87:346:351

Groettrup M., Baron A., Griffiths G., Palacios R., y von Boehmer H. (1992) T cell receptor (TCR) β chain homodimer on the surface of immature but not mature α , γ y δ chain deficient T cell lines. *EMBO J* 11, 2735-2746

Groettrup M., y von Boehmer H., (1993) A role for a pre-T-cell receptor in T-cell development. *Immunol Today* 14, 610-614

Guillermin R., (1977) The expanding significance of hypothalamic peptides, or, is endocrinology a branch of neuroendocrinology. *Rec. Prog. Horm. Res* 33:1-28

Guyton, A.C. y Hall J.E., (1996) Introduction to endocrinology, en *Medical physiology*, 6th ed W.B. Saunders Co. Philadelphia. pp 925-932.

Hadden J.W. (1992) Thymic endocrinology. *Int J. immunopharmac* 14(3):345-352

Hadden E. M; Meltz P; Sosa M. y Hadden J.W. (1992) Mixed interleukins and thymosin fraction V synergistically induce T lymphocyte development in hydrocortisone treated aged mice. *Cell Immunol* 144:228-236

Hadley, M.E., (1988.) The vertebrate endocrine system en: *Endocrinology*. Prentice-Hall, Englewood N. Jersey pp.1-38.

Ham, A.W., 1967, *Tratado de Histología*. De. Interamericana, México

Handzel Z.T., Zaizov R., Varsano I., Levin S., Pecht M., y Trainin N. (1992) The influence of thymic humoral factor on immunoproliferative disorders and viral infections in human. 83-83

Handzel Z.T., Berner Y., Segal O., Burstein Y., Buchner V., Pecht M., Levin S., Burstein R., Milchan R., Bentwich Z., Ben-Ishai Z. y Trainin N. (1987) Immunoreconstitution of T-cell impairments in asymptomatic male homosexuals by thymic humoral factor (THF), *Int J immunopharmac* 9(2):165-173

Huesman, M., Scott, B., Kisielow P., y von Boehmer, H., (1991) Kinetic and efficacy of positive selection in the thymus of normal T cell receptor transgenic mice. *Cell* 66, 533-540

Jemson S.C., Hogquist K.A. y Bevan M.J. (1995) Positive selection of thymocytes. *Annu Rev Immunol* 13:93-126

Jörg F.H. y von Boehmer H. (1997) Early $\alpha\beta$ T cell development in the thymus of normal and genetically altered mice. *Curr Op Immunol* 9:263-275.

Karawajew L., Micheel B., Jung G., Wolf H. y Behrsing O. (1994) A simple and sensitive method to study effects mediated by soluble lymphokines as demonstrated by interaction of CD4⁺ and CD8⁺ cell subsets during T cell activation. *J Immunol Method* 173:27-31.

- Katorza E., Pecht M., Apte N. R., Benharroch D., Burstein Y., Trainin N. y Rager-Zisman B., (1987) Restoration of immunological responses by THF, a thymic hormone, in mice infected with cytomegalovirus (MCMV). *Clin. exp Immunol* 70:268-275.
- Kaye J., Hsu M. E., Jamenson, J. C., Gascoigne R J. y Hedrick S. M. (1989). Selective development of CD4⁺T cell in transgenic mice expressing a class II MHC-restricted antigen. *Nature* 341, 746-749.
- Kelner G.S., Kennedy J., Bacon K. B., Kleyensteuber S., Largaespada D., Jenkins N.A., Copeland N., Bazan F., Moore K.W., Shall T.J. y Zlotnik A. (1994). Lymphotactin: a cytokine that represents a new class of chemokine. *Science* 266:1395-1398
- Khlystova Z.S., Kalinina I.I. y Khavison V. Kh. (1993). Distribution of the Hormonal Thymic factor thymalin in human fetal tissues. *Bulletin of exp biol and med* 116(12):627-630
- Kishi H., Borgulya P., Scott B., Karjalainen K., Traunecker A., Kaufman J., y Von-Boehmer H. (1991) Surface expression of the β T cell receptor (TCR) chain in the absence of other TCR or CD3 protein on immature T cell. *EMBO J* 10(1):93-100.
- Kishihara K., Penninger J., Wallace, V.A., Künding T.M., Kawai, K., Wakeham A., Timms E., Pfeffer, K., Ohashi, P.S., Thomas M.L., Furlonger C., Paige C.J. y Mak T W., (1993) Normal B lymphocyte development but impaired T cell maturation in CD45-exon 6 protein mice tyrosine phosphatase-deficient. *Cell* 74:143-156
- Levin S.D., Anderson S.J., Forbush K.A., y Perlmutter R.M. (1993). A dominant-negative transgene defines a role for p56lck in thymopoiesis. *EMBO J*, 12 1671-1680.
- Love, P.E., Shoes, E. W., Johnson, M. D., Tremblay M. L., Lee, E. J., Grinberg, A., Ping, S.P., Singer, A. y Westphal, H. (1993). T cell development in mice that lost the ζ chain of the cell antigen receptor complex. *Science* 261, 918-921
- Lundberg K., Heath W., Köntgen F., Carbone F.R. y Shortman K. (1995) Intermediate steps in positive selection: Differentiation of CD4⁺8^{int} TCR^{int} thymocytes into CD4⁺8⁺ TCR^{hi} Thymocytes. *J. Exp. Med* 181:1643-1651.
- Ming Y., Brunke D.L., Dantzer R. y Kelley K.W. (1992) Pituitary epithelial cell implants reverse the accumulation of CD4⁺CD8⁺ lymphocytes in thymus glands of aged rats. *J Endocrinol* 130:2703-270.
- Mocchegiani E., Paulocci P., Granchi D., Cavallazzi L., Santarelli L., y Fabris N., (1994). Plasma zinc level and thymic hormone activity in young cancer patients. *Blood* 83(3):749-757.
- Molina T.J., Kishihara K., Siderovski D. P., van Ewijk, E., Narendran A., Timms E., Wakeham A., Paige C.J., Hartmann, K U., Veillette, A y Mak T. (1992). Profound block in thymocyte development in mice lacking p56. *Nature* 357,161-164.
- Mombaerts P., Clarke A.R., Rudnicki M.A., Lacomini J., Itohara S., Lafaille J.J., Hooper M.L. y Tonegawa S. (1992) Mutations in T-cell antigen receptor genes a and b block thymocyte development at different stages. *Nature* 360, 225-231.

- Moreno B.M., Memon S.A., y Zacharchuk M., (1996). Apoptosis signaling pathways in normal T cell. *J Immunol* 157:3845-49
- Montecino-Rodríguez, E., Clark, R., Johnson, A., Collins, L., Dorshkind, K., 1996, Defective B cell development in snell dwarf (dw/dw) mice can be corrected by thyroxine treatment. *J. Immunol* 157:3334- 3340
- Mosmann T.R. y Sad S.(1996) The expanding universe of T-cell sub sets: th1, th2 y more. *Imunol today* 17(2) 57-63
- Nabarra; B. y Andrianarison, I. 1987, Ultrastructural studies of thymic reticulum: I. Epithelial component. *Thymus* 9:95-121
- Nakayama K I. y Nakauchi H (1992) Cyclosporin A inhibits the decrease of CD4/CD8 expression induced by protein kinase C activation. *Int Immunol* 15(4):419-426
- Ophir R., Pecht M., Rashid G., Halperin D., Lourie S., Brusteim Y., Ben-Efraim S. y Trainin N. (1990). A synthetic thymic hormone, THF- γ 2, repairs immunodeficiency of mice cured of plasmacytoma by melphalan. *Int. J Cancer* 45: 1190-1194.
- Ophir R., Pecht M., Halperin D., Rashid G., Brusteim Y, Benefraim S. y Trainin N., (1989). THF- γ 2, a thymic hormone, increases immunocompetence and survival in 5-fluorouacil trated mice bearing MOPC-315 plasmacitoma. *Cancer Immunol Immunother* 30:119-125.
- Paul W., (1993) *Fundamental Immunology*. Ed. Raven Press New York p 75-109; 467-496.
- Picker J.L.(1994) Control lymphocyte homing *Curr Op Immunol* 6:394-406
- Plamondon C., Kottis V., Brideau C., Métroz-Dayer M.D. y Poussier P. (1990) Abnormal thymocyte maturation in spontaneously diabetic BB rats involves the deletion of CD4⁺8⁺ cells. *J Immunol* 13:187-163
- Rager-Zisman B., Zuckerman F., BenHarroch D., Pecht M., Burteim Y. y Trainin N., a(1990). Therapy of a fatal murine cytomegalovirus infection with thymic humoral factor (THF- γ 2) treated immune spleen cells. *Clin. Exp Immunol* 97:426-252.
- Rincon M., y Flavell R.A.(1997) T-cell subsets:transcriptional control in the Th1/Th2 decision, *Curr Biol* 7:729-732.
- Rocha B., Vassalli P., y Guy-Grand D., (1992) The extrathymic T-cell development pathway. *Immunol Today* 13(11):449-454.
- Rocha B., Guy-Grand D. y Vassilli P. (1995) Extratimic T cell differentiation. *Curr OP Immunol* 7:235-242
- Robey E.A., Fowlkes B.J. Gordon J.W., Kioussis D., von Boehmer H., Ramsdell F., y Axel R., (1991) Thymic selection in CD8 transgenic mice supports an instructive model for commitment to a CD4 or CD8 lineage. *Cell* 64, 99-107.

- Rodewald H-R. (1995) Pathways from hematopoietic stem cells to thymocytes. *Curr Opin Immunol* 7:176-187
- Roitt I., Brastoff J. y Male D. (1996). The acquired immune response IV-development en: *Immunology*. cuarta edición ED. Mosby. p 134-153.
- Sakai T., Agui T., Maramatsu Y., Yamada T y Matsumoto K. (1993) Dissociation of interleukin-2 production from the cell activation in response to the mitogenic lectin in peripheral CD4⁺ T cell of LEC mutant rats. *J Immunol* 79:491-497.
- Scollay R. y Godfrey D.I. (1995) Thymic emigration conveyor belts or lucky dips. *Immunology Today* 16(6):268-272
- Shinkai Y., Koyasu S., Nakayama K., Murphy K M., Loh D Y., Reinherz E.L. y Alt F.W., (1993) Restoration of T cell development in RAG-2 deficient mice by functional TCR transgenes. *Science* 259, 822-825.
- Shmid I., Uittenbogaart C. H., Keld B. y Giorgi J.V. (1994) A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry. *J Immunol Methods* 170:145-157.
- Schockmel G.A., Somoza Ch., Davis S.J., Williams A.F. y Healey D. (1992) Construction of a binding site for human immunodeficiency virus type 1 gp120 in rat CD4. *J Exp Med* 175:301-304.
- Small M., Trainin N. y Aronson M. (1989). Influence of a thymic hormone on cultured epithelial cell of the thymus. *Thymus* 13:227-235.
- Smithson, G, Medina, K., Ponting, Y., Kincade, PW. (1995), Estrogen suppresses cell-dependent lymphopoiesis in culture. *J. Immunol.* 155: 3409-3417
- Swat W., Ignatowicz L., von Boehmer H., y Kisielow P., (1993) CD69 expression during selection y maturation of CD4⁺8⁺ Thymocytes. *Eur. J. Immunol* 23 739-746.
- Swat W., Ignatowicz L. y Kisielow P. (1991). Detection of apoptosis of immature CD4⁺8⁺ thymocytes by flow cytometry. *J Immunol Methods* 137:79-87.
- Takimoto H., Nakamura T., Tekeuchi M., Sumi Y., Tanaka T., Nomoto K. y Yoshikai Y. (1992). Age-associated increase in number of CD4⁺CD8⁺ intestinal intraepithelial lymphocytes in rats. *J Immunol* 159-164
- Touhg D.F., y Sprent J. (1995) Thymic emigration a reply *Immunol Today* 16(6) 273-274.
- Trainin N., Handezel Z. T. Y Pecht M (1985) Biological and clinical propieties of THF. *Thymus* 7:137-150.
- Trainin N., Pecht M. y Handzel Z.T. (1983). Thymic hormones:inducers and regulators of the T-cell system. *Immunol Today* 4(31):16-21
- Trainin N. y Linker-Israeli M. (1967). Restoration of immunologic reactivity of thymectomized mice by calf thymus extracts. *Cancer Res* 27(1);309-313

- Trainin N. (1990) Prospects of AIDS therapy by thymic humoral factor a thymic hormone, *Nat Immun Cell Growth Regul* 9:155-159
- Tsushima M., Konishi M., Takai K., Naito K., Fujikura Y. y Fukumoto T. (1994) Effects of irradiation, glucocorticoid and FK506 on cell-surface antigen expression by rat thymocytes: a three-colour flow cytometric analysis. *J Immunol* 83:469-475.
- Umiel T., Pecht M. y Trainin N. (1984) THF, a thymic hormone, promotes interleukin-2 production in intact and thymus-Deprived mice. *J Biol Res* 3:423-434.
- Urdahl K.B., Pardoll D.M. y Jenkins M.K. (1994) Cyclosporin A inhibits positive selection and delays negative selection in ab TVR transgenic Mice. *J Immunol* 152:2853-2858.
- van Ewijk W (1991) T cell differentiation is influenced by thymic microenvironments. *Annu Rev Immunol* 9:591-615
- von-Boehmer H.(1986) The selection of the α,β , heterodimeric T cell receptor for antigen. *Immunol Today* 7, 333-336.
- von-Boehmer H.(1990) Developmental biology of T cell receptor transgenic mice. *Ann Rev Immunol*. 8-531-556274
- von-Boehmer H.V, (1994) Positive selection de lymphocytes. *Cell* 96:263-27
- Ward S.G., Cantrell D. y Westwick J. (1988) Inhibition by staurosporine of mitogen-induced calcium mobilisation in human T lymphoblasts *FEBS Letters* 239(2):363-366.
- Weiss A. y Littman D.R. (1994) Signal transduction by lymphocyte antigen receptor. *Cell* 96 :263-274
- Zijstra M., Bix M., Simister N. E., Loring J.M., Raulet D.H., y jaenisch R., (1990) b2-microglobulina deficient mice lack CD4-8+ cytotoxic T cell. *Nature* 344, 742.
- Zipori D. y Trainin N. (1975) The role of a thymic humoral factor in the proliferation of bone marrow CFU-S from thymectomized mice. *Exp Hemat* 3:389-398
- Zlotnik, A. y Moore, T.A. (1995) Development T cell. *Cell* 286:123-135..
- Zúniga-Pflücker y Lenardo M.J. (1996) Regulation of thymocyte development from immature progenitors *Curr Op Immunol* 8:215-224.

10.- ANEXOS

TABLA 10.- Análisis del fenotipo de las subpoblaciones de timocitos de rata recién nacida en cultivo.

| | | <u>Porcentaje de células *</u> | | | |
|----------------|----------|--------------------------------|----------|----------|--|
| <u>CONTROL</u> | | | | | |
| Tiempo (h) | DN | DP | CD4 | CD8 | |
| 1 | 11.2±0.5 | 76.6±0.9 | 7.2±0.4 | 4.90±0.4 | |
| 2 | 8.71±0.5 | 79.1±0.3 | 5.4±0.3 | 6.71±0.3 | |
| 4 | 15.3±0.6 | 58.8±2.8 | 16.2±3 | 9.52±0.4 | |
| 8 | 13.4±0.4 | 63.6±0.3 | 7.3±0.1 | 15.5±0.3 | |
| 12 | 6.70±0.3 | 69.5±0.2 | 10.1±0.2 | 13.6±0.2 | |
| 18 | 4.01±0.1 | 71.6±0.8 | 14.3±0.4 | 9.91±0.2 | |
| 24 | 2.16±0.2 | 85.6±1.7 | 5.6±1.7 | 6.53±0.9 | |
| 36 | 2.13±0.3 | 84.5±0.3 | 5.2±0.5 | 8.16±0.3 | |
| 48 | 4.60±1.6 | 80.9±1.2 | 5.1±0.6 | 8.90±1.2 | |
| 72 | 11.1±1.2 | 75.3±3.2 | 4.1±0.2 | 7.71±0.6 | |
| 96 | 19.5±1.5 | 72.8±4.1 | 3.2±0.1 | 6.50±1.4 | |
| <u>THF-γ2</u> | | | | | |
| | DN | DP | CD4 | CD8 | |
| 1 | 11.5±0.2 | 74.9±0.9 | 7.8±0.6 | 5.7±0.4 | |
| 2 | 8.80±0.6 | 78.9±1.0 | 5.3±0.05 | 6.9±0.3 | |
| 4 | 14.3±2.7 | 50.0±8.6 | 5.8±1.7 | 8.3±1.6 | |
| 8 | 12.9±0.3 | 65.4±0.6 | 6.5±0.5 | 14.9±0.4 | |
| 12 | 6.30±0.2 | 70.7±0.8 | 10.2±4.3 | 12.7±0.2 | |
| 18 | 4.31±0.3 | 70.9±0.6 | 13.3±2.4 | 11.4±0.6 | |
| 24 | 2.23±0.4 | 85.1±0.9 | 5.86±0.2 | 6.73±1.2 | |
| 36 | 2.40±0.2 | 84.5±1.2 | 5.03±0.1 | 8.1±0.7 | |
| 48 | 4.91±1.2 | 82.1±2.4 | 5.0±0.7 | 8.7±1.0 | |
| 72 | 11.9±0.9 | 76.3±3.6 | 4.3±0.9 | 6.5±0.1 | |
| 96 | 18.9±2.4 | 73.4±2.8 | 3.0±0.05 | 5.45±1.4 | |

*Los timocitos fueron cultivados realizando ensayos curso temporales, en medio RPMI suplementado, a 37° C, 5% de CO₂ y 95% de aire. La fenotipificación en base a la expresión de moléculas CD4 y CD8 se realizó por citometría de flujo de dos colores. Los valores representan el valor promedio de 3 experimentos diferentes por duplicado ± la desviación estándar respectiva.

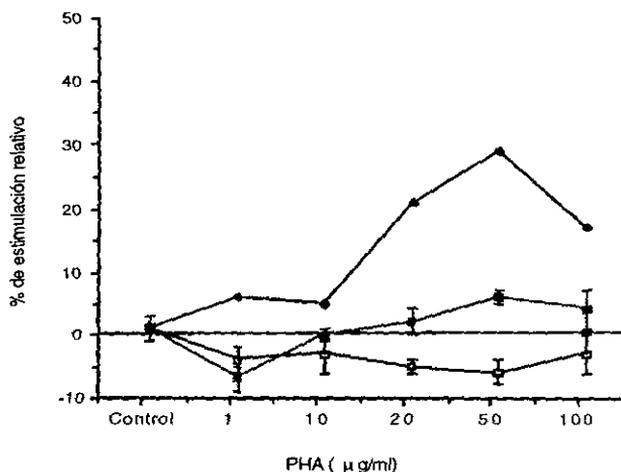


Figura 15.- Efecto de PHA sobre la proliferación de timocitos de rata recién nacida. Realizando un curva dosis-respuesta y un curso temporal . Los timocitos fueron cultivado en medio RPMI suplementado a 37° C, 5% de CO₂ y 95% de aire en presencia de 0.5 mCi/ml de [³H]-timidina. Durante 24, 48 y 72 h respectivamente. Las células se cosecharon , después de cada uno de los tiempos indicados, se digirieron con NaOH y triton-X100, se les añadio liquido de centelleo y fueron analizadas. 24 h (□) 48 h (○) 72 h (■).

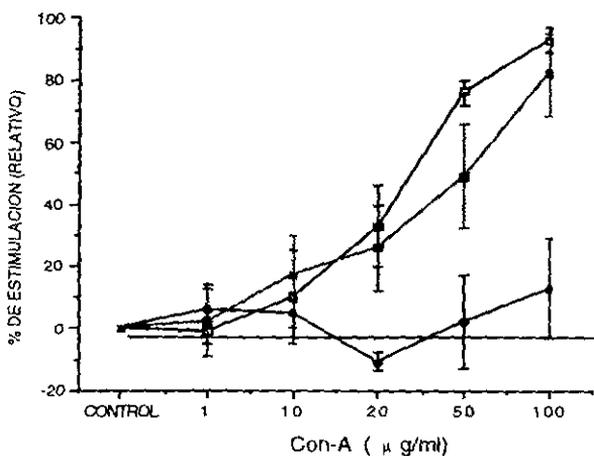


Figura 16.- Efecto de Con-A sobre la proliferación de timocitos de rata recién nacida. Realizando un curva dosis-respuesta y un curso temporal . Los timocitos fueron cultivado en medio RPMI suplementado a 37° C, 5% de CO₂ y 95% de aire en presencia de 0.5 mCi/ml de [³H]-timidina. Durante 24, 48 y 72 h respectivamente. Las células se cosecharon , después de cada uno de los tiempos indicados, se digirieron con NaOH y triton-X100, se les añadio liquido de centelleo y fueron analizadas. 24 h (□) 48 h (■) 72 h (○).

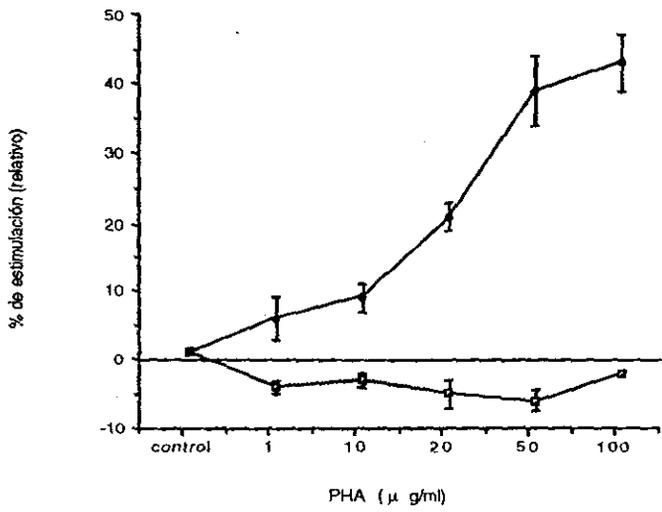


Figura 17.- Efecto de PHA sobre la proliferación de timocitos de rata recién nacida y células de bazo . Realizando un curva dosis-respuesta a 24 h. Las células fueron cultivado en medio RPMI suplementado a 37° C, 5% de CO₂ y 95% de aire en presencia de 0.5 mCi/ml de [³H]-timidina. Durante 24 h, Las células se cosecharon , después de cada uno de los tiempos indicados, se digirieron con NaOH y triton-X100, se les añadió liquido de centelleo y fueron analizadas. Timocitos (□) células de bazo (○).