

51262

1
2ej



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

Facultad de Estudios Superiores
"Zaragoza"
División de Estudios de Posgrado

**EVALUACION DEL ESTADO INMUNOLOGICO DEL RATON
DESNUDO et/et (*Mus musculus et/et*)**

Tesis presentada por:
MVZ Francisco Javier Basurto Alcántara

Para obtener el grado: **Maestro en Ciencias en Biología**

de los Sistema Humanos

Director: M en C Rubén Marroquín Segura

Co-tutores: Dra. Patricia Rosas Saucedo (interno)

Dr. Juan Antonio Montaraz Crespo (externo)

Realizada en: Laboratorio de Inmunología de
la Facultad de Estudios Superiores "Zaragoza"

México, D. F.

1996

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

Agradecimientos

Al Honorable Jurado:

Dr. Juan Garza Ramos por sus valiosos comentarios en la revisión del presente trabajo.

Dr. Rubén Marroquín Segura ya que sin su asesoría y ayuda no hubiera sido posible el desarrollo de esta tesis.

A los **Drs. Juan Antonio Montaraz Crespo y Patricia Rosas Saucedo** por sus valiosos comentarios y paciencia en la revisión de esta tesis.

A la **M Sc. María José Marques Dos Santos**, por la asesoría brindada en los estudios estadísticos y revisión del presente trabajo.

Al Personal del Instituto Nacional de Diagnóstico y Referencia Epidemiológico (**INDRE**), por la donación y asesoría en el manejo de las cepas de *Toxoplasma gondii* y *Leishmania mexicana* así como en la asesoría técnica en citofluorometría:

Dr. Oscar Velazco Castrejón
QBP, M en C Beatriz Rivas
QBP Beatriz Ortega E.
M. en C. Juan Padierna Olivos

Al Personal de los laboratorios de Biología Molecular y Serología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ, UNAM, por su apoyo en la realización de técnicas serológicas y de electroforesis:

MVZ Daniel Atilano López
MVZ Lourdes Ruiz Cortés
MVZ Myrna A. Vicencio Mallén
Sr. Mario Cruz Cruz

A la **MVZ Rosa Luz Mondragón** del Laboratorio Clínico de la FMVZ, UNAM por su asesoría y participación en el desarrollo de hemogramas de ratón.

Agradezco y dedico el presente trabajo a las **Dras. Aurora Velázquez E. y Laura Patricia Noé M.** por sus valiosos comentarios en la redacción de este trabajo y su apoyo para motivarme a terminarlo.

A todo el personal técnico del Bioterio de la FES Zaragoza y en especial al **Sr. Jorge Salgado García** por el apoyo brindado en la crianza y mantenimiento de los animales empleados en el presente trabajo.

A todo el personal académico y administrativo del departamento de Microbiología e Inmunología de la FMVZ de la UNAM por el apoyo, asesoría y estímulo para seguir adelante.

A todos aquéllos que de alguna forma, directa o indirecta, participaron, apoyaron o me impulsaron a terminar el presente trabajo.

A los ratones que fueron el objeto de este estudio.

A todos ellos

Gracias!!!

Dedicatorias

A mi esposa Ady Marucia Ángel Cárdenas, por su amor, apoyo, paciencia y compañía.

A mis hijas Ady Marucia y América Itzel Basurto Ángel por ser la verdadera causa de haber terminado este trabajo y que esto sea un estímulo para que siempre se superen en la vida.

Las quiero mucho.

A mis padres **Rodolfo Basurto Victoria y Guadalupe Teresa Alcántara de Basurto** por la confianza que siempre han depositado en mi.

A mis hermanas **María Antonieta, María del Pilar y María Alejandra** por el cariño que siempre me han manifestado.

A mis sobrinos **Iñiqui, Andoni e Irune** por sus travesuras y maldades que hacen que me olvide de problemas triviales.

Dedico en especial esta tesis a la memoria de:

Mis Abuelitos Sr. Jesús Alcántara de la Vega y María Olalde de Alcántara.

A los Drs.:

Fernando Olgún Romero quien seguramente habría participado como co-tutor o jurado de esta tesis

Manuel de Jesús Gómez Peyret que siempre me estimuló a seguir adelante

por quienes siempre sentí admiración y respeto.

A todos aquéllos a quienes les venga el saco

A MIS AMIGOS

(Alberto Cortés)

A mis amigos les adeudo la
ternura
y las palabras de aliento y el
abrazo,
el compartir con todos ellos la
factura
que nos presenta la vida paso a
paso.

A mis amigos les adeudo la
paciencia
de tolerarme las espinas más
agudas,
los arrebatos del humor,
la negligencia, las vanidades,
los temores y las dudas.

Un barco frágil de papel,
parece a veces la amistad,
pero jamás puede con él
la más violenta tempestad,
porque ese barco de papel
tiene aferrado a su timón,
por capitán y timonel:
un corazón, mi corazón.

A mis amigos les adeudo algún
enfado
que perturbara alguna vez
nuestra armonía
sabemos todos que no puede ser
pecado

el discutir alguna vez por la
Thalía.

A mis amigos legaré cuando me
muera
mi devoción en un acorde de
guitarra
y entre los versos olvidados de
un poema
mi pobre alma incorregible de
cigarra.

Un barco frágil de papel,
parece a veces la amistad,
pero jamás puede con él
la más violenta tempestad,
porque ese barco de papel
tiene aferrado a su timón,
por capitán y timonel:
un corazón, mi corazón.

Amigo mío si esta copla como el
viento,
a donde quieras escucharla te
reclama
serás plural porque no exhibe el
sentimiento
cuando se llevan los amigos en
el alma.

ÍNDICE

I.- RESUMEN	3
II.- INTRODUCCIÓN	6
MARCO TEÓRICO	8
LINFOCITOS, MACRÓFAGOS Y GRANULOCITOS	8
PROCESO DE ONTOGENIA Y DIFERENCIACIÓN LINFOCITARIA	12
INFECCIÓN Y PROCESO INFLAMATORIO	14
BIOLOGÍA DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA UN INMUNÓGENO	17
RESPUESTA INMUNE CELULAR	23
RESPUESTA INMUNE HUMORAL	23
RATONES DESNUDOS	25
EL RATÓN DESNUDO ATÍMICO nu/nu	25
EL RATÓN DESNUDO et/et	26
JUSTIFICACIÓN	28
HIPÓTESIS	28
OBJETIVOS Y METAS	28
III.- MATERIALES Y MÉTODOS	30
1.- DETERMINACIÓN DE LA NORMALIDAD DE LEUCOCITOS, CUENTAS DIFERENCIALES, HEMATOCRITO Y PROTEÍNAS SANGUÍNEAS DE RATONES CD1, et/+ y et/et	30
2.- EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD DE RESPUESTA INMUNE EN LOS RATONES CD1 et/+ y et/et	33
IV.- RESULTADOS	36
V.- DISCUSIÓN	50
VI.- CONCLUSIONES	58
VII.- LITERATURA CITADA	60

I.-RESUMEN

El empleo de especies animales como modelos de estudio ha contribuido a dar respuesta a una gran cantidad de problemas relacionados con la inmunología y otras áreas biológicas; esto ha generado un crecimiento en las tecnologías de producción de animales de experimentación y un aumento del número cepas de animales con características genéticas bien definidas. En este estudio se analizó el estado de una nueva mutante de ratones desnudos conocidos como *et/et* (*Mus musculus et/et*), la cual durante la crianza se ha observado que manifiesta signos de inmunodeficiencia, tales como: predisposición a procesos infecciosos y parasitarios, una involución anticipada del timo; asimismo se han estudiado otras características fisiológicas, entre las que se tienen: Hipertrofia adrenal con hipersecreción glucocorticoide y una maduración sexual retardada. Tomando como base las observaciones durante la crianza y las que han sido producto de las investigaciones, se decidió evaluar el estado inmunológico del ratón desnudo *et/et* y compararlo con los **CD 1**, cepa de la cual surgió y con los heterocigóticos identificados como *et/+*, mediante la determinación de las constantes fisiológicas de: Número de leucocitos, linfocitos, monocitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos; poblaciones de linfocitos **CD4+**, **CD8+**, **CD3+**, relación **CD4+:CD8+**; hematocrito, proteínas plasmáticas; porcentaje de las fracciones electroforéticas de proteínas séricas. También se evaluó la respuesta inmune humoral hacia: toxoplasmas, leishmanias, eritrocitos de camero (**GRC**) y albúmina sérica bovina (**BSA**). Los conteos leucocitarios y diferenciales mostraron que en las poblaciones de leucocitos, linfocitos, monocitos y eosinófilos fueron significativamente mayores en los ratones *et/et* que en los **CD 1** y no hubo diferencias con los *et/+*. En las poblaciones de basófilos, neutrófilos en banda y segmentados tampoco se observaron diferencias en el número de células circulantes entre los tres genotipos de ratones, sin embargo en los ratones desnudos el 89% presentaron hipersegmentación de neutrófilos, mientras que solo el 10% de los heterocigóticos lo manifestó y no se observó en los ratones **CD 1**. El estudio de los marcadores de superficie mostró que los ratones *et/et* presentaron diferencias en la población de linfocitos T totales **CD3+** y en los **CD8+**, siendo superiores a los **CD 1** y sin diferencia con los *et/+*. Los valores en el hematocrito fueron mayores en los ratones *et/et* y *et/+* respecto a los **CD 1**. En la cuantificación de proteínas plasmáticas, los ratones *et/et* presentaron

menor concentración con relación a los ratones CD 1. Al estudiar las proporciones de las fracciones electroforéticas de las proteínas del suero, no se observaron diferencias significativas del porcentaje de las fracciones entre las tres variedades de ratones, pero si se encontro que los machos *et/et* presentan una concentración significativamente mayor a las hembras *et/et* en la fracción alfa globulina. Al inocular a los ratones con *Toxoplasma gondii* se observó que los *et/et* no se afectaron como las otras dos variedades, ya que comían, bebían y se mantenían más activos durante la infección; en la valoración de anticuerpos contra el parásito se pudo apreciar que no hubo diferencias significativas en la concentración de Ig M pero si las hubo con la Ig G siendo el valor de lectura 0.165 para los ratones *et/et* y 0.095 para los CD 1. En los animales infectados con *Leishmania mexicana* se observó que las tres variedades son resistentes al parásito, ya que después de un mes desaparecían las lesiones en el cojinete plantar y no fue posible su reaslamiento. En cuanto a la evaluación por aglutinación de la respuesta inmune humoral contra glóbulos rojos de carnero, no hubo diferencias significativas en los títulos de anticuerpos, pero las muestras de suero obtenidas de los ratones *et/et* presentaron fenómenos de zona al realizar la prueba. En el estudio de formación de placas hemolíticas no se encontraron diferencias significativas pero si las hubo con respecto al número de células linfoides en bazo, donde se observó que los ratones *et/et* presentaron 51 células/ μ l contra 97.5 en los ratones CD 1, mientras que los *et/+* presentaron un valor intermedio. En la evaluación de la respuesta inmune contra BSA no se encontraron diferencias significativas en el título de IgM pero si las hubo con las IgG, correspondiendo el valor menor a los ratones *et/et* y el mayor a los CD 1. Con el análisis de resultados se concluye: a) en los ratones *et/et* la hipotimia no afecta los mecanismos de respuesta celular y humoral, lo cual podría explicarse por la existencia de algún mecanismo de diferenciación extratímica. b) La diversidad de respuestas de IgM e IgG observadas contra los antígenos utilizados en este trabajo permiten sugerir la existencia de un desbalance en la síntesis de linfocinas de los subgrupos de linfocitos T cooperadores de los ratones *et/et*, donde las citocinas del subgrupo 1 se encuentran en mayor concentración que las del subgrupo 2. c) La predisposición a procesos infecciosos que han sido observados en los ratones *et/et* y la presencia de neutrofilos con hipersegmentación es indicativo de un trastorno de la fagocitosis causada por las concentraciones de glucocorticoides reportadas en otros trabajos. d) La leucocitosis que presentan los ratones *et/et* y la

linfopenia que hay en bazo es indicativo de una malfunción de las moléculas de adhesión como las adhesinas o selectinas en los leucocitos o en órganos linfoides.

II.- INTRODUCCIÓN

El ratón (*Mus musculus*) es una especie que por sus características biológicas (corto periodo de vida y de gestación, alta prolificidad, bajo consumo de alimento, costos reducidos en su mantenimiento etc.) ha sido ampliamente utilizado como modelo experimental en diferentes áreas de la ciencia, entre ellas la Inmunología. Melvold (1986) señala que se conocen cerca de 1500 cepas y subcepas con características bien definidas (63).

Las cepas de animales de laboratorio se han obtenido básicamente de tres formas: Por mutaciones espontáneas, inducidas o por manipulación genética por cruzas consanguíneas

Las mutaciones espontáneas, llegan a ser un dilema para el productor de los animales de laboratorio, ya que pueden no manifestarse a la vista, o bien expresar cambios que obligan a desechar animales (42).

La inducción de mutaciones se logra mediante las tecnologías de la ingeniería genética como la transgenia, las cuales consisten en la inserción de pequeñas porciones de ADN cromosómico en un huevo fecundado de una especie determinada utilizando microinyectores antes de que se fusione el pronúcleo masculino con el pronúcleo femenino, quedando de esta forma, la característica implantada en la nueva generación de animales (42).

La obtención de cepas por manipulación genética es la que se realiza conforme a una necesidad bien definida iniciando la purificación genética mediante sistemas de cruzas consanguíneas y retrocruzas hasta lograr manifestar el o los genes que codifiquen para la característica buscada (63).

Las variedades más empleadas en el estudio de la Inmunología son los que presentan problemas con el sistema inmunocompetente, por ejemplo los ratones desnudos atímicos con el gen *nu* que carecen de respuesta celular; los que nacen con la inmunodeficiencia combinada severa (**SCID**); los ratones con el gen *bg* que se caracteriza por una inmunodeficiencia de células NK; ratones con el gen *hr* que son alopecicos y presentan leucemia; los ratones con el gen *lpr* se asocia con linfoproliferación, hipergammaglobulinemia; los ratones con el gen *me* presentan lesiones

subepidérmicas, con afectación del color de pelo y piel, deficiencia de células B en Bazo; el gen *xid* se manifiesta en los ratones con una respuesta defectuosa de las células B a los antígenos timoindpendientes, entre otros y que todos estos han contribuido a conocer los mecanismos por medio de los cuales se desarrollan diversas enfermedades incluyendo el cáncer bajo un régimen de inmunodeficiencia (42, 46, 63).

Otros ratones se crían por su capacidad para producir ciertas linfocinas o interleucinas, o por su capacidad de resistencia a las infecciones parasitarias o su susceptibilidad a padecer estas enfermedades (63).

Los usos que actualmente se les da a los animales de laboratorio son múltiples y se pueden resumir en 4 grandes grupos:

- 1.- Investigación
- 2.- Docencia
 - a) dar objetividad a un proceso
 - b) capacitación
- 3.- Producción de biológicos
- 4.- Constatación y control de calidad de fármacos y biológicos.

MARCO TEÓRICO

LINFOCITOS, MACRÓFAGOS y GRANULOCITOS.

Los mecanismos de respuesta inmune son integrados por linfocitos y anticuerpos, monocitos y macrófagos (MφS) y granulocitos, los cuales son células y proteínas que componen al sistema inmunocompetente y fagocítico-mieloide (52, 59, 81, 93). Su participación es fundamental en los procesos inmunológicos (59, 75, 81, 93).

La actividad de estas células es regulada por sustancias endógenas como las linfocinas, hormonas esteroidales como: glucocorticoides, dehidroepiandrosterona, testosterona, estrógenos, progesterona y la Vitamina D3, hormonas tiroideas e insulina o también pueden estar influidas por sustancias exógenas como lipopolisacáridos bacterianos, exotoxinas bacterianas, azúcares de hongos como el zymosan-A, proteínas virales, o cualquier otro polímero orgánico de estructura compleja (1, 2, 3, 5, 7, 10, 13, 17, 19, 22, 26, 28, 36, 44, 52, 58, 59, 62, 67, 81, 92, 93, 102).

LINFOCITOS.-

Los linfocitos son células pequeñas, mononucleares, sin gránulos citoplasmáticos; poseen un diámetro entre 6 y 10 μm, su cromatina se tiñe de azul intenso con el colorante de **Wright**. Con frecuencia se observan al microscopio linfocitos más grandes que se llegan a confundir con los monocitos, siendo la diferencia la relación volumen citoplásmico-núcleo, así como la presencia de cordones en la paracromatina (29, 51, 81, 93).

Se han logrado distinguir varios tipos de linfocitos de acuerdo a la actividad que realizan y a los marcadores de superficie que presentan, entre los que tenemos a los linfocitos B con inmunoglobulinas en su superficie, los linfocitos T cooperadores con el marcador **CD 4**, linfocitos T citotóxicos con el marcador **CD 8** (6, 7, 51, 81, 93).

Algunas teorías proponen la presencia de una subpoblación de linfocitos T supresores (24) y de hipersensibilidad retardada; sin embargo, actualmente se sabe que los efectos supresores e inflamatorios de los linfocitos no son producidos todos por una variedad específica de células sino que las

linfocinas producidas por las variantes linfoides dan una gran diversidad de acciones reguladoras, tal es el caso del Interferón gamma (IFN γ) el cual puede potencializar la respuesta inmune tanto celular como humoral y puede a su vez inhibirla cuando disminuye la presentación de antígenos (5, 23, 28, 37, 49, 59, 67 y 89).

Así mismo se ha observado que el efecto regulador del IFN γ depende de su concentración en la sangre, teniendo como efecto inmunestimulante a las bajas concentraciones y como inmunosupresor a las altas cantidades circulantes (32, 40, 87).

Actualmente se han encontrado linfocitos T cooperadores con el marcador CD4+ y CD8+; También se han encontrado cierta exclusividad en la secreción de linfocinas por lo que se les ha identificado con las variantes 1, 2, 3 y p (LTc1, LTc2, LTc3 y LTcp) (20, 48, 51, 59).

Todos estas células presentan en común antígenos de histocompatibilidad de clase I (51, 59, 90).

También se ha mostrado que puede ocurrir la diferenciación extratímica de los linfocitos, siendo su principal diferencia el tipo de cadenas de aminoácidos que conforman a las moléculas receptoras de antígeno (TCR), siendo para este caso las cadenas γ y δ , a diferencia de las fijadas en timo que son α y β (6,7, 61, 71, 81, 99). Este fenómeno en un principio causó controversia al estudiar a los ratones desnudos atímicos ya que se pensaba en la existencia de un rudimento tímico, el cual promovía la diferenciación celular. Sin embargo en 1992 Rocha et.al. (80) presentaron las pruebas que demuestran que los linfocitos se pueden diferenciar extratímicamente en algunos otros órganos linfoides secundarios, como es el bazo, la piel (70), la lengua (71) y el hígado (99).

MACROFAGOS.-

Los monocitos corresponden a los macrófagos circulantes, son las células de mayor tamaño en la circulación sanguínea (14-20 μ m) (29). Contienen un solo núcleo, lobulado en forma de riñón. Presenta un citoplasma abundante. Su vida media en circulación es de 1 a 3 días, después se dirige

a los tejidos donde se transforma a macrófago, aumentando de tamaño (20-40 μm) donde permanece hasta poco más de 60 días (29, 81).

La capacidad fagocítica de estas células se incrementa por la acción del $\text{IFN}\gamma$ producido por los linfocitos, el cual al fijarse en su receptor membranar es internalizado para promover la síntesis de ARN mensajero y promover con esto el número y calidad de las enzima lisosomales, el número de lisosomas, un incremento considerable en el número de receptores membranales y mayor capacidad de desplazamiento intratisular. Una gran cantidad de linfocinas actúan sobre estas células modificando ampliamente su comportamiento en los proceso de resistencia a las enfermedades (37, 51, 59, 86, 89).

Los macrófagos también producen citocinas como las Interleucinas 1, 6, 8, 12 (**IL-1, IL-6, IL-8, IL-12**) y también algunos componentes del sistema del complemento (**C'**) (51, 93).

Toda la línea de macrófagos también participan en los procesos de regulación de la respuesta inmune ya que estos se encargan de activar a la hormona Sulfato de Dehidroepiandrosterona (**DHEAS**) a dehidroepiandrosterona (**DHEA**) por la síntesis de la enzima esteroide-sulfatasa (40). La **DHEA** es una hormona de la corteza adrenal encargada de regular la síntesis de **IL-2** de los **LTc1** que a su vez regula la producción de **IFN- γ** , **IL-6** e **IL-10** (40).

GRANULOCITOS.-

En este grupo celular existen tres variantes que son los neutrófilos, eosinófilos y basófilos.

Los granulocitos neutrófilos son células medianas de 12 μm en promedio, mayores que los basófilos y menores que los eosinófilos y monocitos. El núcleo se tiñe intensamente con el colorante de **Wright** y presenta diversas formas, desde un núcleo redondo en células inmaduras (mielocitos), forma de banda en los juveniles y de 2 a 5 lóbulos en las células viejas (29).

El neutrófilo posee gránulos en su citoplasma, los cuales se tiñen de un rosa pálido con el colorante de Wright. Su vida media en circulación llega a ser de 6 días (29).

Los gránulos se clasifican en dos grupos:

1.- gránulos azurófilos que contienen hidrolasas ácidas, fosfatasa ácida, α -glucuronidasa, peroxidasa, muramidasa o lisozima y proteínas catiónicas antibacterianas

2.- granulaciones neutrófilas específicas, que contienen fosfatasa alcalina, muramidasa, lactoferrina y colagenasa (29).

El neutrófilo es una de las células más activas en cuanto a fagocitosis, responde a los estímulos quimiotácticos, participa, entre otras importantes funciones, en los procesos de hipersensibilidad tipo III (68, 73, 92, 93).

En las cuentas leucocitarias durante procesos infecciosos se observa un incremento en la relación de bandas contra segmentados. Su maduración y capacidad de migración se ven afectadas negativamente por la actividad de los glucocorticoides (29).

Los granulocitos eosinófilos presentan un tamaño promedio de 13 μm de diámetro, presentan granulaciones de mayor tamaño que los neutrófilos que se tiñen de color rojo brillante con colorantes que contengan eosina (29).

El núcleo se ve raras veces debido a los gránulos, sin embargo se tiñe menos intensamente que los neutrófilos. Sus gránulos contienen peroxidasas, hidrolasas ácidas e histaminasas. Participan tardíamente en los procesos inflamatorios y se incrementa su número en los procesos de hipersensibilidad tipo I (29, 88, 89, 93).

Una de sus probables funciones es que participan en la regulación negativa de los procesos histamínicos (88).

Los granulocitos basófilos son células de un tamaño menor que los neutrófilos, con gránulos de mayor tamaño que se tiñen con colorantes básicos, al igual que los eosinófilos el núcleo rara vez es visible (29, 82, 89, 93).

Sus gránulos contienen heparina o sustancias pseudoheparínicas, histamina así como 5-hidroxitriptamina (Serotonina) (81, 89, 93).

Los basófilos, a diferencia de otros granulocitos, sus gránulos no son lisosomas; son capaces de fijar a la Ig E en su membrana causando la degranulación por reacciones antígeno anticuerpo, en procesos atópicos de hipersensibilidad tipo I, mediante la activación de los canales α -adrenérgicos que promueven el ingreso de calcio a la célula (51, 59, 81, 89, 93).

PROCESO DE ONTOGENIA Y DIFERENCIACIÓN LINFOCITARIA.

En los mamíferos el timo y la médula ósea son los órganos linfoides primarios responsables de la producción y maduración o diferenciación de los linfocitos (6, 7, 8, 9, 16, 50, 51, 52, 58, 59, 81, 89, 93).

El timo se deriva embriológicamente del III saco faríngeo. Está formado por una serie de lóbulos de células epiteliales, donde cada lóbulo está cubierto por una cápsula de tejido conectivo (10, 59).

La parte externa de cada lóbulo, llamada corteza, muestra una densa infiltración de linfocitos, mientras que en la médula se observan las células epiteliales con claridad (51, 59, 81, 89, 93).

La irrigación sanguínea y el tránsito celular va de la porción cortical a la medular (51, 59, 81, 89, 93).

El timo produce una serie de hormonas, las cuales, entre otras actividades, comprenden los mecanismos de diferenciación de los linfocitos, estimulando la aparición de los marcadores de superficie de la serie CD (*Cluster de Diferenciación*) (v.gr. CD2, CD4, CD8, CD 11, CD 18, CD 45 etc.) así como la formación de receptores membranales para hormonas, linfoquinas y antígenos (3, 7, 8, 13, 16, 17, 52, 58, 59, 71).

Los linfocitos son las únicas células que cuentan con receptores para todas las hormonas del organismo (4, 15, 36, 59).

En el feto joven, las células linfoides son formadas inicialmente en la membrana del saco vitelino, y luego en el hígado. En el feto mayor o a término y en los animales adultos, la fuente de células linfoides es la médula ósea (10, 28, 59, 65, 100).

Una vez que se han formado las células, estas se dirigen a los órganos linfoides primarios, siendo esta acción controlada por las hormonas timosina $\beta 3$ y $\beta 4$, las cuales inducen la transformación de linfocito indiferenciado en protimocito (58, 100).

Posteriormente, una vez que ha ingresado el protimocito a la corteza del timo se une a las células nodriza y se inicia la transformación a timocito lo cual indica el comienzo de la diferenciación de la célula (59).

Las hormonas que participan en este proceso son la timosina fracción 5 y las timosinas $\alpha 1$ y $\alpha 7$ (58).

En el proceso de maduración de los timocitos se observa la aparición y desaparición de antígenos de superficie, los cuales al parecer reaccionan con su medio ambiente promoviendo la diferenciación de los linfocitos (3, 7).

También se ha observado en ratones la aparición temprana de receptores para IL-2 en células CD 4- y CD 8- (6,8).

Una observación que se realizó en cultivos de timo es que la IL-2 recombinante promueve la diferenciación temprana de los timocitos (8).

En animales viejos, donde el timo ha involucionado, se puede dar una diferenciación extratímica, la cual al parecer está dada por el factor tímico sérico o timulina (17).

Los linfocitos derivados del timo realizan básicamente dos funciones, una corresponde a la actividad efectora y la otra a su capacidad reguladora (24, 39, 48, 59).

Las funciones efectoras se caracterizan por la reactividad que presentan para el rechazo de aloinjertos, respuesta a hipersensibilidad tardía,

inmunidad tumoral, donde la respuesta es manifiesta por la producción de linfocinas o por la actividad citotóxica de los linfocitos T (26, 54, 55, 59, 70).

Las funciones reguladoras se manifiestan por el control de la citotoxicidad de las células T y producción de anticuerpos, y que también están influenciadas por la liberación de linfocinas. Así mismo estos efectos reguladores pueden participar activamente en los mecanismos de producción de células de la médula ósea como es la acción de la IL-3 y el factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) sobre la producción de PMN's y MφS(28 39, 48, 57, 59).

INFECCIÓN Y PROCESO INFLAMATORIO

El sistema inmune manifiesta diversas actividades para mantener la homeostasis del organismo, entre estas encontramos la defensa contra agentes infecciosos, los cuales, dependiendo de sus mecanismos de patogenicidad podrán causar daño (5, 54, 75, 81).

Los mecanismos de defensa se pueden clasificar en dos grandes grupos, los cuales son los mecanismos de resistencia y los mecanismos de defensa específicos y con memoria, siendo estos últimos conocidos como inmunidad (81, 85).

Los mecanismos de resistencia inespecíficos es la primer barrera a la que se enfrentan los agentes infecciosos para tratar de hacer daño (85, 89).

Si el microorganismo patógeno logra establecerse y multiplicarse en algún órgano o tejido del cuerpo, se dice que hay una infección (79).

El agente infeccioso causa daño al organismo mediante la activación de sus mecanismos de patogenicidad, los que se pueden dividir en dos grandes grupos que son la invasividad y la toxigenicidad (79).

Los agentes invasivos se caracterizan por su habilidad para multiplicarse y diseminarse en el organismo y se dividen en dos grandes grupos que son los que evaden la fagocitosis y los que la resisten (79). En términos muy generales se puede afirmar que los microorganismos que evaden la

fagocitosis causan enfermedades agudas, mientras que los que la resisten producen enfermedades crónicas (79).

La toxigenicidad se refiere a la capacidad de producir daño mediante la producción y liberación de toxinas (93).

Cuando ingresa un agente infeccioso al organismo, se activan una serie de mecanismos de defensa inespecíficos, como son la vía alterna del complemento, la inflamación y la fagocitosis, los cuales tiene por objetivo la destrucción y eliminación de la partícula agresora (75, 81, 93).

El sistema del complemento está constituido por una serie de proteínas que interactúan concatenadamente para destruir al agente patógeno. Durante su activación libera fracciones de proteína que toman otra actividad biológica como sería estimular la fagocitosis con factores quimiotácticos y de opsoninas y el de promover la inflamación mediante la estimulación de los canales alfa adrenérgicos de las células cebadas causando con esto la liberación de aminas vasoactivas y otros mediadores químicos de la inflamación (81).

La inflamación son cambios en la permeabilidad vascular de los tejidos para permitir el paso de proteínas plasmáticas y leucocitos a los sitios de daño. Tiene diversas actividades tales como: drenar venenos, promover la captura de partículas exógenas, estimula la actividad de los fibroblastos para la cicatrización, elimina células dañadas por traumatismos, estimula la contracción del músculo liso para la eliminación de parásitos intestinales y pulmonares, entre otros, pero una de las funciones más importantes de la inflamación desde el punto de vista inmunológico es la de captar antígenos para permitir la sensibilización de los linfocitos (81, 89).

La inflamación se inicia, por los cambios vasculares que ocurren cuando los mediadores químicos se liberan las células cebadas (histamina, 5-hidroxitriptamina, tromboxanos, prostaglandinas, leucotrienos), de los linfocitos (Interleucina 2, Interferón γ Factor inhibidor de la migración de los macrófagos) o de los Macrófagos (Interleucina 1, Interferón α) (78, 81, 89, 93).

El primer evento que ocurre por la liberación de estas sustancias es una vasodilatación, lo cual permite la extravasación de líquidos sanguíneos al sitio de daño para permitir así la diapedesis leucocitaria (14).

Las primeras células en llegar son los neutrófilos, los cuales son las células fagocíticas más activas. También se inicia la activación de las proteínas de la coagulación para proveer de un cinturón de fibrina y evitar con esto que el microorganismo se disemine por los tejidos conexos (14, 81).

En la mayoría de las infecciones con estos eventos es suficiente para controlar al agente y evitar que la infección se convierta en enfermedad infecciosa (89).

Sin embargo hay ciertos eventos en los que se requiere el apoyo de otras células fagocíticas y de linfocitos, por lo que estos liberan otros factores quimiotácticos para macrófagos y así se inicia la migración de estos a la zona afectada junto con linfocitos (81, 92, 93).

El macrófago inicia la fagocitosis promoviendo la adhesión de su membrana a la superficie del agente, posteriormente procederá a englobarlo y formar así el fagosoma, la cual es la vacuola fagocítica que contiene al agente infeccioso (79).

Una vez formado el fagosoma se inicia la destrucción del agente, el cual puede ser por dos mecanismos, uno es la explosión respiratoria por la producción de superóxidos (H_2O_2 ; OH, etc.) y el otro es por enzimas digestivas contenidas en los lisosomas (79, 97).

Cuando el agente ya ha sido digerido, el macrófago sintetiza antígenos de histocompatibilidad de clase II a los que unirá los epítopos de los restos del agente para poder presentarlos a los linfocitos T cooperadores (79, 81).

De los agentes infecciosos que resisten la fagocitosis tenemos que los *Mycoplasmas* permiten la adhesión a la membrana del macrófago pero evitan ser ingeridos; el género *Salmonella* resiste la producción de superóxidos; las bacterias del género *Mycobacterium* inhiben la fusión fagosoma-lisosoma impidiendo así ser digeridas; los protozoarios como el *Toxoplasma* y *Leishmania* resisten a las hidrolasas lisosomales; y por

último tenemos a microorganismos como las *Legionella* y los *Tripanosoma* que escapan del fagosoma evitando con esto su destrucción (79).

BIOLOGÍA DE LA RESPUESTA INMUNE CONTRA UN INMUNÓGENO

La sensibilización de los linfocitos es variada y depende de la naturaleza química del antígeno, así como las células y citocinas que participen (23, 26, 38, 43, 49) .

En los procesos de sensibilización una de las células más importantes aunque es prescindible, es la célula presentadora de antígenos (CPA) la cual interactúa con los linfocitos en su activación (11, 31, 81).

La CPA produce **IL-1**, generando con esta la activación de los linfocitos **T** y **B**, también estimula al hipotálamo para la producción del factor liberador de las corticotropinas para promover la liberación de la hormona adrenocortico-trópica (**ACTH**), que induce la liberación de glucocorticoides en la corteza adrenal. Por otro lado la **IL-1** puede actuar sobre los centros termorreguladores en el hipotálamo promoviendo fiebre, induce también la producción de endorfinas causando sedación y sueño (4, 5, 66, 92, 95).

La CPA también puede generar otras interleucinas que modifican la actividad de los linfocitos, tal es el caso de la **IL-4**, **IL-6** que actúan sobre los linfocito **B**, la **IL-8** la cual es un poderoso factor quimiotáctico para células fagocíticas, y la **IL-12** que sinergiza con el **IFN- γ** de los linfocitos en el control y erradicación de parásitos intracelulares mediante la activación de la fagocitosis (21, 31, 49, 59, 81).

La activación de los linfocitos **B** puede ocurrir básicamente de tres formas 1.- la captación de antígeno libre por parte del linfocito mediante sus anticuerpos de membrana (**BCR**), 2.- por el contacto membranal con una CPA o 3.- por la colaboración con citocinas de un linfocito **T** cooperador, principalmente del subgrupo 2 que libera **IL-4** e **IL-6** (21, 22, 31, 59, 61, 81, 93).

El linfocito **B** se puede sensibilizar mediante la captura antígeno libre con su **BCR**; cuando el linfocito se activa de esta forma se transforma en célula

de memoria y célula plasmática la que dará respuesta inmune humoral con la producción de IgM (81).

Se puede dar la sensibilización del linfocito B en la interacción con un macrófago o CPA que haya fijado el EPITOPO al antígeno de histocompatibilidad de clase II (MHC-II), con lo que se conforma una interacción identificable por el BCR del linfocito (59, 81, 89, 93). Cuando el EPITOPO es presentado a un linfocito B por esta vía, la CPA libera IL-1 e IL-6 que promueve la activación del linfocito estimulando la síntesis de proteínas y este se diferencia en célula plasmática y célula de memoria. La célula plasmática inicia la liberación de anticuerpos que pueden ser de la clase IgM, IgA, o IgG (12, 31, 59, 61, 81, 89, 93).

Cuando el antígeno es timodependiente y requiere de la participación de los linfocitos T cooperadores el linfocito B puede ser activado mediante la interacción con interleucinas de los linfocitos T CD4⁺ del subgrupo 2. La IL-4 promueve la síntesis de IgE y de IgG1, mientras que la IL-6 estimula la síntesis de IgA, IgM e IgG₂. Cuando se lleva a cabo este mecanismo de activación de linfocitos B la respuesta inmune es más duradera (31, 81, 93).

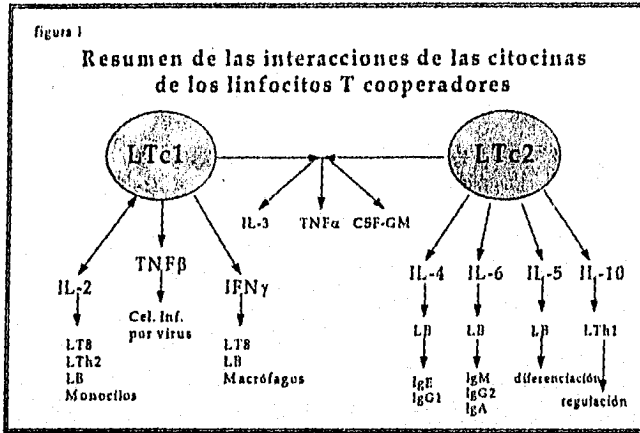
En la respuesta de tipo celular la presentación de antígenos puede ser ante un linfocito T cooperador CD4⁺ de los subgrupos 1, 2, 3 o p, así como a un linfocito T citotóxico CD8⁺ (81).

Si el EPITOPO es presentado a un linfocito CD 4⁺, este se unirá a la CPA mediante la interacción del TCR-EPITOPO-MHC-II y otras moléculas de adhesión como la Molécula-1 de adhesión intracelular (ICAM-1) con el antígeno-1 funcional de linfocitos (LFA-1), mientras que el CD2 actúa con el LFA-3, las cuales darán estabilidad a la interacción celular (14, 26, 59, 81, 89, 93).

Los efectos de la respuesta inmune en la sensibilización de un linfocito T cooperador depende del subgrupo que participe en las interacciones membranales con la CPA (48, 59, 81, 89).

La diferencia entre los subgrupos de linfocitos T cooperador radica en el tipo de citocinas que liberan, donde tenemos que el subgrupo 1 produce la IL-2, IFN γ , y factor de necrosis tumoral β (TNF β) las cuales participan

activamente en los procesos de respuesta inmune celular, mientras que el subgrupo 2 libera IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, las cuales van directamente asociadas con la promoción de síntesis de proteínas en los linfocitos B para la producción de anticuerpos, activación de células cebadas, basófilos y eosinófilos para promover y regular procesos de hipersensibilidad tipo I; el subgrupo 3 sólo produce IL-2 y el subgrupo p sólo se le ha identificado con la producción del factor de necrosis tumoral (TNF β) por otro lado tenemos que los subgrupos 1 y 2 de linfocitos producen el TNF α , IL-3 y el factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) (figura 1) (48, 59).



Existe la hipótesis de la existencia de un precursor para los subgrupos el cual se ha identificado con el número 0 y que produce todas las variedades de citocinas (59).

La CPA responde a los estímulos del IFN- γ de los linfocitos T cooperadores del subgrupo 1, el cual ha demostrado ser una de las citocinas más activas e importantes para el sistema inmune (86).

El IFN se descubrió por sus propiedades antivirales de donde recibió el nombre de INTERFERÓN porque *interfería* con la replicación viral al estimular la síntesis de una proteína que inhibe la transcripción del ARN mensajero viral (86). Posteriormente se encontraron variantes bioquímicas de la molécula (23, 40, 59, 81), a las cuales se les asoció con otras propiedades, una de ellas es la activación de M ϕ S que consiste en

potencializar su acción fagocítica, incrementado el número de lisosomas, la calidad de las enzimas lisosomales, estimula el metabolismo oxidativo en monocitos y $M\phi S$, lo que ha sido un factor fundamental en la eliminación total de parásitos intracelulares como las mycobacterias, toxoplasmas, legionelas, brucelas, histoplasmas, tripanosomas etc.; induce la expresión de **MHC-II** en todas las células presentadoras de antígeno (88); promueve la formación de receptores membranales para la porción F.c. de las inmunoglobulinas, incrementando con esto la actividad fagocítica y citotoxicidad mediada por anticuerpos que realizan las células K y linfocitos T citotóxicos; sinergiza con la **IL-6** para incrementar la síntesis de **IgG 2**, antagoniza con la **IL-4** para inhibir el "switch" a la síntesis de **Ig E** (49). Se han estudiado las propiedades antitumorales de los interferones mediante dos mecanismos básicos: 1.- por el estímulo que produce sobre las células NK y $M\phi S$ para estimular la síntesis y liberación del factor de necrosis tumoral (TNF) y actuar sinérgicamente con este y 2.- porque inhibe el crecimiento celular (59).

Por último, al **IFN** se le ha asociado con efectos inmunorreguladores los cuales dependen de la presencia y tipo de antígeno (59, 81, 86, 88, 89, 93, 98).

Se han detectado 3 variantes del **IFN** los cuales se identifican con las tres primeras letras griegas, siendo el α producido por los leucocitos, el β por los fibroblastos y células somáticas y el γ producido por los linfocitos τ y ω (23, 40, 59, 86).

Se podría pensar que el **IFN** es el eje de la regulación de la respuesta inmune, sin embargo la producción de este obedece a la liberación de otra linfocina, la **IL-2** (19, 20, 21).

Daynes et. al. mencionan que la desregulación del sistema inmune en ciertos estados patológicos del organismo (Infección por HIV, osteoporosis, enfermedades autoinmunes, senilidad, cáncer, etc.) es causado por variaciones en la concentración de **IL-2**, y también agrega que cuando disminuye la producción de esta linfocina tiende a aumentar la síntesis de **IFN- γ** , de **IL-6**, **TNF α** y β , alterando con esto la homeostasis del organismo (19, 20, 21).

La disregulación de la IL-2 es producto de la baja en la producción de una hormona de la corteza adrenal, la cual es la dehidroepiandrosterona (DHEA) (19,20,21).

Durante la presentación de antígenos, el linfocito T cooperador al recibir el estímulo de la IL-1 reacciona produciendo la IL-2 la cual tiene el efecto de factor de crecimiento promoviendo la expansión clonal de los linfocitos T CD 8+ y sobre los linfocitos B; promueve la activación de monocitos, e incrementa los efectos citotóxicos de las células NK (11, 48, 59).

La IL-2 también tiene un efecto autócrino sobre el linfocito T regulando la secreción de otro producto que es el factor de necrosis tumoral TNF β (linfotóxina), el cual actúa principalmente causando la lisis de células infectadas por virus (48, 59).

Tanto el subgrupo 1 como el 2 de los linfocitos T cooperadores producen también TNF α al cual se le ha asociado a la presencia de un signo clínico frecuente en ciertos padecimientos en los cuales la respuesta de tipo celular es fundamental y este es la caquexia, la cual se manifiesta como un deterioro general del individuo con una severa disminución del peso corporal y reducción del volumen de tejido muscular (48, 59, 67).

Los linfocitos T cooperadores del subgrupo 2 producen la IL-4, 5 y 6, las cuales presentan un poderoso efecto en la activación, diferenciación de linfocitos B y síntesis de anticuerpos (48, 59).

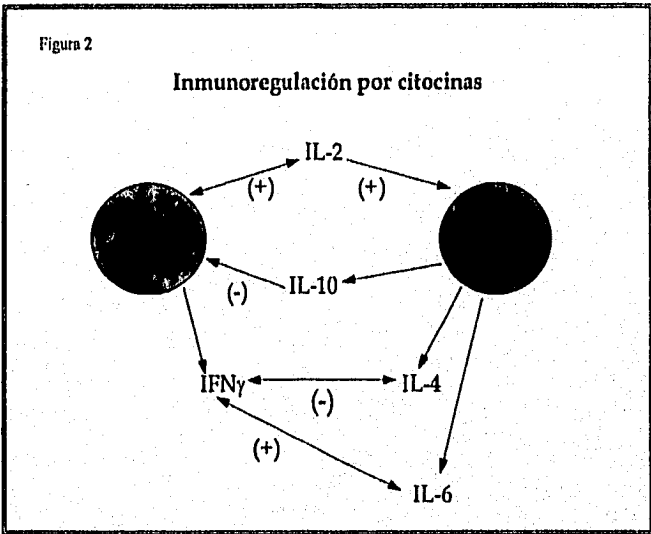
La IL-4 promueve que el linfocito B modifique el tipo de cadenas pesadas de los anticuerpos, de μ a ϵ y γ_1 lo cual se manifestará en la producción de Ig E e IgG₁ (34, 59).

Se ha demostrado que la IL-4 es un antagonista del IFN γ y se encuentra directamente relacionada con la respuesta a los alérgenos así como en los individuos atópicos (48, 59); existen variedades de ratones, como la Balb/c que producen la IL-4 en niveles mayores que otros ratones y que presentan una predisposición natural a las infecciones por parásitos intracelulares

como las bacterias del género *Mycobacterium*, *Brucella*, *Mycoplasmas*, protozoarios como el género *Leishmania* entre otros (12, 34, 35, 56, 57, 98).

La **IL-6** promueve la diferenciación de los linfocitos **B** a célula plasmática, induce la síntesis de cadenas μ , α y γ_2 , incrementa la síntesis de anticuerpos de la clase **IgM**, **Ig A** e **Ig G₂**, potencializa los efectos de la **IL-4** promueve la actividad efectora de los linfocitos **T** citotóxicos también puede estimular la síntesis de proteínas a nivel de hígado y su regeneración (12, 21, 59, 89) sinergiza con el **IFN- γ** , y en estados de disregulación donde haya un incremento considerable de la **IL-6**, activa a los osteoclastos produciendo osteoporosis en ratonas (21)

En la **figura 2** se presenta un resumen de las interacciones de las citocinas en la regulación de la respuesta inmune, donde el signo (+) indica la estimulación celular o sinergismo de citocinas y el (-) indica la supresión celular o antagonismo de citocinas.



La **IL-5** induce la diferenciación temprana del linfocito **B** a célula plasmática así como la maduración de eosinófilos (59, 81).

Otra citocina de interés es la IL-12, la cual es producida por MφS y linfocitos B, que ha demostrado tener un efecto de activador de los linfocitos T cooperadores del subgrupo 1, sinergiza con el IFN γ lo cual se manifiesta en un incremento en la resistencia a las parasitosis por patógenos intracelulares, promueve la expansión clonal de los linfocitos T citotóxicos, así mismo tiene una poderosa actividad reguladora negativa sobre el subgrupo 2 de linfocitos T cooperadores, al que inhibe en la síntesis de IL-4 (59).

La activación de los linfocitos T citotóxicos CD8+ obedece a las interacciones membranales del TCR con epítopes biosintetizados presentados en el contexto del MHC I. La sensibilización ocurre cuando contactan estas moléculas; la célula citotóxica responde con la producción de perforinas o moléculas tipo TNF, con lo que promoverá la destrucción de células infectadas por virus, tumorales etc. (59, 81).

El linfocito T citotóxico también se puede activar por la vía de la cooperación celular mediante la recepción membranal de IL-2 producida por el linfocito T cooperador del subgrupo 1, la cual promueve la síntesis de sustancias citotóxicas además de promover el crecimiento de la clona (59, 81, 93).

RESPUESTA INMUNE CELULAR

Como se ha visto, el proceso de activación de los linfocitos T es complejo ya que es debido a la gran interacción molecular que ocurre entre las membranas celulares y las citocinas que se producen, sin embargo se puede decir que las sustancias que promueven directa o indirectamente la destrucción del antígeno en una respuesta inmune de tipo celular puede ser de tres clases 1.- Citólisis por TNF β y perforinas las cuales principalmente actúan en contra de células infectadas por virus, 2.- Necrosis por TNF α que afecta principalmente a células tumorales y células alogénicas y 3.- Activación de la fagocitosis por IFN- γ que consiste en un incremento de la citotoxicidad por células fagocíticas en la defensa contra agentes infecciosos que resisten la fagocitosis (59, 81, 89, 93, 94).

RESPUESTA INMUNE HUMORAL

Una vez que ha quedado sensibilizado un linfocito B se inicia la respuesta inmune (59, 81, 89, 93).

La respuesta de tipo humoral consiste en la síntesis de anticuerpos, donde la clase variará según la especie, dependencia tímica del antígeno y de la influencia parácrina de las citocinas (12, 33, 59, 76).

Una vez que se han liberado los anticuerpos, estos se unirán al antígeno, produciendo así una reacción antígeno-anticuerpo (R-Ag-Ac) (59, 81, 89, 93).

Los efectos biológicos variarán dependiendo de la clase de inmunoglobulina y del sitio donde haya ocurrido la reacción por lo que tenemos:

1.- Reacciones de neutralización: estas consisten en la unión del anticuerpo a un receptor del antígeno o cualquier otro sitio activo, con lo que la molécula identificada como extraña al organismo pierde toda actividad biológica. Comúnmente ocurre contra virus, exotoxinas bacterianas y microorganismos móviles (59, 81, 89, 93).

En este mismo tipo de reacciones podemos encontrar a las aglutininas, las cuales se manifiestan mediante la formación de conglomerados a causa de una R-Ag-Ac. Este tipo de efecto se observa cuando los anticuerpos están dirigidos contra células o cualquier otro cuerpo particulado (por ejemplo: bacterias, eritrocitos, espermatozoides, partículas de látex etc.) (59, 81, 89, 93).

Otra actividad neutralizante es la producida por las precipitinas, siendo producida por una R-Ag-Ac que precipita. Este fenómeno se observa cuando la inmunidad va dirigida contra proteínas (por ejemplo: en la enfermedad del suero) (59, 81, 89, 93).

2.- Reacciones de citotoxicidad humoral: esta es una R-Ag-Ac que induce a la fijación del complemento, el cual destruirá a cualquier tipo de célula (59, 81, 89, 93).

El sistema del complemento está integrado por una serie de proteínas con un poderoso efecto ionizante que causa perforaciones (efecto de Donnan) en la porciones externas de las células (cápsulas, paredes, membranas), produciendo con esto cambios en la presión osmótica que deriva en el estallamiento de la célula, pero este es el menor de los efectos biológicos ya que durante su activación se liberan fracciones de las moléculas originales y que toman otra actividad como la de producir inflamación al promover la liberación de aminas vasoactivas de las células cebadas y basófilos, o de actuar como factores quimiotácticos para atraer a las células fagocíticas al sitio de daño, o simplemente funcionar como opsoninas para facilitar la fagocitosis (59, 81, 89, 93). Las proteínas del complemento son sintetizadas en los $M\phi S$, hígado y células epiteliales del intestino (93).

3.- Reacciones de opsonización: las células fagocíticas sintetizan receptores para la porción F.c. de las inmunoglobulinas, facilitando la fagocitosis del antígeno que se encuentre unido a los anticuerpos (59, 81, 89, 93).

4.- Anticuerpos reagínicos: son las inmunoglobulinas que tienen la propiedad de unir su porción F.c. a la membrana de células cebadas o de basófilos. Al producirse la R-Ag-Ac estimula la actividad de los canales α -adrenérgicos, promoviendo el ingreso de calcio a la célula, causando con esto que se degranule y libere las aminas vasoactivas generando así un estado inflamatorio. Este es el principal mecanismo de eliminación de parásitos intestinales y de reacciones alérgicas. Los anticuerpos involucrados en este tipo de reacción son las IgE (34, 48, 59, 81, 89, 93).

RATONES DESNUDOS

EL RATÓN DESNUDO ATÍMICO "nu/nu"

La primera publicación relacionada con los ratones desnudos fue en el año 1962 por J.H. Isaacson y B.M. Cattanach, quienes describieron la aparición de ratones sin pelaje en una colonia cerrada, no consanguínea, de ratones albinos suizos, la cual era mantenida en el laboratorio de virología del hospital Ruchill en Glasgow, Escocia. En 1966 el Dr. S.P. Flanagan describió el comportamiento genético del ratón desnudo y lo asoció a la presencia de un gen autosómico recesivo al que denominó "nude" (desnudo) cuyo símbolo genético es *nu* (42, 84).

En 1968 , E. M. Pantelouris describió que los ratones homocigóticos recesivos para el gen (*nu/nu*) carecen de timo, mientras que los hermanos de camada heterocigóticos (*nu/+*) y homocigóticos dominantes (*+/+*) presentaban timo normal. Describió una marcada leucopenia en los (*nu/nu*) (815-3300 leucocitos/dl) mientras que los hermanos (*+/+*) presentaron hasta 4 veces los valores leucocitarios y otros presentaron un número intermedio a los que se les consideró heterocigóticos. Por este método de conteo leucocitario se puede definir la heterocigosis de los ratones (*nu/+*) (42, 84).

Se han presentado algunas otras mutaciones relacionadas tanto con la alopecia como con inmunodeficiencias (42, 93).

Se han descrito animales desnudos en los cuales su función inmunológica no se ha visto comprometida como en algunos cobayos y ratones como los *sha/sha* ("Shave" rasurado) los cuales poseen sus funciones inmunológicas normales (42) .

Se han realizado cruzas entre los ratones desnudos (*nu/nu*) y otras ratones portadores de defectos inmunológicos como el gen *Di* que produce asplenia y el híbrido produce un doble mutante (*Di/nu*) denominado "lasat mouse" (42).

EL RATÓN DESNUDO *et/et*

El ratón *et/et* fue observado por primera vez en 1985 en una colonia cerrada no consanguínea de ratones **CD 1** en el bioterio de la **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**, la cual en ese entonces era la **Escuela Nacional de Estudios Profesionales Zaragoza de la UNAM**(84).

El sistema de producción es semejante al empleado en los ratones desnudos *nu/nu*, el cual consiste en:

- 1.- Producción de portadores: se aparean un macho *et/et* con 2 o 3 hembras **CD 1**. De las crías resultantes se seleccionan las hembras quedando identificadas como portadoras con el símbolo *et/+*, mientras que los machos son desechados.

2.- Producción de ratones *et/et*: se aparean 2 o 3 hembras *et/+* con un macho *et/et*. Al nacer las crías se eliminan los machos portadores, los cuales son identificados por la distancia ano-genital mayor y por la presencia de vibrisas. Las crías restantes solo habrá machos y hembras *et/et* y hembras portadoras, las cuales servirán para el reemplazo del pie de cría.

Regularmente no se emplean hembras *et/et* en el pie de cría ya que la mayoría de las crías mueren después de algunas semanas de vida, como consecuencia de la deshidratación, además de que se ha observado que sólo pueden producir una camada.

Durante el estudio de los ratones *et/et* se ha observado que:

En animales adultos los machos se caracterizan por presentar un timo histológicamente igual al de los ratones normales, pero con un tamaño y peso menor por lo que se les definió como hipotímicos, mientras que las hembras presentan un rudimento tímico, el cual se asemeja histológicamente a un nódulo linfoide por lo que están catalogadas como atímicas (82, 84). Estudios recientes muestran que las características histológicas del timo en la hembra se presentan sólo en la etapa adulta pero no en la prepuber.

En animales jóvenes al destete, la única observación macroscópica es el tamaño más reducido del órgano. Sin embargo se ha observado que estos animales presentan un período de vida mayor a los (*nu/nu*) en condiciones convencionales de mantenimiento y no hay diferencias entre el ratón CD 1 y el *et/et* en lo que respecta al rechazo de xenoinjertos (Rosas et al.) (82, 84).

Durante el desarrollo de la colonia se ha observado tanto en machos como en hembras, una marcada susceptibilidad a problemas cutáneos como abscesos, dermatitis bacteriana y dermatomicosis así como un incremento en la frecuencia de parasitosis por *Eimerias sp.* neumonías y uveitis (cataratas) y signos clínicos de envejecimiento prematuro, con lo que se

puede deducir que existe una falla en los mecanismos de respuesta inmunológica¹.

JUSTIFICACIÓN:

Debido a las características que presenta el ratón desnudo *et/et*, que manifiesta irregularidades en el desarrollo del timo, se considera importante evaluar el estado inmunológico de esta variedad de ratón y de esta forma proporcionar la información básica necesaria para que sea empleado como modelo de estudio para conocer los mecanismos que se vinculen con las alteraciones del timo. Por lo que se propone evaluar la respuesta inmune así como algunas constantes fisiológicas asociadas al sistema inmunocompetente de este ratón mutante.

HIPÓTESIS:

Debido a que el ratón desnudo *et/et* presenta una hipotimia macroscópica y una elevada incidencia de problemas infecciosos en piel, deberá presentar variaciones en las poblaciones celulares de leucocitos (principalmente en los linfocitos), así como inmunodeficiencias en los mecanismos de respuesta inmune.

OBJETIVOS

Conocer el estado inmunológico que caracteriza al ratón desnudo hipotímico (*Mus musculus et/et*) comparado con los ratones CD 1 y heterocigóticos portadores (*et/+*) mediante:

- 1.- Analizar las constantes fisiológicas de poblaciones celulares y proteínas séricas en los ratones desnudos *et/et*, en los *et/+* y CD 1.
- 2.- Estudiar la respuesta inmune ante antígenos como los glóbulos rojos de carnero (GRC) y la albúmina sérica bovina (BSA) en los ratones desnudos *et/et*, en los *et/+* y CD 1.
- 3.- Evaluar la respuesta hacia parásitos como el *Toxoplasma gondii* y *Leishmania mexicana* en los ratones desnudos *et/et*, en los *et/+* y CD 1.

¹ observaciones obtenidas durante la crianza de los ratones utilizados en el presente estudio, aún no publicadas.

METAS

1.- Evaluación de la normalidad de células sanguíneas mediante la aplicación de las metodologías de:

- biometría hemática y cuentas diferenciales
- citofluorometría de flujo

2.- Evaluación de la normalidad de proteínas sanguíneas mediante:

- densitometría
- electroforesis en acetato de celulosa

3.- Evaluación de la respuesta inmune contra **GRC** y **BSA** mediante:

- aglutinación
- ELISA
- hemólisis en placa

4.- Evaluación de la respuesta hacia parásitos mediante:

- ELISA
- observaciones clínicas.

III.- MATERIALES Y MÉTODOS

El presente proyecto se dividió en dos partes: La primera fue para evaluar las constantes fisiológicas de las poblaciones celulares y proteínas séricas, y la segunda fue para evaluar la respuesta inmune a diversos antígenos.

Se emplearon animales adultos de 2 a 3 meses de edad, clínicamente sanos, mantenidos bajo las condiciones de bioterio descritas en "Guide to the care and use of experimental animals" y en Guía de procedimientos adecuados de uso y cuidado de animales de laboratorio y bioterio (72, 91) con control de ciclo de luz oscuridad, cambio de cama de viruta de madera 4 veces por semana, agua y alimento comercial *ad libitum*.

Antes de iniciar cualquier prueba, los animales fueron seleccionados, marcados y colocados en jaulas de acrílico, divididos en grupos de 10 ratones por jaula y separados según su sexo y variedad; se les practicaron análisis coproparasitoscópicos; se les observó durante una semana antes de iniciar cualquier procedimiento para verificar la ausencia de enfermedades en proceso. Al finalizar cada trabajo se sacrificaron y se les practicaron necropsias al azar.

Los animales fueron identificados según su variedad en: ratones normales CD 1, ratones desnudos hipotímicos *et/et* y los heterocigóticos o portadores *et/+*.

1.- Determinación de la normalidad de leucocitos, cuentas diferenciales, hematocrito y proteínas sanguíneas de ratones CD 1, *et/+* y *et/et*.

- Metodología de conteos leucocitarios y cuentas diferenciales (18):

-Obtención de sangre: mediante punción cardiaca utilizando una jeringa con aguja del No. 27 y con anticoagulante EDTA al 1.5% en solución salina fisiológica (S.S.F.).

- se preparó una dilución 1/20 con ácido acético glacial al 2% para la eliminación de eritrocitos y se mezcló por agitación 3 segundos.

- se llenó el hemocitómetro y se hizo el conteo de las células utilizando los cuadros grandes de las esquinas

- El cálculo de la población de células se obtuvo por la formula:

$$\text{Recuento de leucocitos (cel/mm}^3\text{)} = \left(\frac{cc}{cgc}\right)(d)(10)$$

donde cc es el número total de células contadas, d es el factor de dilución, 10 es el factor que transforma la superficie de los milímetros cuadrados a volumen en milímetros cúbicos y cgc es el número de cuadros grandes contados

- Para la cuenta diferencial se realizó un frotis en cubreobjetos, se tizó con colorante de **Wright** y se observó al microscopio contando 100 células nucleadas y diferenciándolas en: monocitos, linfocitos, neutrófilos segmentados, neutrófilos en banda, eosinófilos y basófilos. El número obtenido corresponde al porcentaje de células. utilizando el número total de leucocitos y mediante una regla de tres se hizo la conversión de porcentaje a No. total de células por ml.

-los resultados se evaluaron mediante las pruebas: **U de Mann-Whitney** y el análisis de varianza de **Kruskall-Wallis** (60, 64).

- **Determinación del hematocrito (18):**

- Se llenó un capilar con sangre con anticoagulante y se selló al fuego por uno de los extremos.

- Se centrifugó en una centrifuga para microhematocrito.

- Se hizo la valoración utilizando una regla de lectura de microhematocrito, ajustando la regla al 100% en el volumen total de sangre y se obtuvo el porcentaje del paquete celular.

-los resultados se evaluaron mediante las pruebas: **Análisis de Varianza (ANDEVA)** seguido de la prueba de **Tukey**, mientras que para las diferencias por sexo se aplicó la prueba de **t de Student**(60, 64).

-**Determinación de las poblaciones de linfocitos T CD4+, CD 8+ y CD3+ mediante técnicas de citofluorometría de flujo (según manual de usuario).**

- Se utilizaron 60 ratones, los cuales se distribuyeron de la siguiente forma: -10 machos CD 1, 10 hembras CD 1, 10 machos et/+, 10 hembras et/+, 10 machos et/et, 10 hembras et/et

- Se tomaron muestras de 1 ml de sangre con EDTA.

- Se utilizaron 4 tubos para trabajar cada muestra de sangre, los cuales fueron rotulados con la leyenda:

-tubo 1.- absoluto, tubo 2.- CD3, tubo 3.- CD4, tubo 4.- CD8

- para evitar daños celulares se colocaron los tubos en un baño de hielo.

- en cada tubo según su etiqueta se colocó 4µl de conjugado anti CD3, anti CD4 y anti CD8 (Serotec ®).

- a cada lote de tubos se le adicionaron 50µl de sangre de la muestra correspondiente y se agitaron

- se incubaron los tubos 30 minutos en baño frío a 4°C con agitaciones cada 10 minutos.

- se agregaron 2 ml de lisante ortho para eliminar los eritrocitos y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente.

- se centrifugaron las muestras a 1500 r.p.m. durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante con una bomba de vacío.

- el paquete celular se resuspendió en solución salina amortiguadora de fosfatos y

- se obtuvo la lectura del porcentaje de cada subpoblación en un citofluorómetro de flujo marca "Cytron Absolute Ortho Auto Biosampler®" ajustando el *gate* manualmente a cada grupo de animales según su variedad genética

- Los valores que se evaluaron estadísticamente con las metodologías de Kruskal-Wallis y U de mann-Whitney (60, 64), fueron: población de linfocitos CD3+ (Totales), CD4+, CD8+ y proporción CD4:CD8.

- Determinación de la concentración de proteínas plasmáticas (18).

-Se colocó una gota de plasma en un densitómetro, la lectura se realizó utilizando la escala de valores con que cuenta el aparato donde el valor de la densidad es equivalente a la concentración de proteína plasmática por cada 100 ml de sangre.

--los resultados se evaluaron mediante las pruebas: **Análisis de Varianza (ANDEVA)** de un factor al azar seguida de una prueba de **Tukey**

para diferencias entre grupo y la prueba T de Student para muestras independientes para las diferencias entre sexo (60, 64).

- **Determinación de la concentración de las fracciones séricas mediante electroforesis zonal en acetato de celulosa (69).**

-Obtención de la muestra de suero: se realizó mediante la punción del seno infraorbitario con tubo capilar, dejando coagular la sangre y centrifugando a 3000 r.p.m. durante 15min..

-Técnica electroforética: se aplicó la muestra sobre la tira activada de cellogel se contacta con los electrodos con solución amortiguadora tris-barbital o tris-glicina, se aplicaron 200 volts con 7.5 mA durante 30 min.

- Interpretación: se tiñó el gel con colorante de Ponceau y se decoloró con solución lavadora a base de agua-metanol-ácido acético. Se pasó a una solución transparentadora a base de ácido acético y se lee en un espectrodensitómetro con graficador.

- Los resultados se evaluaron estadísticamente mediante el análisis de varianza de **Kruskal-Wallis** y la prueba de **U de Mann-Whitney** (60, 64).

2.- Evaluación de la capacidad de respuesta inmune

- **Respuesta humoral contra parásitos intracelulares (*Toxoplasma gondii*)**

-se inocularon ratones **CD 1 et/+** y **et/et** con **toxoplasmas** que se obtuvieron de una semilla donada por el Instituto Nacional de Laboratorios de Referencia y Epidemiología (**INDRE**)y se hicieron los pases en ratón.

-se inoculó 0.2 ml del líquido ascítico de los ratones infectados a ratones limpios, ajustando el inóculo al tubo No. 2 del nefelómetro de McFarland. Se dejaron en reposo por 4 días y se obtuvo suero sanguíneo para la determinación de la concentración de anticuerpos mediante la técnica de **ELISA** (69).

- Técnica de **ELISA**: el antígeno de *Toxoplasma gondii* (45) se adsorbió en los pozos de placas de poliestireno (**Nunclon**®).

- la placa se bloqueó con albúmina sérica bovina al 1% en **SSAF** para prevenir cualquier reacción inespecífica.

- se colocaron los sueros de los animales inoculados en diluciones de 1:40 y 1:80, y se lavó tres veces con solución salina amortiguadora de fosfatos-tween (SSAF-tween).

- se agregó el conjugado de anticuerpos de cabra anti-Ig M o anti-Ig G de ratón unidos a peroxidasa de rábano picante (Serotec ®) y se eliminan los excedentes mediante lavados con SSAF-tween.

- la reacción se visualiza mediante la agregación de H_2O_2 como sustrato de la enzima y como cromógeno la ortofenilendiamina (preparada al momento de uso con 40 mg de sustrato en 100 ml de amortiguador de ácido cítrico 0.1 M y Na_2HPO_4 0.2M, al producto final se le adicionaron 40 μ l de H_2O_2 al 30%) que reacciona con la enzima peroxidasa de rábano.

- se realizó la lectura en un espectrofotómetro o lector de ELISA a 492 nm.

-los resultados expresados como la densidad optica obtenida en la lectura del espectrofotómetro fueron evaluados mediante un análisis de varianza de **Kruskall-Wallis** para detectar las diferencias entre grupos y la prueba de **U de Mann-Whitney** para las diferencias entre sexo.

-Respuesta a la inoculación de protozoarios del genero *Leishmania*

-se inocularon ratones **CD 1 et/+** y **et/et** con *Leishmania mexicana* con una semilla donada por el Instituto Nacional de Laboratorios de Referencia y Epidemiología (**INDRE**) en el cojinete plantar con una dosis de 1 millón de promastigotes para evaluar los efectos del parásito en los ratones y determinar si son útiles como medio de cultivo para esta variedad de parásitos.

-Evaluación de la respuesta inmune humoral hacia glóbulos rojos de carnero.

-se inocularon 10 ratones de cada variedad por vía intraperitoneal con 0.1 ml de glóbulos rojos de carnero lavados y sedimentados por centrifugación sin sobrenadante.

-a los 5 días se sangraron para obtener el suero y se sacrificaron para obtener los bazos.

-al suero se les aplicó la técnica de aglutinación para determinar el título de anticuerpos, haciendo diluciones dobles seriadas del suero para microaglutinación en placas de poliestireno, iniciando en 1/2.

-se agregaron eritrocitos lavados de carnero diluidos al 0.5%, se agitaron y se dejó reposar a temperatura ambiente hasta la formación de

un botón de sedimentación en el pozo control, momento en que se hizo la lectura.

-Prueba de placas hemolíticas (Técnica de Jerne 47, 77): los bazos fueron disgregados y se preparó una suspensión de células en 4 ml de medio mínimo esencial de "Eagle", se contaron en un hemocitómetro y se hicieron diluciones con el medio de cultivo.

-se suspendieron en 5 ml de agarosa al 0.75% con eritrocitos lavados de carnero al 1% y se vaciaron en cajas de Petri. se dejó gelificar y se incubaron a 37 °C durante 1 hora.

-se agregó complemento de cuye con 2 unidades hemolíticas y nuevamente se incubaron a 37° C por 30 minutos.

-para detener la reacción se colocaron en refrigeración y se procedió a hacer la lectura, mediante el conteo de placas hemolíticas.

-los resultados se evaluaron mediante las pruebas: U de Mann-Whitney y el análisis de varianza de Kruskal-Wallis (60, 64).

-Evaluación de la respuesta humoral en la inmunización con albúmina sérica bovina.

-se inocularon 10 ratones de cada variedad y de cada sexo con 30 µg de albúmina sérica bovina por vía intramuscular (74).

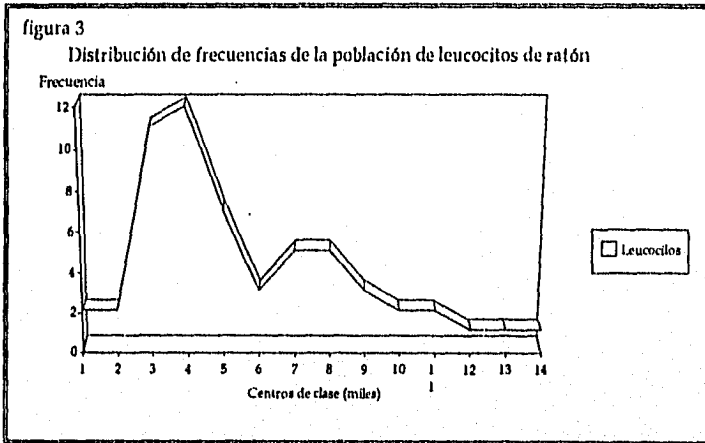
-al quinto día se sangraron en blanco para obtener el suero para la titulación de anticuerpos.

-la evaluación de los anticuerpos contra albúmina sérica bovina se realizó mediante la técnica de ELISA tal como se describió en la evaluación de la respuesta inmune a los *Toxoplasma gondii*, utilizando conjugados contra Ig M e Ig G de ratón (Serotec ®).

-los resultados se evaluaron mediante las pruebas: Análisis de Varianza (ANDEVA) de un factor al azar seguida de una prueba de Tukey para diferencias entre grupo y la prueba T de Student para muestras independientes para las diferencias entre sexo (60, 64).

IV.-RESULTADOS

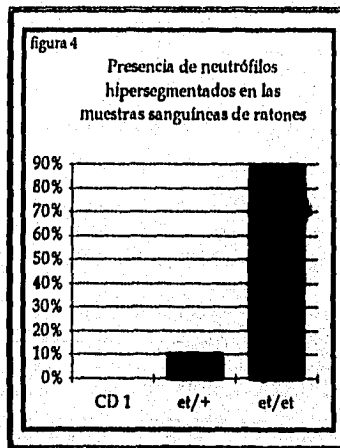
Al obtener los resultados de las biometrías hemáticas se practicó una prueba de bondad de ajuste para determinar la normalidad de frecuencias de los resultados de las poblaciones de leucocitos, y se observó que presentan una distribución de frecuencias asimétrica positiva (60,64), por lo que todo análisis estadístico relacionado se evaluó con pruebas de Kruskal Wallis y U de Mann-Whitney (figura 3).



En el **cuadro 1** se muestran las medianas de los conteos leucocitarios y cuentas diferenciales de las tres variedades de ratones; se observan diferencias significativas en la población de leucocitos, así como en los diferenciales de linfocitos, monocitos y eosinófilos a una $p \leq 0.05$, correspondiendo el número mayor a los ratones **et/et** y el menor a los **CD 1**; No se encontraron diferencias en las poblaciones de basófilos, neutrófilos en banda y segmentados; sin embargo se observó la presencia de neutrófilos con hipersegmentación en **16 de las 17** muestras de los ratones **et/et** en **2 de 19** de los ratones **et/+** y no estuvieron presentes en los **CD 1** (**figura 4**); no se observaron diferencias en las poblaciones de células sanguíneas de los ratones **et/+** con relación a los **et/et** y a los **CD 1**, y sus valores siempre fueron intermedios.

cuadro 1			
Comparación de las medianas de las poblaciones de células sanguíneas (°) de los ratones CD 1, et/+ y et/et			
población celular	ratones		
	CD 1	et/+	et/et
leucocitos	6,225	6,500	(*) 9,300
linfocitos	3,461	4,355	(*) 4,836
monocitos	254	350	(*) 544
bandas	0	0	0
segmentados	1,593	1,740	1,843
eosinófilos	50	252	(*) 267
basófilos	0	0	0

(°) Células por mililitro de sangre
 (*) $p \leq 0.05$ vs CD 1 (Kruskall-Wallis)



En el **cuadro 2** se muestran las medianas de las poblaciones de leucocitos y diferenciales de los ratones CD 1, donde se hizo el estudio estadístico tomando como base los resultados por el sexo de los animales. Sólo se encontraron diferencias en la población de linfocitos, en la que fueron significativamente mayores las hembras con $p \leq 0.05$; no se observaron diferencias en el resto de las poblaciones de células sanguíneas.

cuadro 2
Comparación de las medianas
de las poblaciones de leucocitos (0)
de los ratones CD 1

Población celular	machos	hembras
Leucocitos	5,950	6,300
Linfocitos	2,791	(*) 4,569
Monocitos	312	185
Bandas	0	0
Segmentados	1,856	1,512
Eosinófilos	61	0
Basófilos	0	0

(0) Células por mililitro de sangre
(*) $p \leq 0.05$ vs machos (U de Mann-Whitney)

En el cuadro 3 se presenta la misma evaluación pero sobre los ratones *et/+*, donde también se observó que las hembras presentan una mayor linfocitosis que los machos con $p \leq 0.05$; al igual que en los ratones CD 1 no se observaron diferencias significativas en las otras poblaciones celulares.

cuadro 3
Comparación de las medianas
de las poblaciones de leucocitos (0)
de los ratones *et/+*

Población celular	machos	hembras
Leucocitos	5,875	9,400
Linfocitos	3,400	(*) 5,543
Monocitos	242	368
Bandas	0	0
Segmentados	1,776	1,296
Eosinófilos	255	252
Basófilos	0	0

(0) Células por mililitro de sangre
(*) $p \leq 0.05$ vs machos (U de Mann-Whitney)

En el cuadro 4 se presenta la evaluación de leucocitos y cuentas diferenciales por sexo de los ratones *et/et*, y al igual que en las otras dos variedades. Sólo se observaron diferencias significativas en la población de linfocitos de las hembras, las cuales fueron mayores a la de los machos con $p \leq 0.05$; no se encontraron diferencias en las demás células.

cuadro 4 Comparación de las medianas de las poblaciones de leucocitos (0) de los ratones et/et		
Población celular	machos	hembras
Leucocitos	8,700	10,050
Linfocitos	3,861	(*) 6,999
Monocitos	410	650
Bandas	0	0
Segmentados	1,836	1,941
Eosinófilos	292	215
Basófilos	0	0

(0) Células por mililitro de sangre
(*) $p \leq 0.05$ vs machos (U de Mann-Whitney)

En el cuadro 5 se presenta la comparación de las medianas obtenidas al estudiar los linfocitos por citofluorometría donde se confirman los resultados obtenidos de esta población celular en las biometrías hemáticas, ya que nuevamente se apreció un aumento en los **linfocitos T totales** de los ratones et/et así como un aumento en la población de linfocitos T8 en la misma variedad de animales con relación a los ratones CD 1 a una $p \leq 0.05$; los resultados observados en la proporción de linfocitos T4:T8 no hubo diferencias significativas ni con los portadores et/+ ni con los CD 1 ; no hubo diferencias en la población de linfocitos T4 entre las tres variedades de ratón.

cuadro 5 Comparación de las medianas de los porcentajes y proporciones de las diversas poblaciones de linfocitos T de los ratones CD 1, et/+ y et/et			
Población celular	variedad de ratón		
	CD 1	et/+	et/et
linfocitos T 4	11%	14%	19%
linfocitos T 8	5%	8%	(*) 9%
proporción T4:T8	2.54	1.88	1.87
linfocitos T totales	20%	27%	(*) 40%

*= $p \leq 0.05$ vs CD 1 (Kruskal-Wallis)

En el cuadro 6 se resumen los resultados obtenidos por sexo en la citofluorometría de los linfocitos T en los ratones CD 1; donde se indica que hubo diferencias en la población de ratones machos con relación a las hembras en los grupos celulares CD 4 y linfocitos T totales CD3+ con $p \leq 0.05$. No se encontraron diferencias en los linfocitos T8 ni en la proporción T4:T8 entre ambos sexos.

cuadro 6 Comparación de las medianas de las diversas poblaciones de linfocito T de machos y hembras de los ratones CD 1		
Población celular	machos	hembras
linfocitos T4	(*) 9%	17%
linfocitos T8	4%	6%
proporción T4:T8	2.27	2.69
linfocitos T totales	(*) 12%	23%
(*) $p < 0.05$ vs hembras (U de Mann-Whitney)		

En el cuadro 7 se presentan los porcentajes de linfocitos para las muestras de los ratones *et/+*. Se encontró que no hubo diferencias entre los sexos de esta variedad de ratones con la prueba de U de Mann-Whitney.

cuadro 7 Comparación de las medianas de las diversas poblaciones de linfocito T de machos y hembras de los ratones <i>et/+</i>		
Población celular	machos	hembras
linfocitos T4	13%	16%
linfocitos T8	8%	8%
proporción T4:T8	1.83	1.88
linfocitos T totales	26%	27%

En el cuadro 8 se presentan los resultados de la citofluorometría de linfocitos de los ratones *et/et* para los cuales tampoco hubo diferencias entre sexos.

cuadro 8 Comparación de las medianas de las diversas poblaciones de linfocito T de machos y hembras de los ratones <i>et/et</i>		
Población celular	machos	hembras
linfocitos T4	14%	22%
linfocitos T8	8%	12%
proporción T4:T8	2.2	1.73
linfocitos T totales	36%	45%

Una característica importante a resaltar es que en la mayoría de los resultados (excepto en la relación T4:T8 de las hembras *et/et*) el valor mayor correspondió a las hembras en las tres variedades de ratones.

Al evaluar estadísticamente el hematocrito se encontraron diferencias significativas entre las medias de los grupos CD 1 y *et/et* con $p \leq 0.05$ (cuadro 9); se observa que el valor menor correspondió a los ratones CD 1.

cuadro 9 Comparación de medias de hematocrito en ratones CD 1, <i>et/+</i> y <i>et/et</i>			
variable	CD 1	<i>et/+</i>	<i>et/et</i>
hematocrito	(*) $38 \pm 1.84\%$	$41.5 \pm 1.34\%$	$41.5 \pm 0.99\%$
$p \leq 0.05$ vs <i>et/et</i> (ANDEVA)			

En el cuadro 10 se presentan los resultados de la evaluación estadística de las medias de la concentración de proteínas plasmáticas de los ratones CD 1, *et/+* y *et/et*, donde se observó que el valor de la concentración media de proteínas de los ratones *et/et* fue significativamente menor con relación a los ratones *et/+* y CD 1 con $p \leq 0.05$ al aplicar la prueba de Tukey.

cuadro 10 Comparación de medias de concentración (g/dl) de proteínas plasmáticas en ratones CD 1, <i>et/+</i> y <i>et/et</i>			
variable	CD 1	<i>et/+</i>	<i>et/et</i>
proteínas plasmáticas	$7.2 \pm 0.139\text{g/dl}$	$7.3 \pm 0.166\text{g/dl}$	(*) $6.8 \pm 0.145\text{g/dl}$
$p \leq 0.05$ vs CD 1 y <i>et/+</i> (ANDEVA)			

Asimismo en la evaluación por sexo se pudo apreciar que hubo diferencias en las hembras de los ratones CD 1 con relación a los machos de la misma variedad a una $p=0.04$ (cuadro 11), utilizando la prueba de T de Student.

cuadro 11 Comparación de las medias de la concentración de proteínas plasmáticas entre machos y hembras de los ratones CD 1		
ratón	machos	hembras
CD 1	$7.51 \pm 0.173\text{g/dl}$	(*) $6.96 \pm 0.105\text{g/dl}$
* $p \leq 0.05$ vs machos CD 1 (T de Student)		

En el cuadro 12 se resumen los resultados por sexo de los ratones *et/+*, donde se encontró que no hubo diferencias significativas entre las medias de la concentración de proteínas plasmáticas por sexo de estos ratones.

cuadro 12		
Comparación de las medias de la concentración de proteínas plasmáticas entre machos y hembras de los ratones <i>et/+</i>		
ratón	machos	hembras
<i>et/+</i>	7.26 ± 0.175g/dl	7.28 ± 0.157g/dl

En el **cuadro 13** se muestran las medias de la concentración de proteínas plasmáticas entre machos y hembras de los ratones. al aplicar la prueba t de Student no se encontraron diferencias significativas entre ellos para los ratones *et/et*.

cuadro 13		
Comparación de las medias de la concentración de proteínas plasmáticas entre machos y hembras de los ratones <i>et/et</i>		
ratón	machos	hembras
<i>et/et</i>	6.76 ± 0.163 g/dl	6.70 ± 0.127g/dl

Los valores de las medias de los porcentajes de proteína de las fracciones electroforéticas de los ratones **CD 1**, *et/+* y *et/et* se muestran en el **cuadro 14**, donde se encontró que no hubo diferencias significativas entre los tres grupos de animales.

cuadro 14			
Valores medios de los porcentajes de la concentración de las diferentes fracciones de proteínas séricas de los ratones CD 1, <i>et/+</i> y <i>et/et</i>			
Fracción proteica	variedad de ratón		
	CD 1	<i>et/+</i>	<i>et/et</i>
Albumina	63.23% ± 2.8	64.82% ± 2.5	62.44% ± 2.8
Alfa globulinas	5.73% ± 0.7	4.14% ± 1.1	6.21% ± 1.2
Beta globulinas	22.42% ± 1.6	22.02% ± 1.6	21.82% ± 1.5
Gamma globulinas	9.22% ± 1.5	9.05% ± 1.3	9.43% ± 1.4

Al analizar estadísticamente las diferencias de las medias de la concentración de las fracciones de proteína sérica para machos y hembras no se observaron diferencias significativas en los ratones **CD1** (**cuadro 15**)

cuadro 15
Comparación de las medias de los porcentajes de concentración de proteínas séricas de machos y hembras de los ratones CD 1

Fracción proteica	machos	hembras
Albumina	64.11% ± 2.92	62.15% ± 2.89
Alfaglobulinas	6.48% ± 0.80	4.80% ± 0.78
Betaglobulinas	20.59% ± 1.57	24.72% ± 1.79
Gammaglobulinas	8.82% ± 1.30	9.72% ± 1.70

Tampoco se observaron diferencias la concentración de las fracciones de proteínas séricas en los ratones *et/+* (cuadro 16)

cuadro 16
comparación de las medias de los porcentajes de concentración de proteínas séricas de machos y hembras de los ratones *et/+*

Fracción proteica	machos	hembras
Albumina	63.26% ± 3.29	65.90% ± 1.82
Alfaglobulinas	5.46% ± 2.75	3.22% ± 0.56
Betaglobulinas	22.80% ± 2.06	21.49% ± 1.14
Gammaglobulinas	8.57% ± 1.29	9.37% ± 1.41

Pero al hacer la evaluación por sexo en los ratones *et/et* se encontraron diferencias significativas en la concentración de alfaglobulinas de los machos con relación a las hembras (cuadro 17) al aplicar la prueba de U de Mann-Whitney.

cuadro 17
Comparación de las medias de los porcentajes de concentración de proteínas séricas de machos y hembras de los ratones *et/et*

Fracción proteica	machos	hembras
Albumina	60.43% ± 3.04	64.46% ± 2.75
Alfaglobulinas	(+) 8.94% ± 1.81	3.49% ± 0.69
Betaglobulinas	22.40% ± 1.35	21.25% ± 1.65
Gammaglobulinas	8.27% ± 1.49	10.59% ± 1.43
(+) <i>p</i> = 0.026 machos contra hembras (U de Mann-Whitney)		

Los experimentos realizados con los parásitos se ha observado lo siguiente: Al inocular los toxoplasmas en los ratones desnudos hubo resultados contradictorios, ya que a las 48 horas algunos de los animales morían

(machos), mientras que los sobrevivientes se apreciaban en mejor estado que los ratones CD 1 o los heterocigóticos, es decir, presentaban más actividad, comían y bebían y no había diarrea, aunque en la cosecha se obtuvieron cantidades semejantes de *Toxoplasma gondii* (un promedio de 3×10^5 organismos/ml por cada animal inoculado).

En la titulación de los anticuerpos por el método de ELISA no se encontraron diferencias significativas entre grupo de ratones en los valores de las Ig M, pero si las hubo en las concentraciones de Ig G con $p \leq 0.02$, por el método de Kruskal-Wallis (60,64) encontrando que el valor mayor correspondió a los ratones et/et y el menor a los CD 1, mientras que los portadores quedaron intermedios (cuadro 18).

cuadro 18 Comparación de las medias de las lecturas de la densidad óptica en la prueba de ELISA en la determinación de inmunoglobulinas M y G contra <i>Toxoplasma gondii</i> de los ratones CD 1, et/+ y et/et			
ratón	CD 1	et/+	et/et
Ig M	0.456	0.514	0.536
Ig G	(*) 0.095	0.174	0.165
(*) $p \leq 0.025$ vs et/+ y et/et (Kruskal-Wallis)			

En el cuadro 19 se presenta los resultados por sexo de ratones CD 1, en la determinación de anticuerpos de la clase IgM contra *Toxoplasma gondii* mediante la prueba de ELISA, sin encontrar diferencias significativas.

Cuadro 19 Valores medios de las lecturas de la densidad óptica en la prueba de ELISA en la titulación de inmunoglobulinas M contra <i>Toxoplasma gondii</i> en ratones machos y hembras CD 1		
dilución	machos	hembras
1/40	0.653	0.652
1/80	0.478	0.485

En el cuadro 20 se presenta el resumen de resultados correspondientes a los machos y hembras de los ratones et/+ en la determinación de anticuerpos

IgM contra *Toxoplasma gondii* por el método de ELISA, donde tampoco hubo diferencias estadísticas.

Cuadro 20		
Valores medios de las lecturas de la densidad óptica en la prueba de ELISA en la titulación de inmunoglobulinas M contra <i>Toxoplasma gondii</i> en ratones machos y hembras et/+		
dilución	machos	hembras
1/40	0.344	0.772
1/80	0.213	0.543

En el cuadro 21 se observan los resultados de las lecturas de densidad óptica en la determinación de anticuerpos IgM contra *Toxoplasma gondii* por el método de ELISA en los ratones et/et sin encontrar diferencias significativas

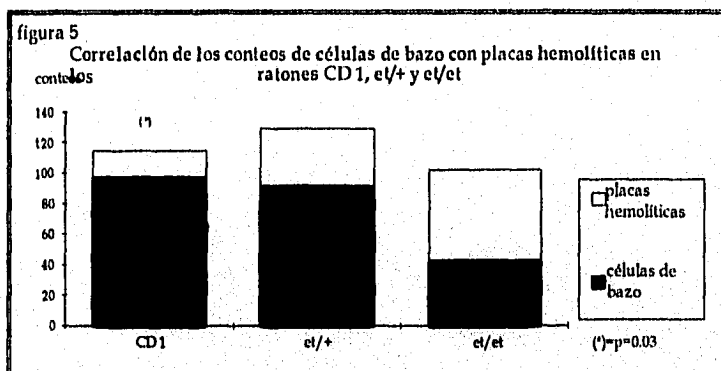
Cuadro 21		
Valores medios de las lecturas de la densidad óptica en la prueba de ELISA en la titulación de inmunoglobulinas M contra <i>Toxoplasma gondii</i> en ratones machos y hembras et/et		
dilución	machos	hembras
1/40	0.806	0.724
1/80	0.579	0.516

Se intentó utilizar a los animales inoculados con *Leishmanias* como medio de cultivo para este parásito, sin embargo un mes después de la inoculación hubo regresión de las lesiones y no se logró el reaislamiento de los protozoarios.

Al realizar la prueba de hemólisis en placa (prueba de Jerne) con linfocitos de ratón sensibilizado contra eritrocitos de carnero se observaron diferencias significativas al evaluar los resultados (cuadro 22); donde se puede apreciar un valor menor en el número de células de bazo de los ratones et/et en concomitancia con los CD 1 ; aunque no hubo diferencias significativas en el número de placas hemolíticas, se aprecia un valor mayor para los ratones et/et.

cuadro 22			
Comparación de las medianas de los conteos celulares de bazo y de placas hemolíticas de ratones CD 1, et/+ y et/et inmunizados con eritrocitos de carnero			
ratón	CD 1	et/+	et/et
células de bazo/ 50µl	97.5	92	(*) 43
placas hemolíticas/ bazo	17	37	59
(*) p=0.029 vs CD1 (Kruskal-Wallis)			

Al analizar la correlación de los resultados por el método de Sperman se encontró la no correlación en los ratones CD 1 con $p=0.03$ mientras que con los et/+ y et/et si existió (figura 3).



En la evaluación por sexo de las células de Bazo y conteo de placas hemolíticas no se encontraron diferencia significativas en los ratones CD 1 (cuadro 23)

cuadro 23		
Comparación de las medianas de los conteos celulares de bazo y de placas hemolíticas de ratones machos y hembras CD 1 inmunizados con eritrocitos de carnero		
sexo	machos	hembras
células de bazo/ 50µl	79	122
placas hemolíticas/ bazo	17	17

No se encontraron diferencias por sexo de las células de bazo y conteo de placas hemolíticas en los ratones *et/+* (cuadro 24)

cuadro 24 Comparación de las medianas de los conteos celulares de bazo y de placas hemolíticas de ratones machos y hembras <i>et/+</i> inmunizados con eritrocitos de carnero		
sexo	machos	hembras
células de bazo/ 50 μ l	108	60
placas hemolíticas/ bazo	41	26.5

Aunque se observa un amplio margen de valores en las placas hemolíticas de las hembras *et/et*, no hubo diferencias significativas al realizar el análisis estadístico de este parámetro (cuadro 25)

cuadro 25 Comparación de las medianas de los conteos celulares de bazo y de placas hemolíticas de ratones machos y hembras <i>et/et</i> inmunizados con eritrocitos de carnero		
sexo	machos	hembras
células de bazo/ 50 μ l	34	44.5
placas hemolíticas/ bazo	14	145.5

Utilizando los sueros de los ratones empleados en el experimento anterior se hicieron diluciones para titular los anticuerpos por medio de aglutinación de eritrocitos de carnero, donde se encontraron fenómenos de zona en los ratones desnudos y no así en los portadores ni en los CD 1. Para realizar la evaluación estadística por ANDEVA se obtuvo el logaritmo natural de los inversos de las diluciones, observando diferencias significativas entre los títulos de anticuerpos de los ratones CD 1 con relación a los portadores y a los *et/et* con $p=0.001$ (cuadro 26) después de aplicar la prueba de Tukey.

cuadro 26 Comparación de las medias de los logaritmos de los inversos del título de anticuerpos contra eritrocitos de carnero en los ratones CD 1, <i>et/+</i> y <i>et/et</i>		
CD 1	<i>et/+</i>	<i>et/et</i>
(*) 2.6 \pm 0.15	4.0 \pm 0.26	3.9 \pm 0.31
(*) $p=0.001$ vs <i>et/+</i> y <i>et/et</i> (ANDEVA)		

En la evaluación por sexo de los títulos de anticuerpos contra glóbulos rojos de carnero por aglutinación no se observaron diferencias significativas en los ratones CD 1 (cuadro 27) al aplicar la prueba de T de Student.

cuadro 27	
Comparación de medias de los logaritmos naturales de los inversos del título de anticuerpos contra eritrocitos de carnero de ratones machos y hembras CD 1	
machos	hembras
2.7±0.28	2.4±0.17

En el cuadro 28 se presenta la estadística de los títulos de anticuerpos contra eritrocitos de carnero en los ratones et/+ donde no se observan diferencias significativas entre ambos sexos al aplicar la prueba de T de Student.

cuadro 28	
Comparación de medias de los logaritmos naturales de los inversos del título de anticuerpos contra eritrocitos de carnero de ratones machos y hembras et/+	
machos	hembras
4.0±0.77	4.0±0.19

En el cuadro 29 se analizan los datos correspondientes a los ratones et/et en la titulación de anticuerpos contra eritrocitos de carnero donde no se observan diferencias significativas entre los sexos de estos animales al aplicar la prueba de T de Student.

cuadro 29	
Comparación de medias de los logaritmos naturales de los inversos del título de anticuerpos contra eritrocitos de carnero de ratones machos y hembras et/et	
machos	hembras
3.3±0.28	4.3±0.28

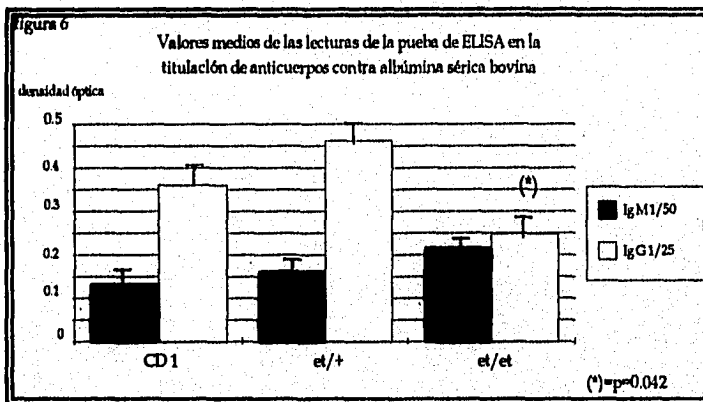
La evaluación de la respuesta inmune humoral contra albúmina sérica bovina se practicó mediante un análisis de varianza (ANDEVA) y se observaron diferencias significativas, donde el valor menor correspondió a los ratones *et/et* con relación a los *et/+* en las lecturas correspondientes a las **Inmunoglobulinas G (Ig G)** a una $p=0.042$. En el título de Ig M el valor mayor correspondió a los *et/et*, sin embargo no hubo diferencias significativas (**cuadro 30 y figura 4**). No se hizo evaluación por sexo debido a la falta de muestras.

cuadro 30

Valores medios de las lecturas de la densidad óptica en la prueba de ELISA en la titulación de anticuerpos contra albúmina sérica bovina en ratones CD 1, *et/+* y *et/et*

anticuerpo	CD 1	<i>et/+</i>	<i>et/et</i>
IgM	0.13 ± 0.023	0.16 ± 0.043	0.21 ± 0.022
IgG	0.36 ± 0.054	0.46 ± 0.052	(*) 0.24 ± 0.048

(*)= $p=0.042$ vs CD 1 y *et/+* (ANDEVA)



V.- DISCUSIÓN

El ratón desnudo *et/et* presenta una respuesta humoral y celular normal, pero la presencia de neutrófilos hipersegmentados y las variaciones en la síntesis de anticuerpos según el antígeno que se aplica indican la posible existencia de un desbalance en la síntesis de interleucinas debido a un efecto de los esteroides adrenales.

Los resultados obtenidos muestran que los conteos leucocitarios, de linfocitos y monocitos fueron contrarios a lo reportado por Vlatko (96) para los ratones desnudos atómicos *nu/nu*, ya que las medianas aritméticas de las muestras celulares fueron superiores, no sólo para estos ratones sino que también hubo diferencias con los ratones normales, con lo cual podemos asegurar que es una característica genética del ratón *et/et* que los diferencia de los ratones *nu/nu* y de los CD 1.

Por otro lado también se pudo comprobar que las cuentas diferenciales pueden funcionar como un método de identificación genética de la población de heterocigotos, ya que la no significancia con los *et/et* y con los CD 1 permite identificar al genotipo de este grupo de ratones.

Krzych et. al. (53) señala que en las diferentes etapas del ciclo estral hay variaciones importantes en el número de células blancas, siendo la etapa de metaestro en la que el número de leucocitos de la hembra se asemeja a los del macho. Las hembras de las tres variedades de ratones presentaron mayor número de leucocitos que los machos, característica que probablemente se debió a la fase del ciclo estral en que se encontraban los animales.

Duncan y Prase (25) reportan que la hipersegmentación de neutrófilos puede ser debida a dos causas 1.- a un hiperadrenocortisismo primario o secundario o a una terapia prolongada con glucocorticoides y 2.- a una deficiencia de vitamina B12, ácido fólico y/o cobalto, pero esta última sólo se ha reportado en rumiantes. Los neutrófilos con hipersegmentación del núcleo ($5 < n < 10$) en los ratones *et/et* y en los ratones *et/+* es debido a la hipersecreción glucocorticoide que ha sido reportada en el ratón *et/et* (83).

Los reportes (83, 84) de hipersecreción de glucocorticoides en los ratones desnudos afectan directamente a la fisiología de los granulocitos de los ratones *et/et*, lo que también es indicativo de la elevada predisposición a los procesos infecciosos por una deficiencia en los mecanismos de fagocitosis de estas células (5, 30, 66).

Otra característica relacionada con la secreción adrenal es la participación de la Dehidroepiandrosterona (DHEA) la cual ha mostrado tener un fuerte efecto sobre los mecanismos de regulación del sistema inmune, ya que su ausencia ha producido desbalances en la regulación de la homeostasis donde participan las linfocinas derivadas del subgrupo 1 de linfocitos T cooperadores (IL-2, IFN- γ , TNF α y β) (1, 2, 19, 20, 21, 22, 32, 40, 41, 101).

Se ha reportado que durante el envejecimiento del ratón, la concentración de la DHEA disminuye, causando con esto el desbalance de linfocinas que reportan Daynes *et al.* (19, 20, 21), los cuales también generan una serie de signos clínicos de inmunodeficiencia, los cuales son: caquexia, disminución de la capacidad de respuesta inmune celular, incremento de problemas por autoinmunidad, cataratas, demencia, deshidratación, diarrea, osteoporosis entre otros (32), algunos de los cuales, aunque no fueron objetivo del presente estudio, han sido observados y reportados durante la crianza de los animales *et/et* (Rosas 84).

El hecho de que el número de monocitos y eosinófilos se encuentre elevado apoya la teoría de un mecanismo compensador de la fagocitosis.

Los monocitos, macrófagos y eosinófilos cuando son activados por el IFN γ incrementan su capacidad fagocítica, expresan antígenos de histocompatibilidad de clase II y llegan a presentar antígenos a los linfocitos en la misma medida en que lo hacen otras células presentadoras de antígenos; también se ha demostrado que en los eosinófilos existe una dependencia hormonal tímica (IL-3, IL-4, IL-5 IFN- γ) (88).

El aumento de monocitos y eosinófilos probablemente obedecen al estado endócrino adrenal que se refleja en los linfocitos produciendo un desbalance en los subgrupos de linfocitos T cooperadores, en que la disregulación de citocinas corresponda más al subgrupo 1 que al subgrupo 2 como lo mencionan Hennebold y Daynes (40) quienes señalan que la

actividad de citocinas relacionadas con la inflamación (TNF α , IFN α/β) contribuyen a disminuir la conversión del sulfato de dehidroepiandrosterona (DHEAS) \rightarrow dehidroepiandrosterona (DHEA), ya que los macrófagos juegan un papel importante en la activación de esta hormona por la síntesis de la enzima esteroide-sulfatasa. La DHEA participa en la regulación de la síntesis de IL-2 aumentándola, a su vez disminuye el IFN- γ y a las citocinas del subgrupo 2 de linfocitos T cooperadores como la IL-6 e IL-10 sin afectar la IL-4 e IL-5. Hennebold y Daynes (40) también mencionan que al disminuir la activación del DHEAS tiende a modificarse la concentración de las linfocinas antes mencionadas afectando con esto la respuesta inmune celular (regulación negativa) (40).

Por otro lado Kuby (52) propone que el desarrollo de las células accesorias depende en gran medida de la concentración de IL-3 y el factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF).

Greco y Harpold (36) así como Felsburg (30) mencionan la existencia de una inmunodeficiencia congénita asociada a la hipersecreción glucocorticoide que es la neutropenia cíclica, sin embargo se descarta la posibilidad de este proceso en los ratones *et/et* debido a que el número de neutrófilos siempre fue constante y la concentración de glucocorticoides presenta ritmo circadiano (Rosas et.al. 83, 84).

El efecto de los glucocorticoides en los linfocitos de los ratones *et/et* es contraria a lo que señala la literatura (27) en la fisiología de esta hormona, ya que se apreció un aumento considerable de la población de estas células en circulación, lo cual podría ser señal de la posible existencia de un mecanismo tímico compensador ante la hipersecreción de hormonas glucocorticoides o a la deficiencia en síntesis o funcionalidad de moléculas membranales de adhesión (integrinas y/o selectinas) para fijarlos a los órganos linfoides secundarios (14, 51, 59, 68); si esta última hipótesis es cierta, probablemente la falla radique en las selectinas de los órganos linfoides secundarios, ya que como lo mencionan Dustin y Springer (26) las moléculas de adhesión tienen diversas funciones a parte de la de fijar a las células a los órganos linfoides secundarios y esta incluyen la locomoción a través de órganos, la adhesión al endotelio vascular y linfático, así como a la interacción entre células en la presentación de antígenos; esta opción se considera como la más viable debido a las

observaciones realizadas en la prueba de hemólisis en placa, donde los ratones *et/et* presentaron el menor número de células linfoides en bazo.

El incremento en la hemoconcentración observada en los ratones *et/et* durante la evaluación del hematocrito puede ser debida a diversas causas una de ellas es la elevada predisposición a la deshidratación que tienen los ratones *et/et* la cual ha sido observada durante la cría de los animales (información inédita). Chastian (citado por Ettinger 27) menciona un efecto diurético de los glucocorticoides, y un bloqueo del ingreso de agua a las células, lo cual podría justificar la deshidratación de los animales pero por otro lado se puede producir una policitemia secundaria inapropiada por un hiperadrenocortisismo donde la policitemia es debida al efecto compensador del cortisol sobre la eritropoyetina en la médula ósea, lo cual también es mencionado por Chastian (27), cualquiera de las dos justificaciones sobre la concentración de células sanguíneas la consideramos viables debido a que también se presentó en los ratones portadores *et/+* los cuales también manifestaron efecto glucocorticoide al presentar neutrófilos con hipersegmentación.

Por los resultados obtenidos en este trabajo se considera la posibilidad de que los valores de la concentración de glucocorticoides en los ratones *et/+* es intermedio con relación a los *et/et* y a los CD 1.

La disminución que se observó en la concentración de proteínas plasmáticas de los ratones *et/et* sugiere alteraciones en la concentración de proteínas de la coagulación, aunque esto no es indicativo de un malfuncionamiento de los procesos hemostáticos ya que se requiere de una deficiencia mayor al 50% para que se manifiesten clínicamente alteraciones en los tiempos de coagulación (14).

No existen alteraciones en la inmunidad humoral, ya que todos los valores de la fracción gamma son semejantes en las tres líneas de ratones, y los cambios en el porcentaje de albúminas descarta la posibilidad de problemas en la síntesis de proteínas. Sin embargo en la evaluación de las alfa globulinas tanto por grupo como por sexo observamos que los ratones *et/et* y en especial los machos presentaron una mayor concentración de este grupo de globulinas, entre las cuales se encuentran algunas enzimas como la

transcortina (27) (proteína ligadora de los corticoides), lo que se podría asociar a la hipersecreción glucocorticoide de los machos *et/et*.

Dentro de la fracción alfa globulina también se encuentra la enzima ligadora de la eritropoyetina (14), la cual aparentemente puede estar alterada según los resultados del hematocrito.

Ya sea por la elevada concentración de glucocorticoides o de la eritropoyetina en esta variedad de ratones, el incremento de alfa globulinas esta justificado.

De las observaciones referentes a la inoculación con el protozooario *Toxoplasma gondii* es que los ratones *et/et* no presentan alteración en la respuesta inmune de tipo humoral ya que en los tiempos de incubación no hay una diferencia clara con los ratones CD 1 además de que el comportamiento del ratón desnudo ante el *Toxoplasma* genera confusión por la diversidad de signos clínicos manifestados.

Kuby (51) menciona que la IL-12 es producida por MφS y linfocitos B, y considerando que existe una monocitosis en los ratones *et/et* es factible que se incremente la concentración de esta citocina como producto de la sobrepoblación celular, más que a una hiper-reactividad ante la presencia del *Toxoplasma gondii*, produciendo así los efectos clínicos de resistencia al parásito.

Con los datos obtenidos y por lo reportado por Heinzl et.al. (39) y por Khan et.al. (49) podría indicar que los ratones *et/et* presentan una elevada concentración de IL-12, en especial las hembras, la cual potencializa el efecto del IFN γ , regula la actividad de los LTc2 y es un antagonista de la IL-4, y que se manifestó con un incremento en la resistencia clínica a la infección por toxoplasmas y tipo de anticuerpos producidos.

Por otro lado parece ser que se rompen los dogmas que han sido establecidos para la acción de los glucocorticoides sobre las células sanguíneas y en los procesos infecciosos, ya que por un lado se observa una sobrepoblación de linfocitos y monocitos circulantes, cuando estos deberían permanecer almacenados en los órganos linfoides secundarios (27) y en los

animales inoculados con los parásitos todo parece indicar que su actividad fagocítica dependiente de la cooperación celular está normal.

El hecho que la actividad de los anticuerpos contra *Toxoplasma* haya sido similar entre los tres tipos de animales, indica que la función inmunológica humoral primaria no ha sido afectada. Lo que permite concluir que la presentación de antígenos y tiempos para el inicio en la síntesis de anticuerpos en la respuesta primaria es igual en las tres variedades de ratones.

La prueba de hemólisis en placa para determinar la población de células formadoras de anticuerpos por la técnica de Jerne (47), muestran que la capacidad de respuesta humoral en las tres líneas de ratones es similar.

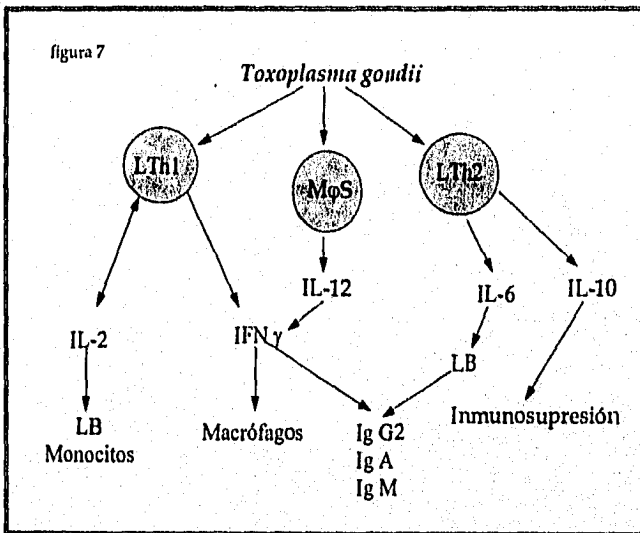
En los ratones *et/et* se observaron fenómenos de zona al practicar la aglutinación de eritrocitos de carnero, pero se considera que la síntesis de anticuerpos es normal debido a que los títulos finales fueron semejantes.

En la respuesta inmune contra las *Leishmania*, se observó que la reacción contra el parásito es como lo reportan Nabors y Farrell (70) quienes indican que hay líneas genéticas de ratones resistentes al desarrollo de infecciones por este parásito, y que responden inmunológicamente con la secreción IFN y por parte de los linfocitos T cooperadores del subgrupo 1, mientras que la susceptibilidad de los ratones está caracterizado por elevados niveles de secreción de IL-4 producida por los linfocitos T cooperadores del subgrupo 2; asimismo ellos mencionan que la respuesta inmune contra el parásito es una mezcla de participación de ambos subgrupos de linfocitos, lo cual pensamos que también ocurrió en este trabajo y que se deduce por la respuesta inmune que se desarrolló contra los toxoplasmas y la albúmina sérica bovina.

Haque, et.al. (38) mencionan que la principal citocina que se libera en las infecciones por *Toxoplasma gondii* es la IL-2 derivada de LTc1 y que la inmunodepresión típica de la infección es mediada por la IL-10 la cual a su vez es producida por los LTc2. Las observaciones clínicas de la infección por *Toxoplasma gondii* en los ratones *et/et* se asemeja a lo reportado por Khan (49) quien señala que la resistencia a la infección por toxoplasmas va relacionada con la concentración de IL-12, lo cual podría ser una de las

posibles explicaciones de la supervivencia de los ratones *et/et* a la infección por el parásito, dado por los efectos supresores que tiene esta citocina sobre la población de linfocitos T del subgrupo 2. Esto se podría considerar como un indicador de que los ratones *et/et*, tienen mayor actividad en los linfocitos T cooperadores del subgrupo 1 que del 2, y deducir por lo tanto que los ratones *et/et* son productores de **IFN- γ** , **IL-2**, e **IL-12** citocinas que también se les ha relacionado con la resistencia a las leishmanias por las propiedades que presenta para promover la activación de **M ϕ S** y eliminarlo definitivamente del organismo (figura 7).

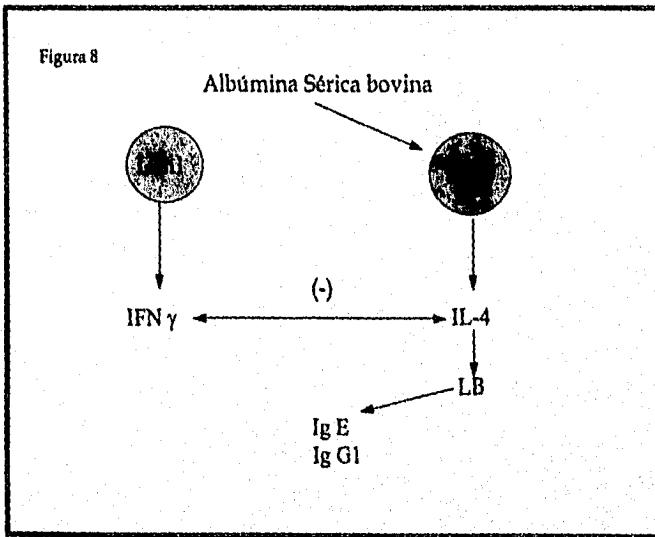
En la figura 7 se resumen las interacciones de las citocinas en la respuesta inmune contra *Toxoplasma gondii*



Por otro lado **Hilton et.al. (43)** mencionan que la **BSA** induce la producción de **IL-4** de linfocitos T Cooperadores del subgrupo 2 y debido a que esta linfocina induce el "switch" a **IgG₁** e **IgE** es de esperarse una producción disminuida por los bajos niveles de anticuerpos **Ig G** contra este antígeno, y que comparándolos con los altos niveles de **Ig G** contra *Toxoplasma gondii* el cual también se le ha relacionado con la cooperación celular del subgrupo 1 por la producción de **IL-2** la cual regula la síntesis de **IL-6** y

esta a su vez sinergiza con el $\text{IFN } \gamma$ en la producción de IgG_2 , en el ratón (76), IgG_3 e IgG_4 (33) en humanos, así como IgA , nos indica que no está ausente la cooperación celular del subgrupo 2 (48).

Se considera que sea normal la baja respuesta a los antígenos, como la albúmina, que promueven la liberación de IL-4 ya que ésta citocina es antagónica del $\text{IFN } \gamma$ y estimula la producción de Ig E e Ig G_1 (figura 8), es decir, si los ratones *et/et* tienen un mayor desarrollo del subgrupo 1 de - linfocito T cooperadores es de esperarse que la respuesta humoral baje cuando se estimula a esta linfocina, mientras que con los antígenos timodependientes que activan la síntesis de IL-2 , IL-6 e $\text{IFN } \gamma$ la respuesta de Ig G 2 (33, 76) puede ser normal o estar aumentada dependiendo de la concentración de estas citocinas, tal y como se observó en el experimento con los toxoplasmas.



VI.- CONCLUSIONES

El análisis de resultados indican que:

1.- En este trabajo se utilizaron tres grupos diferentes de ratones, ya que el comportamiento entre los *et/et* y los CD 1 en la mayoría de los trabajos aquí realizados fueron diferentes, mientras que los valores intermedios como en los hemogramas, hipersegmentación de neutrófilos, subpoblaciones de linfocitos, respuesta inmune humoral contra *Toxoplasma gondii*, No. de células de bazo, No. de placas hemolíticas, y respuesta inmune humoral contra BSA de los *et/+* indican que la heterocigosis va ligada a genes codominantes.

2.- El ratón *et/et* no es equivalente al *nu/nu*.

3.- La hipotimia de los ratones *et/et* no afecta la capacidad de respuesta inmune humoral ni celular, sin embargo es muy factible que presenten una inmunodeficiencia secundaria asociada a las fagocitosis de neutrófilos, la cual está influida fuertemente por los niveles de glucocorticoides circulantes más que a una asociación genética.

4.- Por las variaciones de la respuesta inmune humoral hacia los **toxoplasmas** y **BSA** y la resistencia a las **leishmanias** encontradas en los ratones *et/et* y *et/+* se podría creer que la cooperación celular es normal y ésta se asocia con los linfocitos T cooperadores del subgrupo 1.

5.- Siguiendo los efectos descritos en la literatura, sobre los efectos de los glucocorticoides en los linfocitos y los resultados obtenidos con una linfocitosis en sangre y la linfopenia en bazo de los ratones *et/et* se piensa que debe haber una deficiencia en la síntesis de moléculas de adhesión en órganos linfoides secundarios (integrinas y/o selectinas)

6.- Los resultados obtenidos en la respuesta inmune humoral hacia los **toxoplasmas** y **BSA** en los ratones *et/et* hacen suponer que existen elevadas concentraciones de **IL-6**, e **IFN** γ causado por la disfunción de la glándula adrenal como lo reporta **Daynes** (19), lo cual podría servir como un modelo de estudio de dichas linfocinas y hormonas adrenales.

7.- Nuevamente se confirma, lo que muchos autores han mencionado, que la participación de las hormonas sexuales femeninas tiene una fuerte influencia sobre la regulación de la respuesta inmune, por lo que consideramos que el ratón desnudo *et/et* puede ser un buen modelo de estudio de las interacciones gonada-sistema inmune.

A pesar de los trabajos realizados en esta tesis se considera que sería importante continuar estudiando a los ratones *et/et* y *et/+* ya que pueden ser útiles en estudios para analizar las posibles interacciones neuro-endócrinas con la respuesta inmune, así como las disregulaciones por linfoquinas.

PERSPECTIVAS

1.- Considerando que los ratones *et/et* presentan un hiperadrenocortisismo, el cual se refleja en la concentración de glucocorticoides es de esperarse que también se encuentre afectada la concentración de la **DHEA**, debiendo ser elevada durante la infancia del ratón y severamente disminuida en la edad adulta y en la senilidad, lo cual causará una disminución en la producción de **IL-2**, y aumento en **IFN γ** , **TNF α** e **IL-6**, lo cual se manifestará con signos de inmunodeficiencia y envejecimiento prematuro en los ratones *et/et*, obteniendo resultados intermedios con los ratones *et/+* con relación a lo que se obtenga con los ratones **CD 1**.

2.- La presencia de linfocitosis en sangre y la linfopenia en bazo aunado a las elevadas concentraciones de glucocorticoides se deberá determinar la presencia de selectinas e integrinas en los linfocitos y órganos linfoides de los ratones *et/et*, *et/+* y **CD 1**

3.- Evaluar las subpoblaciones de linfocitos T cooperadores mediante la determinación de la concentración de interleucinas **2, 4, 5, 6, 10 y 12** así como de **IFN γ** .

4.- Considerando que los ratones *et/et* presenta una involución prematura del timo, la cual ha sido reportada como hipotimia, sería conveniente evaluar la funcionalidad del timo en los animales adultos, así como determinar si hay diferenciación extratímica en los ratones *et/et* mediante la identificación del tipo de cadenas polipeptídicas que componen a los **TCR's** de los linfocitos

VII.- LITERATURA CITADA

- 1.- Araneo B., Woods M. and Daynes R.: Reversal of the immunosenescent phenotype by dehydroepiandrosterone: Hormone treatment provides an adjuvant effect on the immunization of aged mice with recombinant hepatitis B surface antigen. J. Infect. Dis. 1993, 167 : 830-840.
- 2.- Araneo B., Dowell T., Woods M., Daynes R., Judd M. and Evans T.: Dehydroepiandrosterone (DHEA) and aging: DHEAS as an effective vaccine adjuvant in elderly humans. Ann. N.Y. Acad. Sci 1995, 774: 232-248.
- 3.- Aspinall R., Kampinga J. and van den Bogaerde J.: T-cell development in the fetus and the invariant series hypotesis. Immunology today 1991, 12 : 7-10
- 4.- Black P.H.: Psychoneuroimmunology: Brain and immunity. Science medicine 1995 2: 16-25.
- 5.- Blecha F.: Immunomodulation: a means of disease prevention in stressed livestock.. Janimal Science 1988 66 : 2084- 2090.
- 6.- Boehmer H.: The developmental biology of T lymphocytes. Annual review of immunology 1988 6: 309-326.
- 7.- Boehmer H.: Developmental biology of T cells in T cell-receptor transgenic mice. Annual review of immunology 1990 8: 531-556.
- 8.- Boehmer, H. and Kieselow, P.: How The Immune System learns about self. Scientific American special issue MEDICINE 1993.102-109.
- 9.- Bogojevic M., Micic M., Leposavic G., Colic M., Isakovik K.: Stereological analysis of the thymic epithelial cells in rats during ontogenesis. Period.Biol. 1990 92 : 126
- 10.- Boyd R.L. and Hugo P.: Towards an integrated view of thymopoiesis. Immunology today 1991, 12: 71-78

- 11.- Braciale T.J. and Braciale V.L.: Antigen presentation: Structural themes and functional variations. Immunology today 1991, 12 : 124-129.
- 12.- Clark E.A. and Lane P.J.L. :Regulation of human B-cell activation and adhesion. Ann Rev.of Immunol. 1991, 9: 97-127.
- 13.- Clevers H.C. and Owen M.J.: Towards a molecular understanding of T-cell differentiation. Immunology today 1991 12 : 86-92
- 14.- Collins T.: Adhesion molecules in leucocyte emigration. Science medicine 1995 2 : 28-37
- 15.- Cotman C.W., Brinton R.E. Galaburda A., McEwen B. and Schneider D.M.:The Neuro-immune-endocrine connection. Raven Press. First Edition 1987. New York, USA.
- 16.-Dabrowski M.P. and Dabrowska-Bernstein B.K.: Immunoregulatory role of Thymus. CRC press, Inc. First edition 1990. Boca Raton Florida, USA.
- 17.- Dardenne M., Savino W., Gastinel L.: Thymulin. Thymic hormones and lymphokines. GWVMC Department of biochemistry. Plemen Press. New York, 1984.
- 18.- Davidsohn I., Bernard Henry J.: Diagnóstico clínico por el laboratorio. 6a. edición. Salvat Editores S.A. México, 1978.
- 19.- Daynes R.A., Araneo B.A., Hennebold J., Enioutina E. and Mu H.H.: Steroids as Essential Regulators of the Mammalian Immune Response. I. Invest. Derm. 1995, 105 : 14S-19S.
- 20.- Daynes R.A. and Araneo B.A.: The development of effective vaccine adjuvants employing natural regulators of T-cell lymphokine production (in vivo). Ann. N.Y. Acad. Sci. 1994, 730 : 144-161.
- 21.- Daynes R.A., Araneo B.A., Ershler W., Maloney C., Li G.Z. and Ryu S.Y. Altered regulation of IL-6 production with normal Aging. J.Immunol. 1993, 150 : 5219-5230.

- 22.- Daynes R.A., Enioutina E.Y., Butler S., Mu H.H., McGee Z.A. and Araneo B.A.: Induction of common Mucosal Immunity by Hormonally Immunomodulated peripheral immunization. Infection and Immunity 1996 64:1100-1109.
- 23.- Derbyshire J.B. and De Laat A.: Suppression of lymphocyte blastogenesis by porcine interferon- α . Research in Veterinary Science 1991 50: 376-378.
- 24.- Dorf M.E., Kuchroo V.K. and Collins M.: Suppressor T cels: some answers but more questions. Immunology today 1992, 13 : 241-243
- 25.- Duncan J.R. and Prase K.W.: Veterinary laboratory medicine. 2nd edition. ed. Iowa State University Press, Iowa USA. 1988.
- 26.- Dustin M. and Springer T.A.: Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. Annual review of Immunology 1991, 9 : 27-66.
- 27.- Ettinger S.J.: Tratado de medicina interna veterinaria. Tomos I,II y III. Editorial Intermédica. Tercera edición 1992. Buenos Aires, Argentina.
- 28.- Ezine S., Vasseur F. and Penit C.: Thy-1 modulation and cell proliferation at early steps of intrathymic bone marrow cell differentiation. Molecular immunology 1992, 29 : 1249-1256.
- 29.- Fawcett D.W.: Tratado de histología. Editorial Interamericana-Mc.Graw-Hill. Decimoprimer edición 1988. México D.F.
- 30.- Felsburg P.J.: Overview of the immune system and immunodeficiency diseases. The Veterinary Clinics of North America. 1994. 24 : 629-654
- 31.- Finkelman F., Holmes J., Katona I.M., Urban J.F., Beckman M.P., Park L.S., Schooley K.A., Coffman R.L., Mosmann T.R. and Paul W.E.: Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. Ann. Rev. Immunol. 1990 8 : 303-333.

- 32.-Franceschi C., Monti D., Sansoni P. and Cossarizza A.: The immunology of exceptional individuals: the lesson of centenarians. Immunology today. 1995, 16 : 12-15.
- 33.- Fudenberg H.H.: Overview: Allotypes. Genetics and molecular immunology. 1986 Ed. by D.M. Weir. Blackwell Scientific Publications New York USA.
- 34.- Gessner-A; Schroppel-K; Will-A; Enssle-KH; Lauffer-L; Rollinghoff-M.: Recombinant soluble interleukin-4 (IL-4) receptor acts as an antagonist of IL-4 in murine cutaneous Leishmaniasis. Infect-Immun. 1994, 62 : 4112-4117
- 35.- Gessner-A; Blum-H; Rollinghoff-M.: Differential regulation of IL-9-expression after infection with *Leishmania major* in susceptible and resistant mice. Immunobiology. 1993, 189 : 419-435
- 36.- Greco D.S. and Harpold L.M.: Immunity and the endocrine system. The Veterinary clinics of North America. 1994, 24: 765-782.
- 37.- Hadden J.W. and Hadden E.M.: Therapy of secondary T-cell immunodeficiencies with biological substances and drugs. Med.oncol. tumor Pharmacother. 1989, 6 : 11-17.
- 38.- Haque-S., Khan-I., Haque-A and Kasper-L: Impairment of the cellular immune response in acute murine toxoplasmosis: regulation of interleukin 2 production and macrophage-mediated inhibitory effects. Infect-Immun. 1994, 62: 2908-2916.
- 39.- Heinzl F., Rerko R.M., Ahmed F. and Pearlman E.: Endogenous IL-12 is required for control of Th2 cytokine responses capable of exacerbating Leishmaniasis in normally resistant mice. The Journal of Immunology. 1995 155: 730-739.
- 40.- Hennebold J.D. and Daynes R.: Regulation of Macrophage Dehydroepiandrosterone Sulfate Metabolism by Inflammatory Cytokines. Endocrinology. 1994, 135 : 67-75.

- 41.- Hennbold J., Ryu S.Y., Mu H.H., Galbraith A. and Daynes R.: 11 β -hidroxysteroid dehidrogenase modulation of glucocorticoid activities in lymphoid organs. Accepted Dec. 1995 in Am. J. Physiol. in press.
- 42.-Hernández G. R.: Antecedentes históricos y características genéticas del ratón desnudo. Memorias del curso: "El ratón desnudo en la investigación científica. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM 1991, México D.F.
- 43.- Hilton J., Dearman R. J., Basketter D.A. and Kimber I.: Serological responses induced in mice by immunogenic proteins and by protein respiratory allergens. Toxicol-Lett. 1994, 73 : 43-53
- 44.- Hinojosa B. L.: Estudio de los efectos del injerto de timo sobre la pubertad espontánea e inducida en el ratón alopecico-hipotímico. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. 1994.
- 45.- Huges H.P.A., Van Knapen F., Atkinson H.J., Balfour A.H. and Lee D.L.: A new soluble antigen preparation of *Toxoplasma gondii* and its use in serological diagnosis. Clin. exp. immunol. 1982, 49 : 239-246.
- 46.- Hunter C.A., Abrams J.S., Beaman M. H. and Remington J. S.: Cytokine mRNA in the central nervous system of SCID mice infected with *Toxoplasma gondii*: importance of T-cell-independent regulation of resistance to *T. gondii*. Infect-Immun. 1993, 61 : 4038-4044
- 47.- Jerne N. and Nordin A.A.: Plaque Formation in agar by single antibody producing cells. Science 1963, 140: 405.
- 48.- Kelso A.: Th1 and Th2 subsets: paradigm lost?. Immunology Today. 1995, 16 : 374-379.
- 49.- Khan I.A., Matsuura T. and Kasper L.H.: Interleukin-12 enhances murine survival against acute toxoplasmosis. Infect-Immun. 1994, 62: 1639-1642

- 50.-Kincade P.W., Lee G., Pietrangeli C.E., Hayashi S. and Gimble J.: Cells and molecules that regulate B lymphopoiesis in bone marrow. Ann.Rev. Immunol. 1989, 7 : 111-143.
- 51.- Kuby J. : IMMUNOLOGY. W.H. Freeman and company, second edition, New York. USA, 1994.
- 52.- Kyewski B. and Hünig T.: Taking the Thymus to pieces. Immunology today 1992 13: 288-290
- 53.- Krzych U., Strausser H., Bressler J. and Goldstein A.: Effects of sex hormones on some T and B cell functions as evidenced by differential immune expression between male and female mice and cyclic pattern of immune responsiveness during the estrous cycle. Reproductive immunology. Alan R.Liss, Inc. 1981. New York.
- 54.- Levitz S.M.; Mathews H.L. and Murphy J.W.: Direct antimicrobial activity of T cells. Immunology Today 1995, 16: 387-391.
- 55.- Lima-HC; Vasconcelos-AW; David-JR; Lerner-EA: American cutaneous leishmaniasis: in situ characterization of the cellular immune response with time. Am-J-Trop-Med-Hyg. 1994, 50 : 743-747
- 56.- Locksley R.M. and Scott P.: Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function. Immunoparasitology today 1991, 49: A58-A61
- 57.- Louis-JA: Importance of the different T lymphocytes subsets in immunity of mice against an intracellular protozoan parasite: *Leishmania major*. Pathol-Biol-Paris. 1993, 41 : 812-816
- 58.- Low T.L.K., and Goldstein A.L.: Thymosins: Isolation, structural studies and biological activities. Thymic hormones and lymphokines. GWVMC Department of biochemistry. Plemen Press. New York, 1984.
- 59.- Male D., Champion B., Cooke A. and Owen M.: Advanced immunology, second edition Gower Medical Publishing New York 1991

60.- **Marques de Cantú M.J.:** Probabilidad y Estadística para las Ciencias Químico-Biológicas. Editorial McGraw-Hill, Preedición, México D.F. 1991.

61.- **Matis L.A.:** The molecular basis of T-Cell specificity. Ann.Rev.Immunol. 1990 8 : 65-82

62.- **Melby-PC; Andrade-Narvaez-FJ; Darnell-BJ; Valencia-Pacheco-G; Tryon-VV; Palomo-Cetina.:** A Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. Infect-Immun. 1994, 62 : 837-842

63.- **Melvold R. W.:** Inbred, Congenic, Recombinant-Inbred and Mutant Mouse Strains. Genetics and molecular immunology. 1986 Ed. by D.M. Weir. Blackwell Scientific Publications New York USA.

64.- **Mendenhall W.; Scheaffer R.L. y Wackerly D.D.:** Estadística Matemática con aplicaciones. Grupo editorial Iberoamérica. Tercera edición, México D.F. 1986.

65.- **Miller J.F.A.P.:** The discovery of the immunological function of the thymus. Immunology today 1991, 12 : 42-45.

66.- **Minton J.E. and Blecha F.:** Effect of acute stressors on endocrinological and immunological functions in lambs. Journal of Animal Science 1990, 68 : 3145-3151.

67.- **Miralles G.D., Stoeckle M.Y., McDermott D.F., Finkelman F.D. and Murray H.W.:** Th1 and Th2 cell-associated cytokines in experimental visceral leishmaniasis. Infect-Immun. 1994, 62 : 1058-1063

68.- **Molad Y., Haines K.A., Anderson D.C., Buyon J.P. and Cronstein B.N.:** Immunocomplexes stimulate different signalling events to chemoattractants in the neutrophil and regulate L-selectin and beta 2-integrin expression differently. Biochem-J. 1994, 299 : 881-887

69.- **Morilla G.A. y Bautista G.C.:** Manual de inmunología. Primera edición. Editorial Diana S.A. México 1986.

70.- Nabors G.S. and Farrell J.P.: Site-specific immunity to *Leishmania major* in SWR mice: the site of infection influences susceptibility and expression of the antileishmanial immune response. Infect-Immun. 1994, 62 : 3655-3662

71.- Nikolic-Zugic J.: Phenotypic and functional stages in the intrathymic development of $\alpha\beta$ T cells. Immunology today 1991, 12 : 65-70.

72.- Olfert E.D., Cross B.M. and McWilliam A.A. : Guide to the care and use of experimental animals. Volume 1. Canadian Council on animal Care. 2nd Edition 1993. Canada.

73.- Paape M.J., Miller R.H. and Ziv G.: Pharmacologic enhancement or suppression of phagocytosis by bovine neutrophils. Am. Journal Veterinary Research 1991, 52 : 363-366

74.- Parmentier-HK; Siemonsma-R; Nieuwland-MG.: Immune responses to bovine serum albumin in chicken lines divergently selected for antibody responses to sheep red blood cells. Poult-Sci. 1994, 73 : 825-835

75.- Paul W.E.: Infectious diseases and the immune system. Scientific american Special issue IMMUNOLOGY 1993, 56-65.

76.- Parsons M., Herzenberg L.A., Stall A.M. and Herzenberg L.A.: Mouse immunoglobulins allotypes. Genetics and molecular immunology. 1986 Ed. by D.M. Weir. Blackwell Scientific Publications New York USA.

77.- Poduval T.: Quantitation of Lymphocyte mediated sheep red blood cell haemolysis using ELISA reader. J.Immunol.methods 1991, 142: 137.

78.- Proud A. and Kaplan A.P.: Kinin formation: mechanisms and role in inflammatory disorders. Ann.Rev.Immunol. 1988 6 : 49-83

79.- Ryter A. And Chastellier C.: Phagocyte-Pathogenic microbe interactions. International review of cytology. 1983, 85 : 287-325

80.- Rocha B., Vasalli P., and Guy-Grand D.: The extrathymic T cell development pathway. Immunology today 1992, 13 : 449-454.

- 81.- Roitt I., Brostoff J. and Male D.: Immunology. Gower medical publishing. London, England, 1985.
- 82.- Rosas P., Castellanos P. y Dominguez R.: The existence of spontaneous hairless (nude) hypothymic mutant mice from the CD 1 strain reared under conventional animal house conditions. Medical science research 1987, 15: 553-554.
- 83.- Rosas P., Chávez R., Cruz M.E. and Domínguez R.: Sex differences in serum corticosterone levels and circadian rhythms between hairless et/et mutant and CD 1 adult mice. Med. Sci. Res. 1989, 17: 283-284.
- 84.- Rosas P. Estudio de las características reproductoras de ratones desnudos hipotímicos y la vinculación del timo con la regulación neuroendócrina de la reproducción. Tesis de Doctorado Facultad de Ciencias U.N.A.M. 1990 México D.F.
- 85.- Rumyantsev S.N.: Observations on constitutional resistance to infection. Immunology today 1992, 13 : 184-187
- 86.- Sierra G. V.G.: Relación de los interferones con algunos aspectos esenciales de la respuesta inmune. Interferón y Biotecnología 1985, 2 : 163-192.
- 87.- Spencer N.F.L., Poynter M., Hennebold J., Mu H.H. and Daynes R.A. Dehidroepiandrosterone DHEA and Aging: Does DHEAS restore immune competence in aged animals through its capacity to function as a natural modulator of peroxisome activities? Ann. N.Y. Acad. Sci 1995, 774 : 200-216.
- 88.- Spry Christopher, Kay Barry and Gleich Gerald.: Eosinophils 1992. Immunology Today 1992, 13 : 384-387.
- 89.- Stites, D. y Terr A.: Inmunología básica y clínica. 7a. edición Editorial "El Manual Moderno". 1993.
- 90.- Streit W.J. and Kincaid-Colton C.: The brain's immune system. Scientific american 1995, 273 : 38-43.

- 91.-Tena-Betancourt E.: Guia de procedimientos adecuados de uso y cuidado de animales de laboratorio y bioterio. Comisión Interinstitucional de Prácticas Adecuadas de Manufactura. Monografía técnica. Primera edición 1994. México D.F.
- 92.- Thomsen M.K., and Thomsen H.K.: Effects of interleukin-1 α on migration of canine neutrophils in vitro and in vivo. Veterinary immunology and immunopathology 1990, 26 : 385-393.
- 93.- Tizard I.: Inmunología veterinaria. 4ª edición, Nueva editorial Interamericana, México, 1993.
- 94.-Tschopp J. and Nabholz M.: Perforin-mediated target cell lysis by cytolytic lymphocytes. Ann.Rev.Immunol. 1990, 8 : 279-302.
- 95.- Vljakovic-S; Dugandzija-Novakovic-S; Milanovic-S; Jankovic-BD.: Brain self-stimulation and immunity: effect on humoral and cell-mediated immune responses. Int-J-Neurosci. 1993, 69 : 235-250
- 96.- Vlatko S. and Suit H.D.: Innate cellular immunity in athymic nude NCr/SED mice. Period.Biol. 1990, 92 : 62-63.
- 97.- Vouldoukis I., Issaly F., Fourcade C., Paul Eugene N., Arock M., Kolb J.P., da Silva O.A., Monjour L., Poinso H., Tselentis Y.: CD23 and IgE expression during the human immune response to cutaneous leishmaniasis: possible role in monocyte activation. Res-Immunol. 1994, 145: 17-27
- 98.- Wang Z.E., Reiner S.L., Zheng S., Dalton D.K., Locksley R.M.: CD4+ effector cells default to the Th2 pathway in interferon gamma-deficient mice infected with *Leishmania major*. J-Exp-Med. 1994 , 179: 1367-1371
- 99.- Watanabe T.H.H., Seki S., Sugiura K., Hirokawa K., Utsuyama M, Takahashi-iwanaga H., Iwanaga T., Ohteki T. and Abo T.: Ontogeny and development of extrathymic T cells in mouse liver. Immunology 1992 , 77 : 556-563.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

100.- Weissman I. and Cooper M.: How the immune system develops. Scientific american Special issue IMMUNOLOGY 1993. 32-39

101.- Wiedmeier S.E, Mu H-H, Araneo B.A., and Daynes R.A.: Age and Microenvironment-Associated Influences by Platelet-Derived Growth Factor on T-cell Function. J. Immunol. 1994, 152: 3417-3426.

102.-Young R.A.: Stress proteins and immunology. Ann.Rev.Immunol. 1990, 8 : 401-420.