

84
2/8/85



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DEL
FACTOR TIMICO SERICO EN NIÑOS CON
SINDROME DE DOWN”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

SILVIA CATALINA RAMIREZ ARROYO



MEXICO, D. F.

1 9 8 5 .



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 está 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.

I N D I C E

	PAGS.
RESUMEN	2
CAPITULO I:	
INTRODUCCION	3
CAPITULO II:	
ANTECEDENTES CIENTIFICOS	5
CAPITULO III:	
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	14
OBJETIVOS	15
HIPOTESIS	16
DISEÑO EXPERIMENTAL	17
CAPITULO IV:	
MATERIALES Y METODOS	18
FUNDAMENTO METODOLOGICO	
CAPITULO V:	
RESULTADOS	35
CAPITULO VI:	
DISCUSION	59
CAPITULO VII:	
CONCLUSIONES	65
LISTA DE ABREVIATURAS	66
FIGURAS	68
CAPITULO VIII:	
BIBLIOGRAFIA	71

RESUMEN

El Factor Tímico Sérico (FTS) es un nonapéptido derivado del epitelio tímico, que induce la expresión del antígeno teta en la superficie de la membrana de algunas células linfoides, del bazo de ratones timentomizados. Por esta propiedad, el FTS puede ser cuantificado en el suero, con el ensayo de rosetas (LFR-E).

En el humano, se ha determinado que la actividad sérica del FTS está disminuida en algunas enfermedades autoinmunes e inmunodeficiencias como en el Síndrome Di George y ataxia telangiectasia.

Se ha reportado en pacientes con Síndrome de Down (SD), un defecto inmune básico con incremento de células nulas, por falla de la maduración de células precursoras timodependientes, probablemente por la ausencia de factores hormonales tímicos.

En este estudio, se determinó la actividad biológica del FTS y la subpoblación de linfocitos T de sangre periférica, en un grupo de 12 niños con SD (trisomía regular) homogéneo en edad, y en un grupo testigo de 5 niños con ataxia telangiectasia y en 17 niños sanos con edades similares a las de los dos primeros grupos.

En pacientes con SD se obtuvieron cifras de linfocitos T circulantes de 713 ± 128 LFR-E/mm³, que son inferiores a las observadas en la sangre de los niños sanos que fueron de 933 ± 65 , pero más altas que las obtenidas en niños con ataxia telangiectasia de 413 ± 84 , con una $p < 0.001$ en ambos casos.

Los niños con SD tuvieron disminuida la actividad biológica del FTS, con un rango de 1 a 3 expresada en \log_2 , mientras que en los niños sanos fue de 3 a 5 ($p < 0.001$). La actividad del FTS de los niños con SD es similar a la encontrada en niños con ataxia telangiectasia, lo que sugiere que los niños con SD se comportan como inmunodeficientes.

CAPITULO I

INTRODUCCION

El descubrimiento de la participación del timo en la inmunidad mediada por células, fue logrado al implantar un timo sinténico neonatal en ratones timectomizados al nacimiento y obtener la reconstitución de la función inmune normal. Si el timo es injertado dentro de una cámara millipore, con membranas impermeables a células (0.22 μ m de tamaño de poro), los efectos son similares, se reconstituye completamente la inmunocompetencia de estos ratones neonatalmente timectomizados, lo que involucra respuestas de anticuerpos anti-eritrocitos de carnero, rechazo de aloinjerto de piel y reacción injerto contra huésped, y además se previene la pérdida de peso y el enanismo; más aún, ocurre la restauración de las poblaciones linfoides en la sangre y órganos linfoides. Estos experimentos sugirieron la existencia de una hormona tímica (1, 2).

Pocos años después, con experimentos directos con extractos de timo bovino libres de células, inyectados en ratones neonatos timectomizados, se observó que estos ratones también recuperaban la capacidad de rechazar implantes de tejido alogénico (3). Tomando como base éstos y otros experimentos, el extracto tímico fue fraccionado y se pudo aislar una proteína con peso molecular de 12,600, con actividad biológica, que se denominó timosina (4).

Posteriormente, se demostró que un gran porcentaje de las células - linfoides que forman configuraciones de rosetas con eritrocitos de carne ro (LFR-E), son dependientes del timo y tienen en la membrana el antígeno teta (θ). Por el contrario, otras células linfoides no expresan este - antígeno, e incluyen células precursoras de linfocitos B y T. Se ha comprobado que el extracto tímico induce la aparición del antígeno teta en la membrana de una gran proporción de células formadoras de rosetas de - médula ósea normal, y en las células linfoides de ratones timectomizados (5-8).

La demostración de un factor presente en el suero de ratones normales, con la misma actividad biológica del extracto tímico, y la ausencia de este factor en el suero de ratones timectomizados, fue definitiva para la demostración de la hormona tímica (9).

C A P I T U L O II

ANTECEDENTES CIENTIFICOS.

La actividad biológica de la hormona tímica, se evalúa por su efecto sobre los linfocitos formadores de rosetas con eritrocitos de camero (LFR-E); este método es confiable y reproducible para caracterizar la actividad biológica del factor tímico circulante (FTS) (5,8,10). La eliminación específica de la actividad titulable del FTS en el ensayo de rosetas, por el paso de la muestra de suero sobre un inmunoadsorbente anti-FTS, comprueba que la actividad del suero en el ensayo de rosetas, es debida al FTS. Confinando el origen tímico del FTS, los ratones desnudos con ausencia congénita de timo, no tienen niveles de FTS detectables en su suero. Así mismo, la rápida desaparición del FTS circulante del suero después de la timectomía y reaparición en un lapso de 2 a 4 días después del implante de timo sin gónico (subcutáneo o intraperitoneal) neonatal, determinan su origen tímico (9). Recientemente, se ha logrado la demostración directa de la presencia del FTS en la fracción V de timosina (11).

PROPIEDADES BIOQUIMICAS DEL FTS CIRCULANTE

Como se ha reportado, el FTS es una hormona de naturaleza peptídica, con un peso molecular de 900; este peso es diez veces menor que el de la timosina de Goldstein, sin embargo, tiene de diez a mil veces más actividad biológica a la misma molaridad. A este oligopéptido se le ha llamado Factor Tímico Sérico y no Timosina, ya que son dos sustancias distintas, bioquímicamente relacionadas. Como resultado del análisis de aminoácidos y estudios

de secuenciación en el péptido intacto y en el péptido tratado con enzimas proteolíticas, la secuencia de aminoácidos propuesta para el FTS actualmente es:

<Gln-ala-lis-ser-gln-gli-gli-ser-asn-OH

El FTS se ha podido sintetizar artificialmente. Se ha probado que el FTS natural y sintético tienen actividad similar en el ensayo de rosetas y en todos los ensayos *in vitro* e *in vivo* en que se han comparado; -- así mismo, se comportaron idénticamente en todas las pruebas químicas a que fueron sometidos (12, 13, 14).

DEPENDENCIA DEL FTS DEL EPITELIO TIMICO

El timo contiene dos tipos de células: linfocitos y células epiteliales. Las células epiteliales aparecen primero en el timo fetal, antes que las células linfoides; se ha demostrado que los implantes de epitelio tímico son rápidamente repoblados por linfocitos. Se sospechó que el FTS -- era dependiente de las células epiteliales del timo por la actividad secretoria de estas células, demostrada por microscopía electrónica y por la ausencia del FTS en ratones cepa NZB jóvenes, que muestran atrofia temprana del epitelio tímico. El origen epitelial del FTS, se demostró por la reconstitución de los niveles normales de FTS en ratones timectomizados, -- que se obtuvo 2 a 5 días después de injertar un número relativamente pequeño de células epiteliales, directamente, o dentro de una cámara millipore; el implante de un número idéntico de timocitos normales (principalmente -- linfocitos), no ocasionó la aparición de niveles detectables de FTS. Sin --

embargo, se han podido restaurar los niveles normales de FTS en el suero - de ratones timectomizados, por la aplicación de gran número de timocitos - disociados. La aplicación del extracto tímico libre de células, se ha pro- bado que restaura temporalmente los niveles de FTS circulante (15).

Más recientemente, la presencia del Factor Tímico en las células epi- teliales del retículo tímico, fue directamente demostrada por inmunofluores- cencia, usando antisuero convencional anti-FTS (16,17) o anticuerpos mono- clonales anti-FTS (18).

ONTOGENIA

La hormona tímica se encuentra a su máximo nivel al nacimiento. El - FTS es secretado por el feto, como se ha confirmado por la reaparición de- este factor en la sangre de ratones embarazadas timectomizadas, después - del 15o. día de gestación (19).

El nivel de FTS es estable en la mayoría de las cepas de ratones has- ta los seis meses, después disminuye progresivamente. Este decremento en - el nivel de FTS es paralelo a la disminución en el peso del timo y precede por varios meses el deterioro en la inmunidad mediada por células y de la- inmunidad humoral, observado con el envejecimiento (20). La declinación - del FTS en el hombre, se ha observado después de la edad de 20 años, en - forma paralela a la involución en el peso del timo (10).

La actividad del FTS se ha encontrado en varias especies como ratones, terneras, cerdos, borregos, pollos y humanos. Estudios bioquímicos han de- mostrado que no existe diferencia muy lejana entre las características del

FIS de ratón, cerdo y humano (10,13) .

SITIO DE ACCION, SIGNIFICANCIA BIOLOGICA

Experimentos in vivo han demostrado que la actividad de la función tímica humoral sobre las células linfoides, varía según la forma en que se haya perdido la actividad tímica. Los efectos inducidos en ratones timectomizados al nacer o en edad adulta, son rápidamente corregidos por el FIS.- Los resultados obtenidos en ratones timectomizados-irradiados-reconstituidos con médula ósea después de la administración de FIS, son mucho menos evidentes y aún menores en ratones "desnudos" (con agenesia de timo). El hecho de que se requiera mayor cantidad de FIS para inducir la expresión del antígeno teta en linfocitos de bazo de ratones "desnudos", sugiere que las células linfoides primitivas de estos ratones, son menos sensibles al efecto del FIS, que las células linfoides de ratones timectomizados que sufrieron cierto grado de maduración durante la vida fetal o antes de la timectomía. Estos experimentos sugieren que la función humoral tímica actúa exclusivamente sobre células T parcialmente diferenciadas (aún no competentes), que se encuentran en tejidos neonatales y adultos, incluyendo la médula ósea. Estas células se denominan como células T "post-tímicas" (3).

INHIBIDORES DEL FIS.

Se ha comprobado la presencia de varios inhibidores del FIS en el suero, en el ensayo de rosetas; uno de alto peso molecular y dos de bajo peso molecular. El peso molecular del primero se encuentra entre 100,000 y ---- 300,000 y no está unido en forma covalente al FIS ni lo destruye, ya que puede separarse de él mediante ultrafiltración, observándose un incremento

neto en la actividad de rosetas. Los otros dos inhibidores tienen un peso molecular de 4,000 y 20,000 (9).

En el suero, el 50% de la actividad del FTS se destruye durante 90 minutos a 37°C, o toda la noche a 4°C; y más del 90% de su actividad se pierde a 37°C por tres horas, pero es estable el mismo periodo de tiempo en el suero ultrafiltrado. Entre las enzimas líticas del FTS se encuentran carboxipeptidasa A, pronasa, tripsina y quimotripsina, pero son removidas por membranas de ultrafiltración Amicón CF 50 (13).

ACCION DEL FTS A NIVEL CELULAR

Se ha demostrado que las células fagocíticas humanas y linfocitos sintetizan prostaglandinas. Estas prostaglandinas son potentes moduladores de las respuestas inmunes mediadas por células. Se ha demostrado que el AMPc o productos que incrementan su nivel en linfocitos como prostaglandinas PGE_1 o PGE_2 , tienen un efecto similar al FTS sobre las células formadoras de rosetas, también inducen sensibilidad al suero anti-teta en células teta negativas; se demostró sinergismo entre AMPc y FTS para ese efecto. Las prostaglandinas pueden actuar como intermediarios entre el estímulo inducido por el FTS y la síntesis del AMPc, ya que la indometacina, un potente inhibidor de la prostaglandin sintetasa, inhibe los efectos del FTS. Estos datos sugieren la participación del AMPc y eventualmente de prostaglandinas, en la regulación de la expresión teta, bajo el control del FTS (21,22).

Se ha demostrado recientemente, que bajas concentraciones de FTS (1-5 ng/ml), incrementan la síntesis de las prostaglandinas PGE_2 y PGD_2 en linfocitos humanos (23).

De esta forma, aunque se conoce poco del modo de acción del FTS a nivel celular, se sabe que las prostaglandinas y el sistema del AMPc están involucrados en el desarrollo de sus efectos relativamente rápidos y reversibles.

FTS EN ALGUNAS ENFERMEDADES INMUNOLÓGICAS.

En el humano se han evaluado los niveles séricos del factor tímico circulante en diversos padecimientos, y se han reportado niveles disminuidos de FTS en lupus eritematoso sistémico (24), deficiencia selectiva de IgA y en ataxia telangiectasia; contrastando con los altos niveles encontrados en artritis reumatoide y psoriasis. La actividad biológica del FTS, no ha sido detectada en pacientes con Síndrome Di George (aplasia tímica). En el Síndrome Di George, se ha demostrado la restauración del nivel normal de FTS después del implante de timo (25).

CARACTERISTICAS GENERALES DEL SINDROME DE DOWN

El Síndrome de Down o trisomía-21, es la aberración autosómica humana más común. Su frecuencia es de 1.45 por 1000, es decir, aproximadamente un caso por cada 700 nacimientos. Se ha reportado que los pacientes con Síndrome de Down tienen una mayor frecuencia de mortalidad, particularmente en la edad perinatal y durante el primer año de vida (26). Las características fenotípicas principales observadas en los niños con SD son:

- Hipotonía elevada en los lactantes
- Cara redonda, con perfil plano
- Cráneo pequeño y redondo, occipucio aplanado
- Hendiduras palpebrales orientadas hacia arriba y afuera
- Orejas pequeñas y redondas
- Boca pequeña, con labios gruesos
- Abdomen distendido, presenta a menudo una hernia umbilical
- Mano ancha y rechoncha, los dedos son cortos.
- Pie ancho, pequeño y plano, con los 2 primeros dedos muy separados.

El peso, y sobre todo, la talla de los pacientes con SD, permanecen inferiores a lo normal. Las malformaciones viscerales son frecuentes. Las más importantes son las cardíacas, que afectan al 40% de los trisómicos. Entre las localizaciones génicas del cromosoma 21, la de la superóxido-dismutasa-1 (SOD-1) se ha confirmado por el aumento de la actividad enzimática, en las personas con trisomía-21 (27).

ASPECTOS INMUNOLOGICOS DEL SINDROME DE DOWN

Los pacientes con SD, además de presentar retraso mental, muestran una

mayor susceptibilidad a las infecciones, persistencia del antígeno Australia y tienen mayor riesgo de presentar enfermedades malignas. Con frecuencia, los pacientes con SD presentan autoanticuerpos anti-tiroides y envejecimiento prematuro del sistema inmunológico (26,28), disminución de la subpoblación de linfocitos T, similar a la observada en los pacientes con inmunodeficiencia y enfermedades malignas, linfoproliferativas (29-31). Hay reportes de disminución de la síntesis de inmunoglobulinas M y A en niños con SD (32-34). La respuesta inmune mediada por anticuerpos está más deteriorada en los niños con SD que en los adultos con SD (33). En estudios de inmunidad celular, los pacientes con SD evolucionan con menor actividad citotóxica y poca reactividad linfoblástica a fitomitoógenos (34-37). Estas alteraciones, se ha demostrado que no están relacionadas con la alteración del metabolismo de purinas, observada en algunos pacientes con SD que tienen hiperuricemia (38). Se ha demostrado en células PMN de pacientes con SD que la disminución de la actividad fagocítica, quimiotáctica y de destrucción intracelular, está relacionada con la disminución de zinc sérico que presentan los pacientes, ya que estas respuestas mejoran cuando se administra zinc (39). Algunos estudios con orientación inmunoviroológica, han sugerido que en pacientes con SD, la inmunidad dependiente de células está aumentada por la respuesta linfoblástica con antígenos virales, sugiriendo la participación del interferón como factor regulador (28,37). Algunas de estas alteraciones, particularmente las mediadas por células timo dependientes, mejoran en los pacientes por el efecto del FTS (35). Por lo que se ha sugerido un defecto inmunológico básico con incremento de células nulas (no diferenciadas) (40), por falla en la maduración de células precu

oras timodpendientes, probablemente por la ausencia de factores hormonales tínicos.

CAPITULO III

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:

Se ha propuesto que el defecto inmunológico básico en los niños con Síndrome de Down, es la falla en la maduración de células precursoras de linfocitos timo-dependientes a linfocitos T completamente diferenciados -- por la ausencia de factores hormonales tímicos. En los estudios reportados de FTS en Síndrome de Down se han incluido pacientes de diferentes -- edades, por lo que los resultados son variables. No se ha estudiado a un grupo de niños con Síndrome de Down homogéneo en edad y trisomía regular.

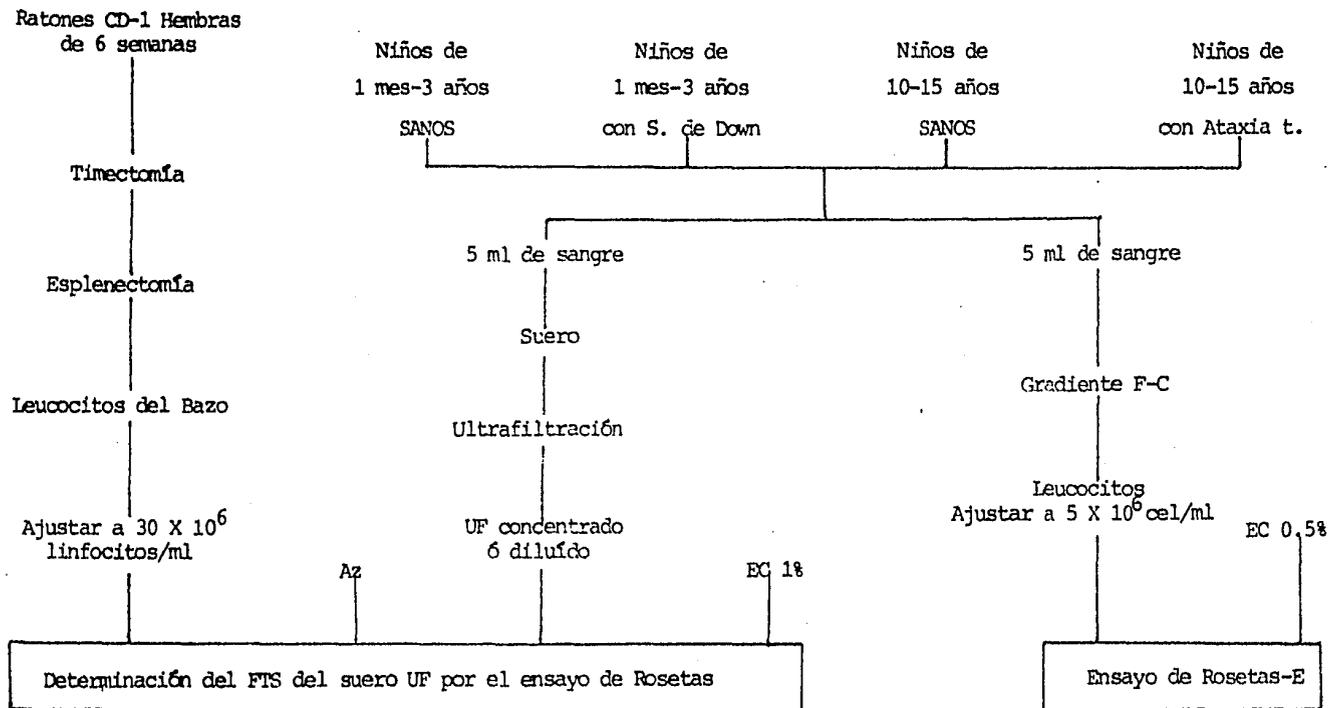
OBJETIVOS:

- 1.- Evaluar la actividad biológica del Factor Tímico Sérico en niños con Síndrome de Down.
- 2.- Determinar la subpoblación de linfocitos timo-dependientes circulantes, en niños con Síndrome de Down.
- 3.- Determinar la relación existente entre la actividad biológica del Factor Tímico Sérico y los niveles de linfocitos formadores de rosetas-E de sangre periférica.
- 4.- Comparar los resultados que se obtengan en los niños con Síndrome de Down, con los valores de Factor Tímico y Linfocitos T que se encuentren en niños sanos y en niños con Ataxia telangiectasia.
- 5.- Determinar si en los niños con Síndrome de Down existe una deficiencia en la inmunidad mediada por células, semejante a la encontrada en pacientes con Ataxia telangiectasia.

HIPOTESIS:

La actividad biológica del Factor Tímico Sérico, así como la subpoblación de linfocitos timo-dependientes de sangre periférica, se encuentran disminuidas en los niños con Síndrome de Down respecto a los niños sanos. La actividad del Factor Tímico circulante y los niveles de linfocitos T en niños con Síndrome de Down, son similares a los que presentan los niños con Ataxia Telangiectasia.

DISEÑO EXPERIMENTAL



CAPITULO IV

MATERIAL

- Equipo de microcirugía.
- Cánula de 3 mm de diámetro.
- Suturas de nylon de cinco ceros (Nylon Dermalon, Davis-Geck SCE-4)
- Pinzas de disección.
- Tijeras.
- Guantes estériles.
- Cubrebocas.
- Tela adhesiva.
- Gasas.
- Algodón.
- Tablas de corcho.
- Jaulas para ratones.
- Malla de acero inoxidable (poro de 0.3 mm).
- Embolo de cristal pequeño.
- Jeringas desechables de 1, 10 y 20 ml (Plastipak).
- Pipetas Pasteur.
- Pipetas de vidrio graduadas de 0.1, 1, 2, 5 y 10 ml.
- Pipetas de Thoma para glóbulos blancos.
- Micropipetas de 300 y 500 ul (Oxford Sampler).
- Puntas de plástico para las micropipetas.
- Bulbos de goma.
- Cámara de Neubauer (Spencer).

- Cajas Petri (60 x 15 mm).
- Matraces Earlenmeyer de 100, 250 y 1000 ml.
- Matraces aforados de 500 y 1000 ml.
- Frascos de vidrio de 100, 250, 500 y 1000 ml.
- Tubos cónicos de policarbonato de 15 ml graduados (Oak/Ridge).
- Tubos de plástico de fondo redondo de 5 ml (Falcon).
- Tubos de vidrio de 10 ml con tapón de rosca.
- Tubo de policarbonato CTL.
- Soporte cónico de polietileno CS1A.
- Conos de membrana Tipo CF 50 A (Centriflo, Amicon).
- Membrana de tamaño de poro de 0.45 μ m (Millipore) Tipo HA.
- Portafiltros (Millipore).
- Barra magnética.
- Gradillas.

APARATOS

- Bomba de vacío (GOMCO).
- Cámara de oxígeno (FOREGGER).
- Agitador magnético (Cole-Parmer Instrument Company Model 4820-40).
- Potenciómetro (International Científica, S.A. ES10).
- Microscopio (Carl Zeiss).

- Estufa a 37°C (Lab-Line Instruments, Inc. V.I.P. CO₂ Incubator 417)
- Balanza Analítica (Torbal Sartorius 2462).
- Centrífuga (International Centrifuge IEC, Model CS).
- Centrífuga Refrigerada (IEC Model CRU-5000 Centrifuge).
- Centrífuga Sorvall (RC-5 Superspeed Refrigerated Centrifuge, Dupont-Instruments. Cabezal tipo SS-34).

REACTIVOS:

- Solución salina estéril (Abbott).
- Pentobarbital sódico (Anestesa Smith Kline).
- Solución de Benzal Oil.
- Alcohol.
- Solución salina amortiguada de Hanks.
- Solución TRIS-NH₄Cl 0.15 M.
- Colorante Azul de Tripán.
- Solución de Alsever.
- Heparina 1000 U.I. por ml (Lipo-Hepín).
- Ficoll-Conray (1.077 g/ml).
- Tabletas de Azatioprina (Imuran, Wellcome).
- Solución de NaOH 0.1 N.
- Solución de HCl 0.1 y 1 N

MATERIAL BIOLÓGICO.

- Ratones hembras cepa CD-1, de 6 semanas de edad.
- Eritrocitos de carnero en Solución de Alsever (V:V).

MATERIAL HUMANO:**GRUPO I (Problema):**

Se formó con 12 niños con Síndrome de Down, cuyo cariotipo correspondía a una trisomía regular (Fig. No. 1). El cariotipo fue realizado por el personal del laboratorio de Genética, Hosp. de Pediatría, C.M.N. Sus edades se encontraban entre 1 mes y 2 años. Se incluyeron en el estudio únicamente los pacientes que no presentaron proceso infeccioso ni recibieron antibióticos, en las últimas dos semanas previas al estudio.

GRUPO II (testigo):

Se integró con 5 niños con Ataxia telangiectasia, con edades comprendidas entre 10 y 15 años. Estos niños no tenían proceso infeccioso, ni se encontraban en tratamiento con antibióticos, en las últimas dos semanas anteriores al estudio. Este tipo de pacientes se ha reportado que tienen actividad biológica disminuida de FTS.

GRUPO III (testigo):

Este grupo se formó con niños considerados sanos, que acudieron al laboratorio para estudios preoperatorios, y que no presentaban procesos infecciosos, neoplásicos ni autoinmunes. Se tomaron muestras de 12 niños con edades similares al grupo I y de 5 niños con edades similares al grupo II.

A cada uno de estos niños se les extrajeron del pliegue del codo — 10 ml de sangre venosa, con jeringa desechable de plástico. De esta muestra de sangre, se utilizaron 5 ml para la determinación de la actividad biológica del FTS y 5 ml para determinar el número de linfocitos-T por milímetro cúbico.

MÉTODOS.**ABLACION DEL TIMO EN RATONES CEPA CD-1.****Fundamento:**

Las células formadoras de rosetas presentes en el bazo normal, están — compuestas de un 70% de células teta positivas, con alta sensibilidad — in vitro a Azatioprina. Estas células con alta sensibilidad a Azatioprina se eliminan del bazo por timectomía en ratones adultos, en menos de seis días.

Procedimiento:

El ratón fue anestesiado con pentobarbital sódico (50 mg/kg de peso), por vía intraperitoneal. Después, se colocó sobre la tabla de corcho en posición prona, con sus cuatro miembros extendidos e inmovilizados con cinta adhesiva. Se esterilizó la pared anterior del tórax con solución de benzal al 10%. Se hizo una incisión transversal en la piel, a la mitad del esternón; en el tercer espacio intercostal, se sujetó firmemente el esternón con unas pinzas y se cortó transversalmente. El tino se observó inmediatamente por debajo de la incisión. Se sujetó entonces el esternón hacia arriba utilizando las pinzas y se introdujo la cánula, conectada a la bomba de vacío, para succionar los dos lóbulos tímicos (Fig. No. 2). Se cerró el tórax con hilo de nylon de cinco ceros y se suturó la piel. Los ratones se colocaron en una cámara de oxígeno y se vigilaron hasta su recuperación total (41,42).

PREPARACION DEL SUERO PARA IDENTIFICACION DEL FTS.**Fundamento:**

El suero de individuos sanos contiene FTS, que puede ser separado por ultrafiltración de otros constituyentes del suero, principalmente del inhibidor de alto peso molecular.

Procedimiento:

Se colocaron 5 ml de la sangre obtenida en tubos de plástico Falcon y se dejaron coagular a 4°C. Se centrifugaron durante 10 min. a 400 Xg en la centrífuga refrigerada para separar el suero. Aproximadamente --- 3 ml de suero se colocaron en los conos de ultrafiltración y se centrifugaron una hora a 1000 Xg en la centrífuga Sorvall, a 2-4°C. El suero -- ultrafiltrado así obtenido, se conservó a 4°C, hasta que fue utilizado el mismo día (9,43).

OBTENCION DE LINFOCITOS DEL BAZO DE RATONES CD-1 HEMBRAS.

Fundamento.

El bazo está constituido por diferentes subpoblaciones de linfocitos-formadores de rosetas "E" y "EAC".

Procedimiento:

Los ratones fueron sacrificados por descerebración. Se excluyeron -- del estudio los ratones timectomizados que conservaban remanente de te -- jido tímico. Se extrajo el bazo de los ratones a través de una incisión-transversal abdominal. El bazo se colocó en una caja Petri que contenía 8-10 ml de solución de Hanks heparinizada, y se le hicieron varios cortes-

en la cápsula fibrosa. Los pequeños pedazos del bazo se pasaron a la malla de acero inoxidable y se presionaron con un émbolo de cristal para disgregar las células, las que fueron arrastradas con la solución de Hanks heparinizada y se obtuvieron en un tubo cónico de policarbonato. Esta suspensión celular se dejó reposar unos minutos para que sedimentaran los trozos grandes de tejido, y el sobrenadante se pasó a otro tubo y se centrifugó durante 10 minutos a 200 Xg. Se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 2-3 ml de solución balanceada de Hanks y se agregó el mismo volumen de TRIS-NH₄Cl, resuspendiendo suavemente con una pipeta Pasteur. Esta suspensión celular se dejó reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente, y al cabo de este tiempo se centrifugó 10 minutos a 200 Xg. Se desechó todo el sobrenadante y se lavó 2 veces el paquete celular con solución de Hanks. Después del último lavado se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron con solución de Hanks. Se tomó una alícuota con una pipeta para glóbulos blancos y se aforó con el colorante vital azul de tripán a pH 7.2. Se agitó la pipeta durante 3 minutos, se desecharon las 4-5 primeras gotas y se cargó la cámara de Neubauer. Se determinó el número de células y su viabilidad por exclusión del colorante, observando al microscopio con el objetivo de 10 X. Se ajustó la concentración a 30×10^6 cel/ml y se continuó con el experimento sólo cuando la viabilidad celular fue mayor al 80% (5).

MEDICION DE LA ACTIVIDAD DEL FACTOR TIMICO SERICO (FTS).

Fundamento:

Este método consiste en inducir a las células precursoras de linfocitos T del bazo de ratones timectomizados (RTx), a que muestren en la superficie de su membrana celular el receptor para eritrocitos de carnero, después de la incubación con la hormona tímica (FTS), o específicamente con las muestras de suero que se supone la contienen. Se utiliza la Azatioprina que inhibe específicamente a los LFR-E del bazo beta positivos, que son los que forman rosetas espontáneas con eritrocitos de carnero y desaparecen después de la timectomía en ratones adultos. La actividad biológica del FTS es medida por el ensayo de inhibición de la formación de rosetas con Azatioprina.

Procedimiento:

Se utilizaron 10 tubos de plástico de fondo redondo por duplicado para cada niño, numerados sucesivamente. En el tubo 1 al 6, se depositaron 0.3 ml de la solución de Hanks pH 7.1. Al primer tubo se le adicionaron 0.3 ml del suero ultrafiltrado, se mezcló perfectamente y se pasaron 0.3 ml al segundo tubo, y así sucesivamente hasta el tubo número 6, en el que después de mezclar se desecharon 0.3 ml; de esta-

manera se tuvieron diluciones del suero en relación 1:2 hasta 1:64. A cada uno de estos tubos se les agregaron 0.2 ml de la suspensión de células de bazo de ratón timectomizado (RTx) ajustadas a 30×10^6 cel/ml y 0.3 ml de azatioprina diluida en solución salina ajustada a pH 7.8, a una concentración de 500 ug/ml.

Los otros 4 tubos se tomaron como controles: en todos se colocaron 0.2 ml de células de RTx. Al primero, se le adicionaron 0.6 ml de solución de Hanks; al segundo, 0.3 ml de solución de Hanks y 0.3 ml de suero ultrafiltrado (UF) concentrado; al tercero, 0.3 ml de solución de Hanks y 0.3 ml de la Azatioprina diluida; y al último, 0.3 ml de suero UF concentrado y 0.3 ml de la dilución de Azatioprina.

Todos los tubos se incubaron durante 75 minutos a 37°C. Posteriormente se les adicionó 0.2 ml de una suspensión de eritrocitos de carne ro, lavados y ajustados al 1% en solución de Hanks, y se centrifugaron por 5 minutos a 200 Rg. Se resuspendió muy suavemente el sedimento con una pipeta Pasteur y se colocó una alícuota en una cámara de Neubauer. Se contó el número de LFR-E en los 4 cuadrantes para leucocitos, y se calculó el número de linfocitos formadores de rosetas-E por milímetro cúbico (LFR-E/mm³).

El coeficiente de inhibición se determinó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$CI = \frac{\text{LFR-E con Az} \times 100}{\text{LFR-E}} - 100$$

CI = coeficiente de inhibición

LF_R-E con Az = linfocitos formadores de rosetas-E con Azatioprina.

La última dilución del suero que induce sensibilidad a azatioprina- (CI mayor o igual al 50%), es tomada como la concentración activa de factor tímico sérico (6-11).

MEDICION DE LINFOCITOS FORMADORES DE ROSETAS T (LF_R-E) DE SANGRE PERIFERICA.

Fundamento:

Se denomina roseta-E a la adherencia espontánea de los eritrocitos - de carnero a los linfocitos T humanos. Se considera una roseta cuando 3 o más eritrocitos se han adherido a una célula nucleada, aunque en muchos - casos los eritrocitos cubren totalmente a la célula, presentando el aspec- to de mórula. Por esta propiedad, el método de rosetas-E se ha utilizado - para la identificación de subpoblaciones timodependientes.

Procedimiento:

Se depositaron los otros 5 ml de la sangre obtenida en un tubo de vi- drio con tapón de rosca, que contenía 0.1 ml. de heparina y se agitó sua- vemente varias veces. Por otra parte, se colocaron en un tubo cónico de -- policarbonato, 5 ml de Ficoll-Conray y se adicionó cuidadosamente la san- gre con una pipeta Pasteur. Se centrifugó durante 40 minutos a 350 Xg. Des- pués se separó el paquete de linfocitos en la interfase con una pipeta --- Pasteur y se colocó en otro tubo cónico. Se lavó tres veces con solución -

de Hanks a pH 7.2. Finalmente, el paquete celular se resuspendió en 1 ml. de solución de Hanks, se tomó una alícuota con una pipeta para glóbulos blancos, y se aforó con azul de tripán. Se agitó, se desecharon las primeras gotas y se llenó la cámara de Neubauer. Se observó al microscopio con el objetivo de 10 X y se contó el número de células obtenidas en los 4 cuadrantes de leucocitos. La concentración fue ajustada a 5×10^6 cel/ml. El procedimiento se continuó cuando la viabilidad celular fue mayor o igual al 90%. De esta suspensión de leucocitos viables, se tomaron alícuotas de 0.25 ml y se colocaron en tubos de plástico de fondo redondo. Se les agregaron 0.25 ml de una suspensión de eritrocitos de carnero, lavados y ajustados al 0.5% con solución de Hanks. Se incubaron 15 minutos a 37°C y después se centrifugaron durante 5 minutos a 200 Xg. Posteriormente, se incubaron 90 minutos a 4°C. Se resuspendió muy suavemente el sedimento con una pipeta Pasteur y se colocó una alícuota en la cámara de Neubauer. Se observó al microscopio con el objetivo de 40 X. Se contó el número de rosetas T obtenidas en 4 cuadrantes de leucocitos y se reportó el número de linfocitos formadores de rosetas T (LFR-E) (Fig. No. 3) por milímetro cúbico (44,45).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados de linfocitos T fueron comparados por la prueba t de Student. Los resultados de la actividad de factor tímico sérico fue--

ron comparados por métodos no paramétricos (prueba de rangos), con un límite de confianza del 95% (46,47).

PREPARACION DE REACTIVOS.

Solución de Alsever.

Fórmula:

Glucosa _____	20.5 g
Citrato de sodio. $3H_2O$ _____	8.0 g
Acido cítrico monohidratado _____	0.55g
Cloruro de sodio _____	4.2 g
Agua dest. c.b.p. _____	1000 ml

Ajustar pH a 6.1 con ácido cítrico 1 M. Esterilizar con filtro Milli-pore. Se puede meter en autoclave pero sólo una vez.

Solución de Hanks.

Fórmula:

NaCl _____	8.0 g
KCl _____	0.4 g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ _____	0.14 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ _____	0.315g
$Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$ _____	0.12 g
KH_2PO_4 _____	0.06 g
$NaHCO_3$ _____	0.35 g
Dextrosa _____	1.0 g
Rojo de fenol _____	0.007g
Agua desionizada c.b.p. _____	1000 ml

Se van agregando los reactivos al agua desionizada uno por uno, manteniendo la solución en agitación constante. Disolver perfectamente y -- aforar a 1 litro. Ajustar el pH con NaOH 0.1 N ó HCl 0.1 N. Guardar la solución en refrigeración.

Solución de TRIS-NH₄Cl 0.15 M.

Fórmula:

Buffer TRIS.-

Base Tris _____ 2.06 g

Agua desionizada c.b.p. _____ 100 ml

Ajustar a pH 7.65 con HCl

Cloruro de Amonio 0.15 M.-

NH₄Cl _____ 0.83 g

Agua desionizada c.b.p. _____ 100 ml

Se prepara agregando 10 ml de buffer Tris a 90 ml de NH₄Cl 0.15 M. El pH de la mezcla es finalmente ajustado a 7.2. Mantener en refrigeración.

Azul de Tripán.

Fórmula:

Azul de tripán _____ 1.0 g
 Sol. salina isotónica _____ 25 ml.

Filtrar y al momento de utilizarlo diluirlo 1:10 en solución de Hanks.
 Es un colorante vital, y debe prepararse y guardarse en condiciones estériles.

Ficoll-Conray

Fórmula:

Ficoll 400

Polímero de sacarosa y epiclorhidrina con

PM de 400,000 (Pharmacia Fine Chemicals,

Upsala Sweden) _____ 9.0 g

Conray

N - metilsuftalámico (Mallunckrodt - Pharma-

ceuticals, St Luis Missouri) _____ 20 ml

Agua destilada _____ 70 ml

Se agita la mezcla hasta disolver totalmente el Ficoll. No necesita refrigeración.

CAPITULO V

RESULTADOS

CARACTERISTICAS DE LOS NIÑOS ESTUDIADOS.

Se estudiaron un total de 34 niños, que se agruparon de la siguiente manera: el primer grupo se formó con 5 testigos sanos, 2 mujeres y 3 hombres con edades comprendidas entre 10 y 13 años; el segundo grupo se compuso de 5 niños con diagnóstico de Ataxia telangiectasia, una mujer y 4 hombres con un rango de edades de 10 a 15 años, este grupo representaba al testigo con actividad disminuída de FTS; el tercer grupo se formó de 12 niños sanos, 4 mujeres y 8 hombres, cuyas edades se encontraban entre 3 meses y 3 años; y el cuarto grupo, propósito de este estudio, estuvo formado de 12 niños con Síndrome de Down (trisomía regular), 5 mujeres y 7 hombres, cuyas edades estaban en un rango de 1 mes a 2 años (Tabla No. 1).

EFECTO DE LA TIMECTOMIA EN RATONES HEMBRAS CD-1.

Se timectomizaron 10 ratones hembras CD-1 de 6 semanas de edad y se les midió el número de linfocitos formadores de rosetas-E por milímetro cúbico en el bazo, dos semanas después de la timectomía. Los resultados se compararon con el número de LFR-E de bazo de ratones normales. Se observó en los ratones timectomizados menor número de LFR-E/mm³ ($\bar{x}=131.3 \pm 20.2$) respecto a los ratones controles ($\bar{x} = 190.8 \pm 14.3$). Estos valores promedio se compararon y las diferencias fueron significativas ($p < 0.001$) (tabla estadística No. 1).

EFECTO DE LA AZATIOPRINA SOBRE LOS LFR-E DEL BAZO.

Se investigó el efecto de diferentes concentraciones (100, 300, 500, 750 y 1000 ug/ml) de Azatioprina en linfocitos de bazo de ratones normales y timectomizados. Se observó que el número de LFR-E/mm³ disminuía al aumentar la concentración de Azatioprina, siendo este efecto inhibitorio más marcado en los ratones normales (Tablas No. 2 y 3, gráfica No. 1). Se determinó el coeficiente de inhibición, y se observó que en ratones normales con concentraciones de Azatioprina de 300 y 500 ug/ml, se inhibía el 50% de LFR-E; en los linfocitos de bazo de ratones timectomizados, la inhibición mayor o igual al 50%, se obtuvo con concentraciones de 500 y 750 ug/ml (Tablas No. 4 y 5, gráfica No. 2).

ACTIVIDAD DEL FTS IN VITRO.

Se midió la actividad del FTS de los sueros de los niños de los diferentes grupos estudiados, en linfocitos de bazo de ratones timectomizados, por su capacidad para inducir LFR-E. Se observó que el número de LFR-E/mm³ inducido con el suero de niños con Síndrome de Down, fue de 133.1 ± 16.8, que fue menor que el número obtenido con el suero de los niños sanos de 154.2 ± 22.1 LFR-E/mm³. Estos resultados se compararon con el número de LFR-E/mm³ obtenidos sin suero (110.2 ± 17.5), obteniéndose un valor de p < 0.001 en ambos grupos. En los pacientes con Ataxia telangiectasia, la actividad del suero mostró cifras de LFR-E de 136.5 ± 20.7/mm³, que al compararlas con el número de LFR-E obtenido en ausencia de suero (127 ± 12.4) fueron más altas, pero la diferencia no es significativa (Tabla No. 6, gráfica No. 3, tabla estadística No. 1).

Se determinaron los incrementos en el número de LFR-E al incubar -- con los sueros de los diferentes grupos de niños, y se reportaron como-- coeficientes de actividad del suero. Los pacientes con Síndrome de Down presentaron coeficientes mayores ($\bar{x} = 1.22 \pm 0.09$) que los de Ataxia telangiectasia ($\bar{x} = 1.07 \pm 0.07$), y menores a los obtenidos con el grupo de testigos sanos ($\bar{x} = 1.41 \pm 0.16$) (Tabla No. 7, gráfica No. 4, tabla estadística No. 1).

TÍTULO DE ACTIVIDAD DEL FTS POR INHIBICIÓN CON AZATIOPRINA.

Se midió la actividad del FTS por inhibición con Azatioprina. Se determinó el número de LFR-E, previamente incubados con los sueros diluidos de los pacientes de los diferentes grupos estudiados, y el título de actividad del FTS se expresó como el logaritmo de base 2 del recíproco de la dilución más alta, en que aún se encontró inhibición de LFR-E mayor o igual al 50%. Se observó que la actividad del FTS de los pacientes con Síndrome de Down estuvo en un rango de 1 a 3, similar a la actividad del suero de los pacientes con Ataxia telangiectasia. La actividad obtenida se comparó con la que se obtuvo en el grupo de testigos sanos que fue de 3 a 5. La diferencia fue significativa, con una $p < 0.001$. También se comparó la actividad del FTS de los niños sanos de 3 meses a 3 años que estuvo en un rango de 3 a 5, con la actividad que se obtuvo en niños sanos de 10 a 15 años que fue de 3 a 4, y no se encontró diferencia significativa ($p > 0.05$). (Tabla 8-10, gráfica No. 5, Tabla estadística No. 2).

LINFOCITOS T CIRCULANTES.

Se determinó la subpoblación de linfocitos T (LFR-E) por milímetro cúbico, en los diferentes grupos de niños. En los niños sanos, se obtuvieron cifras promedio de 932.8 ± 64.5 LFR-E/mm³, en los niños con Síndrome de Down se observó un número de 713.8 ± 128.6 y en los niños con Ataxia telangiectasia el número de LFR-E/mm³ obtenido fue de 413 ± 83.9 . Estas cifras promedio se compararon entre sí y resultaron estadísticamente diferentes. El grupo de niños con Síndrome de Down tuvo cifras de LFR-E inferiores a las observadas en la sangre de los niños sanos, y superiores a las encontradas en los niños con Ataxia telangiectasia, con una $p < 0.001$ en ambos casos. El grupo de niños sanos de 3 meses a 3 años mostró cifras de 932.8 ± 64.5 LFR-E/mm³, y el de niños sanos de 10 a 15 años tuvo un promedio de 861.6 ± 111.2 ; en la comparación estadística entre estos dos grupos de edades diferentes, no se encontró diferencia significativa. ($p > 0.1$) (Tabla No. 11, gráfica No. 6, tabla estadística - No. 3).

TABLA No. 1

CARACTERISTICAS DE LOS NIÑOS SANOS, CON SINDROME DE DOWN Y CON ATAXIA
TELANGIECTASIA.

TESTIGOS SANOS	SEXO	EDAD años	PACIENTES ATAXIA T.	SEXO	EDAD años
1	M	10	1	M	15
2	M	11	2	M	13
3	F	12	3	M	11
4	F	13	4	F	13
5	M	12	5	M	10

TESTIGOS SANOS	SEXO	EDAD años- meses	PACIENTES S. DOWN	SEXO	EDAD años-meses
1	M	2	1	F	4
2	M	2	2	F	2
3	M	3	3	M	7
4	M	2	4	M	5
5	F	4	5	F	1
6	F	4	6	F	1
7	F	2 6	7	M	9
8	M	2	8	M	1
9	M	5	9	F	2
10	M	1	10	M	1
11	F	3	11	M	2
12	M	3	12	M	6

TABLA No. 2

EFECTO DE AZATIOPRINA SOBRE LFR-E DE RATONES CD-1 NORMALES.

No. de Muestra	LFR-E/mm ³					
	A Z A T I O P R I N A					
	0 ug/ml	100 ug/ml	300 ug/ml	500 ug/ml	750 ug/ml	1000 ug/ml
1	212.5	185.0	122.5	92.5	70.0	47.5
2	205.0	157.5	122.5	87.5	60.0	37.5
3	202.5	180.0	102.5	82.5	65.0	47.5
4	200.0	172.5	120.0	82.5	65.0	37.5
5	192.5	162.5	107.5	77.5	60.0	40.0
6	190.0	170.0	87.5	67.5	52.5	30.0
7	182.5	145.0	85.0	57.5	42.5	22.5
8	180.0	150.0	107.5	90.0	72.5	25.0
9	172.5	135.0	80.0	70.0	52.5	35.0
10	170.0	147.5	117.5	80.0	57.5	27.5
\bar{X}	190.8	160.5	105.3	78.8	59.8	35.0
\overline{DE}	14.3	16.3	16.1	10.9	9.0	8.7

TABLA No. 3

EFECTO DE AZATIOPRINA SOBRE LFR-E DE RATONES CD-1 TIMECTOMIZADOS

No. de Muestra	LFR-E/mm ³ A Z A T I O P R I N A					
	0 ug/ml	100 ug/ml	300 ug/ml	500 ug/ml	750 ug/ml	1000 ug/ml
1	165.0	142.5	130.0	112.5	80.0	50.0
2	155.0	150.0	132.5	100.0	72.5	40.0
3	145.0	132.5	115.0	80.0	62.5	42.5
4	140.0	132.5	115.0	95.0	57.5	32.5
5	135.0	130.0	107.5	87.5	52.5	37.5
6	127.5	115.0	95.0	82.5	60.0	30.0
7	117.5	110.0	97.5	85.0	57.5	35.0
8	112.5	102.5	92.5	77.5	50.0	22.5
9	110.0	107.5	90.0	75.0	47.5	20.0
10	105.0	97.5	80.0	70.0	40.0	22.5
\bar{X}	131.3	122.0	105.5	86.5	58.0	33.3
\overline{DE}	20.2	17.9	17.5	12.8	11.8	9.7

TABLA No. 4

COEFICIENTE DE INHIBICION DEL EFECTO DE AZATIOPRINA SOBRE LFR-E DE RATONES CD-1 NORMALES

No. de Muestra	% INHIBICION				
	A Z A T I O P R I N A				
	100 ug/ml	300 ug/ml	500 ug/ml	750 ug/ml	1000 ug/ml
1	12.9	42.4	56.5	67.1	77.7
2	23.2	40.2	57.3	70.7	81.7
3	11.1	49.4	59.3	67.9	76.5
4	13.8	40.0	58.8	67.5	81.3
5	15.6	44.2	59.7	68.8	79.2
6	10.5	53.9	64.5	72.4	84.2
7	20.5	53.4	68.5	76.7	87.7
8	16.7	40.3	50.0	59.7	86.1
9	21.7	53.6	59.4	69.6	79.7
10	13.2	30.9	52.9	66.2	83.8
\bar{X}	15.9	44.8	58.7	68.7	81.8
\overline{DE}	4.5	7.6	5.2	4.4	3.6

TABLA No. 5

COEFICIENTE DE INHIBICION DEL EFECTO DE AZATIOPRINA SOBRE LFR-E DE RATONES CD-1 TIMECTOMIZADOS

No. de Muestra	% INHIBICION				
	A Z A T I O P R I N A				
	100 ug/ml	300 ug/ml	500 ug/ml	750 ug/ml	1000 ug/ml
1	13.6	21.2	31.8	51.5	69.7
2	3.2	14.5	35.5	53.2	74.2
3	8.6	20.7	55.2	56.9	70.7
4	5.4	17.9	32.1	58.9	76.8
5	3.7	20.4	35.2	61.1	72.2
6	9.8	25.5	35.3	52.9	76.5
7	6.4	17.0	27.7	51.1	70.2
8	8.9	17.8	31.1	55.6	80.0
9	2.3	18.2	31.8	56.8	81.8
10	7.1	23.8	33.3	61.9	78.6
\bar{X}	6.9	19.7	34.9	56.0	75.1
\overline{DE}	3.5	3.3	7.5	3.8	4.3

TABLA No. 6

ACTIVIDAD DEL FTS SOBRE LFR-E DEL BAZO DE RATONES TIMECTOMIZADOS (RTx)

No. de Determinación	LFR-E RTx/mm ³	LFR-E RTx/mm ³ + Suero Niño Sano	LFR-E RTx/mm ³ + Suero S. Down
1	132.5	202.5	162.5
2	110.0	152.5	125.0
3	105.0	157.5	142.5
4	125.0	137.5	140.0
5	92.5	147.5	112.5
6	97.5	125.0	130.0
7	120.0	175.0	142.5
8	85.0	130.0	115.0
9	122.5	145.0	137.5
10	95.0	147.5	115.0
11	140.0	180.0	157.5
12	97.5	150.0	117.5
\bar{X}	110.2	154.2	133.1
\overline{DE}	17.5	22.1	16.8

No. de Determinación	LFR-E RTx/mm ³	LFR-E RTx/mm ³ + Suero Niño Sano	LFR-E RTx/mm ³ + Suero Ataxia t.
1	110.0	132.5	115.0
2	132.5	170.0	155.0
3	130.0	162.5	135.0
4	120.0	137.5	117.5
5	142.5	175.0	160.0
\bar{X}	127.0	155.5	136.5
\overline{DE}	12.4	19.3	20.7

TABLA No. 7

COEFICIENTES DE LA DIFERENCIA DE LOS LFR-E DE BAZO DE RATONES TIMECTOMIZADOS CON SUERO DE NIÑOS Y DE LOS LFR-E DE RATONES TIMECTOMIZADOS SIN SUERO.

No. de Control	*Ca Suero Niño Sano	No. de Paciente	*Ca Suero Niño S. Down
1	1.53	1	1.23
2	1.39	2	1.14
3	1.50	3	1.36
4	1.10	4	1.12
5	1.59	5	1.22
6	1.28	6	1.33
7	1.46	7	1.19
8	1.53	8	1.35
9	1.18	9	1.12
10	1.55	10	1.21
11	1.29	11	1.13
12	1.54	12	1.21
\bar{X}	1.41	\bar{X}	1.22
\overline{DE}	0.16	\overline{DE}	0.09

No. de Control	*Ca Suero Niño Sano	No. de Paciente	*Ca Suero niño Ataxia t.
1	1.20	1	1.05
2	1.28	2	1.17
3	1.25	3	1.04
4	1.15	4	0.98
5	1.23	5	1.12
\bar{X}	1.22	\bar{X}	1.07
\overline{DE}	0.05	\overline{DE}	0.07

*Ca= Coeficiente de actividad=LFR-E RTx + Suero/LFR-E RTx

TABLA No. 8

TITULO DE ACTIVIDAD DEL FTS DE SUERO DE NIÑOS SANOS, EN % DE INHIBICION CON AZATIOPRINA (Az) SOBRE
 LFR-E DE RATONES TIMECTOMIZADOS (RTx)

No. de Testigo SANO	LFR-E RTx	LFR-E RTx	LFR-E RTx + Suero Normal Diluido + Az						log ₂ DEL RECIPROCO DEL TITULO DE ACTIVIDAD 50% de Inhibición
	+ Az	+Suero Conc. + Az	% D E I N H I B I C I O N						
	% Inhibición	%Inhibición	log ₂ del Recíproco de la Dilución						
			1	2	3	4	5	6	
1	33.3	90.1	77.8	82.7	75.3	69.1	60.5 ^f	43.2	5
2	32.8	77.0	70.5	63.9	57.4	49.2	42.6	44.3	3
3	33.3	79.4	74.6	73.0	63.5	60.3	49.2	41.3	4
4	47.3	87.3	80.0	63.6	52.7	47.3	49.1	43.6	3
5	28.8	86.4	81.4	72.9	61.0	62.7	57.6	39.0	5
6	36.0	86.0	78.0	68.0	72.0	48.0	38.0	32.0	3
7	32.9	81.4	68.6	55.7	58.6	50.0	38.6	32.9	4
8	34.6	86.5	84.6	71.2	63.5	55.8	46.2	34.6	4
9	41.4	82.8	77.6	62.1	62.1	48.3	43.1	44.8	3
10	33.9	86.4	74.6	66.1	55.9	52.5	40.7	33.9	4
11	40.3	90.3	79.2	81.9	62.5	55.6	47.2	43.1	4
12	31.7	90.0	76.7	80.0	68.3	63.3	48.3	43.3	4

TABLA No. 9

TITULO DE ACTIVIDAD DEL FTS DEL SUERO DE NIÑOS CON SINDROME DE DOWN, EN % DE INHIBICION CON AZATIOPRINA
(Az) SOBRE LFR-E DE RATONES TIMECTOMIZADOS (RTX)

No. de Paciente S. DOWN	LFR-E RTX + Az % Inhibición	LFR-E RTX +Suero Conc. + Az % Inhibición	LFR-E RTX + Suero S. Down Diluido + Az % D E I N H I B I C I O N log ₂ del Recíproco de la Dilución						log ₂ DEL RECÍPROCO DEL TITULO DE ACTIVIDAD 50% de Inhibición
			1	2	3	4	5	6	
1	41.5	84.6	75.4	63.1	49.2	46.2	35.4	38.5	2
2	40.0	80.0	78.0	50.0	44.0	46.0	38.0	44.0	2
3	36.8	77.2	68.4	70.2	59.6	49.1	49.1	40.4	3
4	46.4	89.3	67.9	55.4	48.2	46.4	41.1	44.6	2
5	37.8	84.4	68.9	66.7	64.4	48.9	35.6	40.0	3
6	34.6	84.6	75.0	73.0	61.5	46.2	48.1	38.5	3
7	40.4	78.9	68.4	54.4	47.4	49.1	38.6	40.4	2
8	39.1	78.9	69.6	58.7	41.3	45.7	43.5	37.0	2
9	43.6	67.3	54.6	47.3	49.1	40.0	41.8	45.5	1
10	43.5	78.3	80.4	67.4	54.3	47.8	41.3	43.5	3
11	46.0	84.1	77.8	58.7	44.4	46.0	41.3	44.4	2
12	40.4	78.7	48.9	55.3	42.6	36.2	40.4	36.2	2

TABLA No. 10

TITULO DE ACTIVIDAD DEL FTS DEL SUERO DE NIÑOS SANOS Y CON ATAXIA TELANGIECTASIA, EN % DE INHIBICION CON AZATIOPRINA (Az) SOBRE LFR-E DE RATONES TIMECTOMIZADOS (RTx)

No de Testigo SANO	LFR-E RTx + Az	LFR-E RTx +Suero Conc. + Az	LFR-E RTx + Suero Normal Diluido + Az % D E I N H I B I C I O N log ₂ del Recíproco de la Dilución						log ₂ DEL RECÍPROCO DEL TITULO DE ACTIVIDAD 50% de Inhibición
	% Inhibición	% Inhibición	1	2	3	4	5	6	
1	35.8	83.0	81.1	64.2	58.5	47.2	39.6	45.3	3
2	33.8	82.4	76.5	75.0	63.2	69.1	48.5	44.1	4
3	36.9	78.5	73.8	76.9	70.8	53.8	43.1	41.5	4
4	38.2	80.0	83.6	67.3	61.8	49.1	41.8	45.5	3
5	35.7	84.3	90.0	77.1	70.0	57.1	45.7	48.6	4
No. de Paciente ATAXIA T.	LFR-E RTx + Az	LFR-E RTx +Suero Conc. + Az	LFR-E RTx + Suero Ataxia T. Diluido + Az % D E I N H I B I C I O N log ₂ del Recíproco de la Dilución						log ₂ DEL RECÍPROCO DE L TITULO DE ACTIVIDAD 50% de Inhibición
	%Inhibición	% Inhibición	1	2	3	4	5	6	
1	41.3	63.0	56.5	45.7	47.8	39.1	41.3	32.6	1
2	37.1	79.0	82.3	71.0	56.5	46.8	40.3	45.2	3
3	44.4	57.4	55.6	42.6	46.3	44.4	37.0	37.0	1
4	44.7	61.7	53.2	44.7	46.8	40.4	42.6	34.0	1
5	39.1	79.7	75.0	53.1	45.3	48.4	37.5	42.2	2

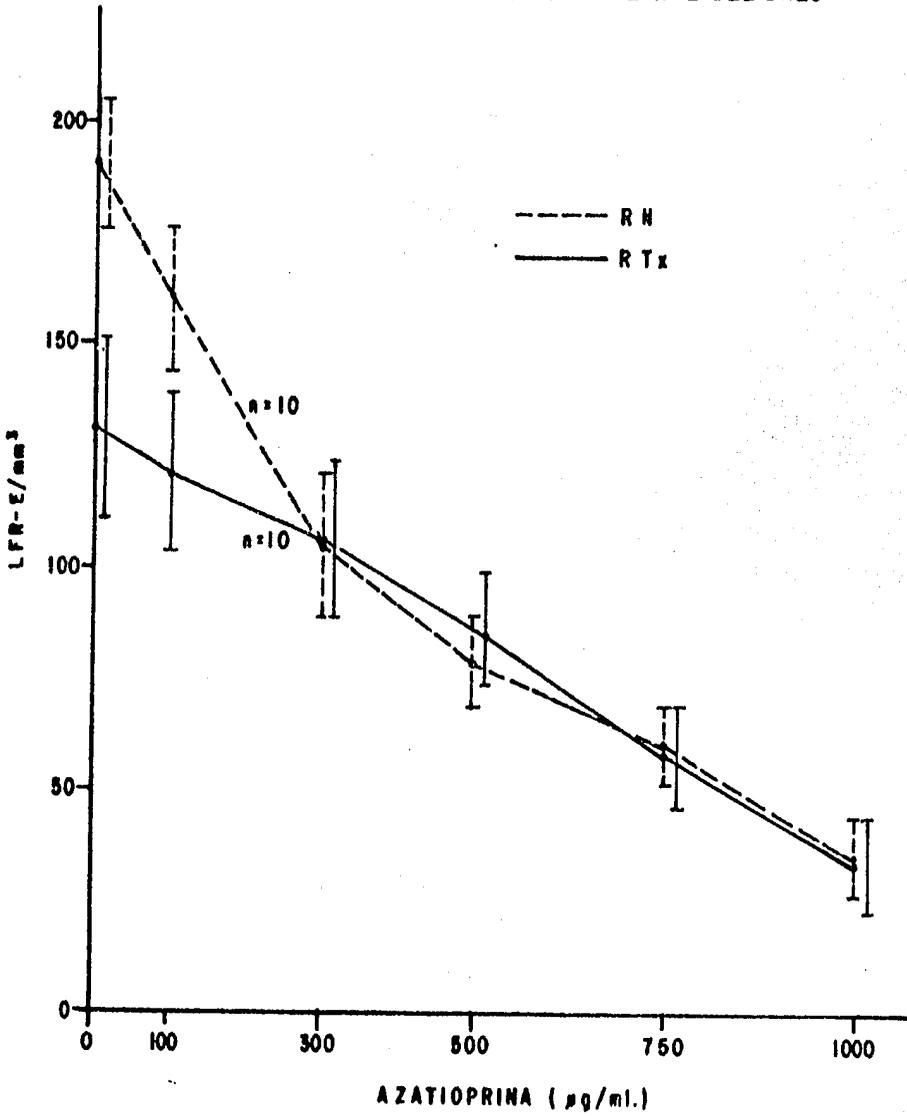
TABLA No. 11

NUMERO DE LFR-E DE SANGRE PERIFERICA DE NIÑOS SANOS, CON SINDROME DE DOWN
Y CON ATAXIA TELANGIECTASIA

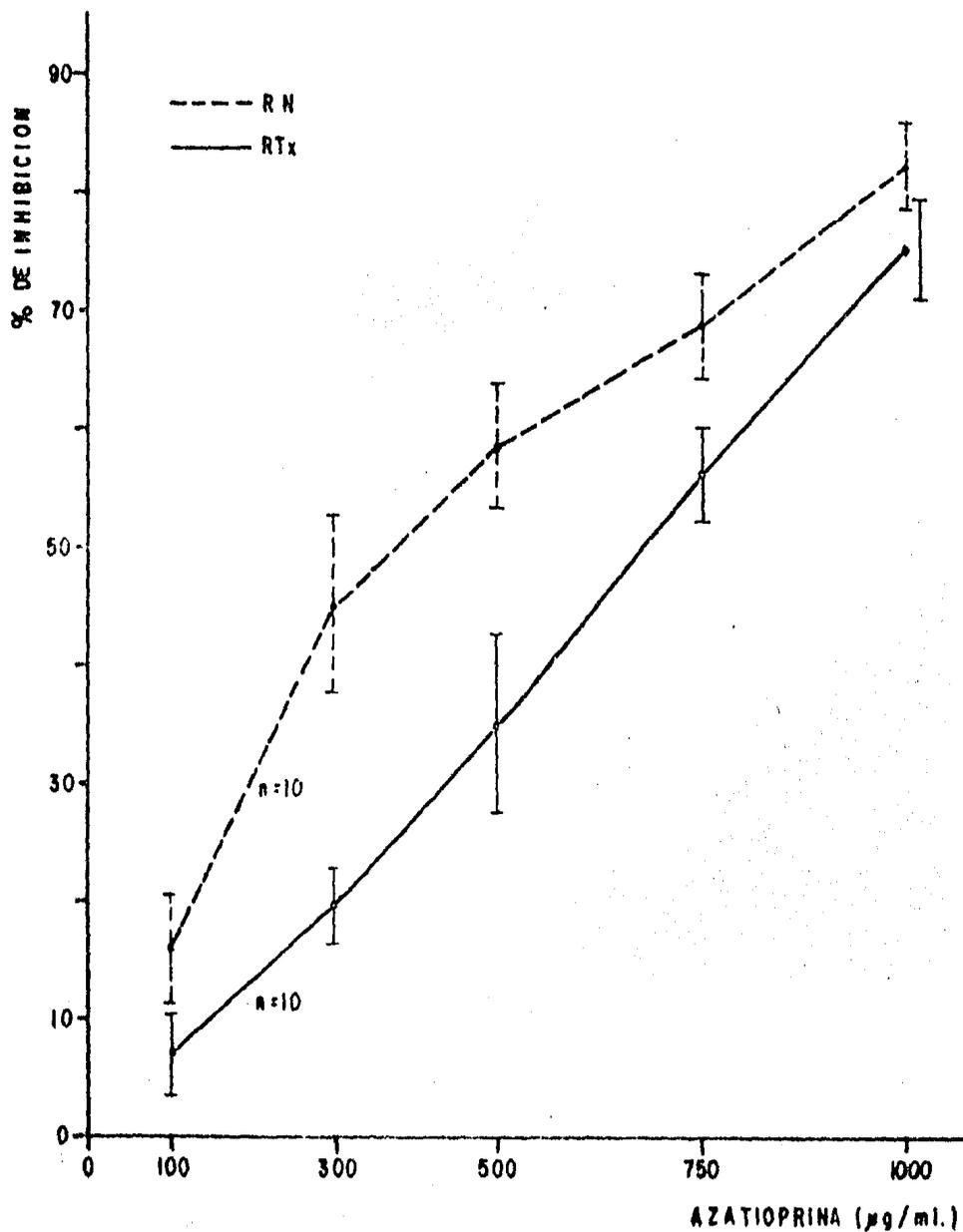
Testigo SANO Número	LFR-E/mm ³	Paciente S. DOWN Número	LFR-E/mm ³
1	996	1	856
2	865	2	646
3	968	3	863
4	800	4	773
5	1004	5	715
6	908	6	760
7	866	7	850
8	965	8	753
9	898	9	405
10	988	10	628
11	905	11	650
12	1030	12	666
\bar{X}	932.8	\bar{X}	713.8
\overline{DE}	64.5	\overline{DE}	128.6

Testigo SANO Número	LFR-E/mm ³	Paciente ATAXIA T. Número	LFR-E/mm ³
1	760	1	415
2	840	2	440
3	755	3	455
4	998	4	270
5	955	5	485
\bar{X}	861.6	\bar{X}	413.0
\overline{DE}	111.2	\overline{DE}	83.9

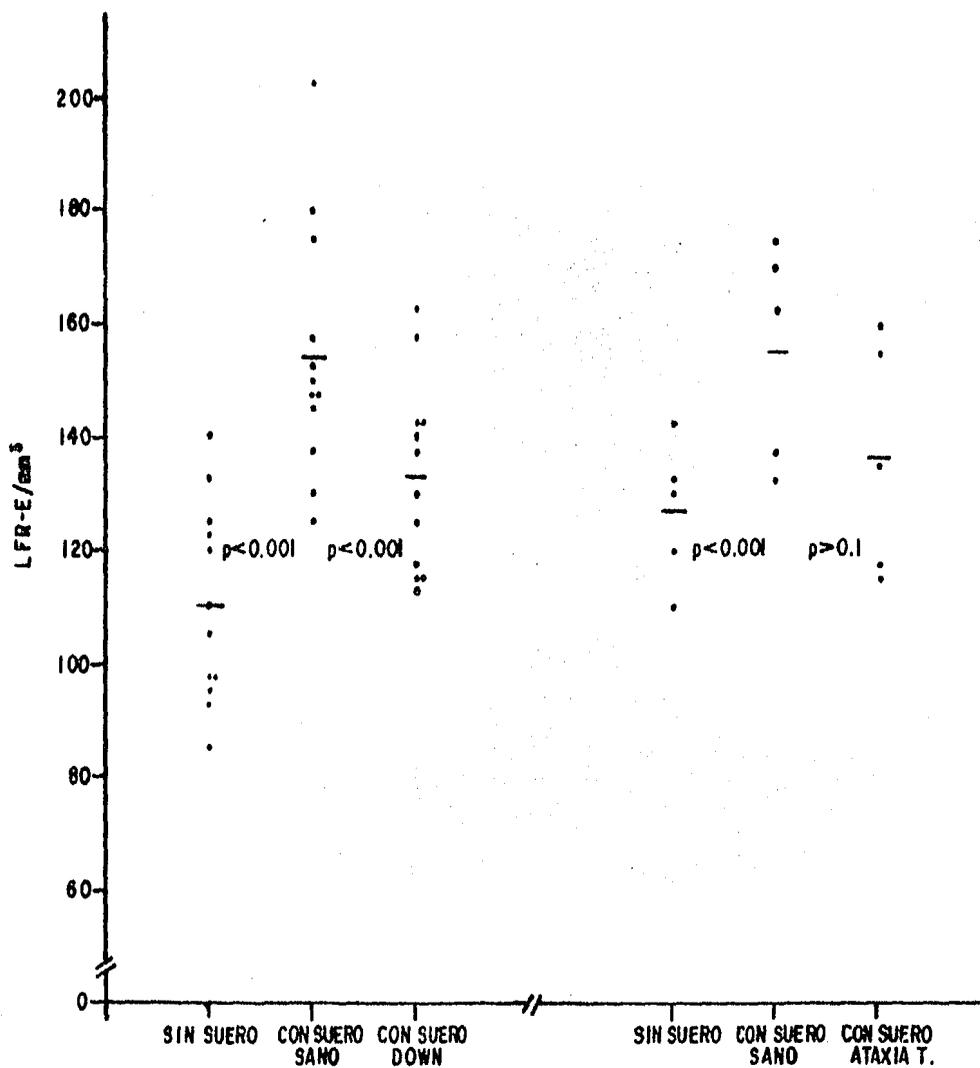
GRAFICA No.1
EFECTO DE LA AZATIOPRINA SOBRE LFR-E DEL BAZO



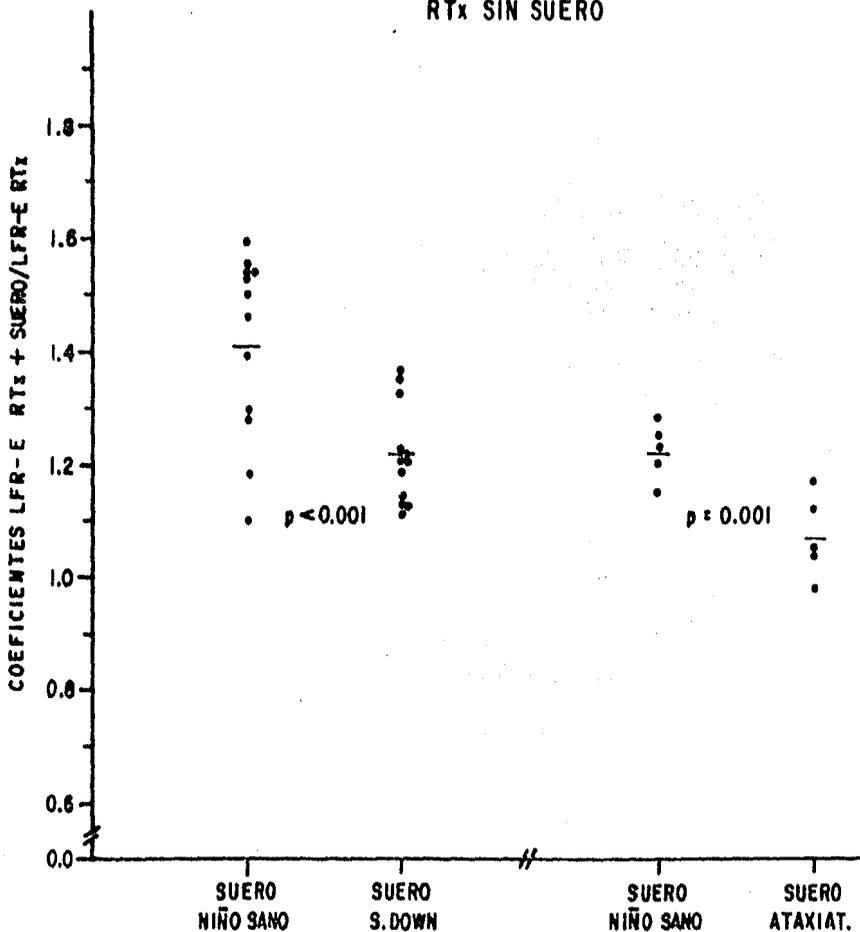
G R Á F I C A No.2
COEFICIENTE DE INHIBICION DE Az SOBRE LFR-E DEL BAZO



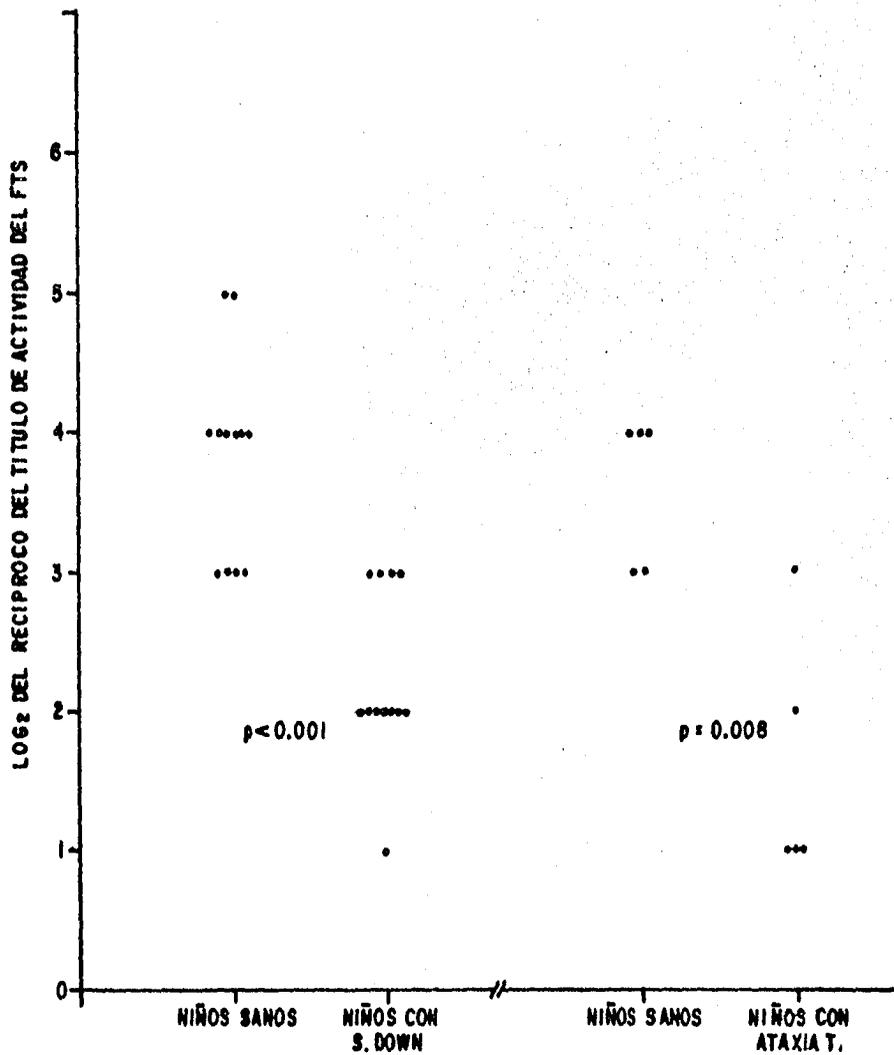
GRAFICA No. 3
 ACTIVIDAD DEL FTS DEL SUERO DE NINOS SOBRE LFR-E DEL BAZO DE RTx



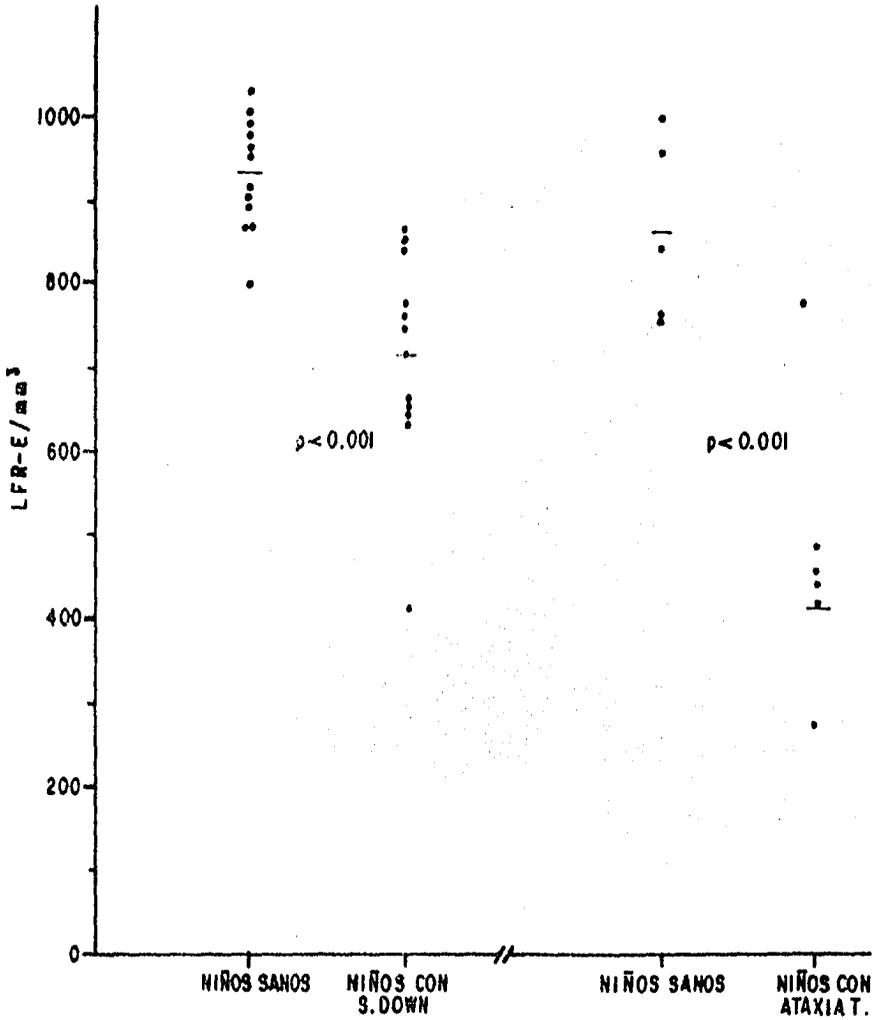
GRAFICA No.4
 COEFICIENTES DE LFR-E RTx + SUERO DE NIÑOS Y LFR-E
 RTx SIN SUERO



GRAFICA No.5
TITULO DE ACTIVIDAD DEL FTS



GRAFICA No.6-LINFOCITOS T (LFR-E/mm³) DE SANGRE PERIFERICA



FUENTE DE VARIACION

LF_R-E de Bazo de Ratones Normales y Timectomizados

GRUPO	n	gl	¹ t calculada	¹ t tabulada	p	CONCLUSION
Ratones normales cepa CD-1	10	9	9.5	4.781	<0.001	Significativa
Ratones Tx cepa CD-1	10					

FUENTE DE VARIACION

LF_R-E de Bazo de Ratones Timectomizados sin suero y con suero de Niños

GRUPO	n	gl	¹ t calculada	¹ t tabulada	p	CONCLUSION
LF _R -E RTx sin suero	12	11	9.41	4.431	<0.001	Significativa
LF _R -E RTx + Suero Control Sano	12					
LF _R -E RTx sin Suero	12	11	10.324	4.437	<0.001	Significativa
LF _R -E RTx + Suero Niño con S. Down	12					
LF _R -E RTx sin Suero	5	4	2.08	2.132	>0.1	No significativa
LF _R -E RTx + Suero Niño con Ataxia t.	5					

¹t de Student para datos Correlacionados

FUENTE DE VARIACION

Coefficientes LF_R-E RTx con suero / LF_R-E RTx sin suero

GRUPO	n	gl	² t calculada	² t tabulada	p	CONCLUSION
LF _R -E RTx suero control/LF _R -E RTx	12	22	48.74	3.792	<0.001	Significativa
LF _R -E RTx suero S. Down/LF _R -E RTx	12					
LF _R -E RTx suero control/LF _R -E RTx	5	8	5.041	5.041	0.001	Significativa
LF _R -E RTx suero Ataxia t./LF _R -E RTx	5					
LF _R -E RTx suero S. Down/LF _R -E RTx	12	15	2.131	2.131	<0.05	Significativa
LF _R -E RTx suero Ataxia t./LF _R -E RTx	5					

²t de Student para datos no Correlacionados

TABLA ESTADISTICA No. 2

FUENTE DE VARIACION

\log_2 del Recíproco del Título de Actividad del FTS

GRUPO	n	gl	3H calculada	3H Tabulada	p	CONCLUSION
Controles Sanos	17					
Pacientes S. Down	12	2	20.6	13.815	<0.001	Significativa
Pacientes Ataxia t.	5					

3H de Kruskal-Wallis

FUENTE DE VARIACION

\log_2 del Recíproco del Título de Actividad del FTS

GRUPO	n	4U calculada	4U tabulada	p	CONCLUSION
Controles Sanos	12				
Niños S. de Down	12	8	20	<0.001	Significativa
Controles Sanos	5				
Niños con Ataxia t.	5	1	1	0.008	Significativa
Niños con Ataxia t.	5				
Niños con S. de Down	12	16	13	> 0.05	No Significativa
Niños Sanos 3 meses-3 años	12				
Niños Sanos 10-15 años	5	25	13	> 0.05	No Significativa

4U de Mann-Whitney

TABLA ESTADISTICA No. 3

FUENTE DE VARIACION

Rosetas T (LFR-E/mm³) de Sangre Periférica

GRUPO	n	gl	² t calculada	² t tabulada	p	CONCLUSION
Controles Sanos	12					
Niños con S. de Down	12	22	5.190	3.792	< 0.001	Significativa
Controles Sanos	5					
Niños con Ataxia t.	5	8	7.201	5.041	< 0.001	Significativa
Niños con S. de Down	12					
Niños con Ataxia t.	5	15	4.775	4.073	< 0.001	Significativa
Niños Sanos 3 meses-3 años	12					
Niños Sanos 10-15 años	5	15	1.616	1.753	> 0.1	No Significativa

²t de Student para datos No correlacionados

CAPITULO VI

DISCUSION

En los últimos años se ha observado un gran interés por la glándula tímica y sus extractos, a partir de los experimentos de Osoba y Miller (1,48,49) que describen las consecuencias de la timectomía en ratones recién nacidos, y demuestran finalmente el deterioro de la respuesta inmunocelular. Con el implante de timo embrionario o neonatal dentro de cámaras milipore de difusión, estos ratones timectomizados al nacimiento, recuperaron la capacidad de rechazar injertos de piel alogénicos y de producir anticuerpos contra eritrocitos de carnero, previniéndose además la pérdida de peso. Estos experimentos sugirieron la presencia de un factor humoral secretado por el timo, capaz de proporcionar a las células linfoides competencia inmunológica.

Se ha descrito un número importante de hormonas tímicas, entre las que se incluyen la timosina de Goldstein, el factor humoral tímico, la timopoyetina y el factor tímico sérico. Las hormonas tímicas son producidas por el epitelio tímico y se ha sugerido que su actividad biológica más importante, es la inducción de células T a varios estadios de maduración. Esta acción se cree que está mediada por ácidos nucleicos cíclicos, pues se ha probado que el FTS incrementa la producción de prostaglandinas y la síntesis de AMPc en linfocitos (3,23). El AMPc tiene un efecto parecido al FTS, ya que induce sensibilidad al suero anti-teta (θ) y a la azatioprina en células linfoides teta (θ) negativas (21).

La demostración de una hormona tímica en el suero de animales experimentales y en el suero humano (9,10,12,13) que inducía la expresión del — antígeno θ en células del bazo de ratones timectomizados (5-8) y la demostración de que estas células θ positivas eran sensibles a Azatioprina (7-9), permitió la medición de la actividad del factor tímico sérico.

En nuestro estudio pudimos confirmar el efecto de la timectomía en ratones adultos, al observar una disminución de células de bazo sensibles a Azatioprina y formadoras de rosetas espontáneas con eritrocitos de carnero. Estos resultados sugieren la ausencia de mediadores tímicos en los ratones timectomizados, que induzcan la aparición del antígeno θ en células timodependientes. La incubación de estas células de bazo de ratones timectomizados con suero que contenía FTS, nos permitió medir la restauración de LFR-E sensibles a azatioprina.

Se han realizado diversos estudios inmunológicos en pacientes con Síndrome de Down; en algunos, se ha evaluado el número de linfocitos circulantes y la subpoblación celular, reportándose resultados contradictorios. Se ha observado que en los pacientes con SD de instituciones Down, se ha encontrado disminución de la subpoblación de linfocitos T (36). En otros estudios, las proporciones de linfocitos T y B se han encontrado prácticamente normales en niños trisómicos que no están en instituciones (37). La razón de esta discrepancia en la actualidad no está totalmente aclarada.

En este estudio, se encontró en el grupo de pacientes con Síndrome de Down con trisomía regular, disminuída la subpoblación de linfocitos T circulantes, que es congruente con algunos estudios de grupos de pacientes con -

SD menores de 10 años (32). Es posible que las diferencias estén dadas por falta de homogeneidad en los grupos de estudio, en lo que respecta a edad y alteración citogenética. Por otra parte, se determinó que los niveles de linfocitos T en niños con SD no se encuentran tan disminuidos como en los niños con Ataxia telangiectasia. Creemos que estos resultados no están afectados por la diferencia de edades entre estos dos grupos de pacientes estudiados, ya que los niños sanos de ambos grupos de edades no muestran diferencias significativas en sus niveles de linfocitos T; aunque debe ser considerado que el grupo de niños estudiados es muy reducido.

Se ha demostrado que los efectos biológicos del FTS incluyen la inducción de marcadores de linfocitos derivados del timo sobre precursores de células T, como el antígeno θ y el aloantígeno Ly-1,2,3+ (3,5-8). Otro efecto del FTS es normalizar el elevado nivel de células formadoras de rosetas autólogas en ratones adultos timectomizados (3,54). Después del tratamiento in vivo con FTS, se ha obtenido restauración de las respuestas de células de bazo a PHA y con A en ratones adultos timectomizados (55). También el tratamiento con FTS, aumenta la generación de células T citotóxicas en ratones adultos timectomizados (56), que muestran una producción disminuida de células citotóxicas al ser inmunizados con células alogénicas. Por otra parte, el tratamiento temprano in vivo con FTS mejora la supresión mediada por células T, como se ha visto con la disminución de la producción de anticuerpos contra antígenos timoindependientes como la polivinilpirrolidona en ratones NZB (57). Además, la administración --

del FTS natural en ratones normales, retarda el rechazo del aloinjerto-- de piel, por la disminución en la producción in vivo de linfocitos T citotóxicos aloreactivos en el bazo (58).

Otro efecto biológico del FTS es incrementar el número de linfocitos T en sangre periférica, en pacientes con inmunodeficiencia de células T (40,41) y mejora in vivo la inmunidad mediada por células timodependientes (41,42). El FTS modifica en particular la diferenciación celular, induciendo un incremento de linfocitos formadores de rosetas, y en forma secundaria, incrementa la producción de algunos mediadores de la inmunidad (35). En este estudio, los resultados muestran que los pacientes con SD con trisomía regular, tienen una menor actividad de FTS en el suero, que es similar a la encontrada en pacientes con Ataxia telangiectasia y se correlaciona con una menor subpoblación de linfocitos T circulantes. Aunque los pacientes con Ataxia telangiectasia son de mayor edad (10-15 años) que los niños con SD (3 meses-3 años), y a los 10-15 años el sistema inmunológico ya se encuentra el estado maduro, al comparar los niveles de FTS en niños sanos de ambos grupos de edades estudiadas, no encontramos diferencia estadística significativa. Por tanto, podemos sugerir que en este pequeño grupo de niños estudiados, los niños con SD se comportan en forma similar a los niños con Ataxia telangiectasia, en cuanto a sus niveles de factor tímico circulante. Los resultados obtenidos de que los pacientes con SD tienen menor actividad sérica del FTS, son congruentes con los reportados en la literatura (34). Esta alteración puede explicarse por una disminución en la síntesis del FTS por las células epiteliales del timo, o bien, poca actividad del FTS, o por la presencia de inhibidores séricos del FTS. De estas observaciones ---

encontradas en pacientes con trisomía regular, se confirma un defecto -- inmunológico en la función del timo. La deficiencia de linfocitos T encontrada en niños con SD, sugiere que estos niños tienen una mayor población de células indiferenciadas, debido a la menor actividad biológica del FTS. Esta poca actividad del FTS en inducir maduración y diferenciación de linfocitos T, afectaría finalmente la respuesta inmune celular.

De los conocimientos que se han adquirido sobre el Factor Tímico Sérico, se ha sugerido que las aplicaciones clínicas potenciales de la administración del FTS son (3) :

- En síndromes de inmunodeficiencia: Síndrome Di George, ataxia telangiectasia, deficiencia de IgA con bajos valores de células T.
- En infecciones crónicas asociadas con deficiencia de células T: lepra - lepromatosa, candidiasis crónica mucocutánea o tuberculosis resistente a antibióticos.
- En infecciones agudas, esencialmente virales (particularmente las que involucran células T como Herpes). Los pacientes con inmunosupresión, ya sea en una base terapéutica (recipientes con trasplante de órgano, pacientes con leucemias que reciben quimioterapia) o espontáneamente (enfermedad de Hodgkin, mieloma), pudieran beneficiarse con el FTS, cuando están seriamente infectados.
- En injertos de órganos (en vista del retraso del rechazo del aloinjerto de piel en ratones normales).

- En ciertos tumores
- En enfermedades autoinmunes

Y de este estudio se sugiere la utilidad de su administración, en niños con Síndrome de Down.

CAPITULO VII

CONCLUSIONES:

- 1.- La timectomía en los ratones hembras de cepa CD-1 de 6 semanas de --- edad, induce una depresión de los linfocitos formadores de rosetas-E- en el bazo.
- 2.- Los LFR-E del bazo de ratones normales son más sensibles al efecto -- inhibitorio de la Azatioprina, que los LFR-E del bazo de ratones timec tomizados.
- 3.- Los ~~sueros~~ de los niños con Síndrome de Down, tienen menor actividad de Factor Tímico que los sueros de niños sanos; esta actividad es semejante a la obtenida en el suero de niños con Ataxia telangiectasia.
- 4.- El número de linfocitos T de sangre periférica, es menor en los niños- con Síndrome de Down que en los niños sanos. Sin embargo, los niveles- de linfocitos T en niños con Síndrome de Down, son más altos que los - encontrados en niños con Ataxia telangiectasia.
- 5.- Los resultados obtenidos indican que los niños con Síndrome de Down -- presentan una inmunodeficiencia parcial.

LISTA DE ABREVIATURAS

ng	nanogramos
ul	microlitros
um	micrómetros
mm ³	milímetro cúbico
ug	microgramos
mg	miligramos
ml	mililitros
g	gramos
kg	kilogramos
U.I.	Unidades Internacionales
LFR-E	Linfocitos formadores de rosetas espontáneas
Az	Azatioprina
FTS	Factor Tímico Sérico
RN	Ratones Normales
RTx	Ratones Timectomizados
Ci	Coefficiente de inhibición
Ca	Coefficiente de actividad
EC	Eritrocitos de camero
UF	Suero ultrafiltrado
SD	Síndrome de Down
PHA	Fitoheماغlutinina
Con A	Concanavalina A

PMN	polimorfonucleares
\overline{DE}	desviación estándar
θ	teta

F I G U R A S

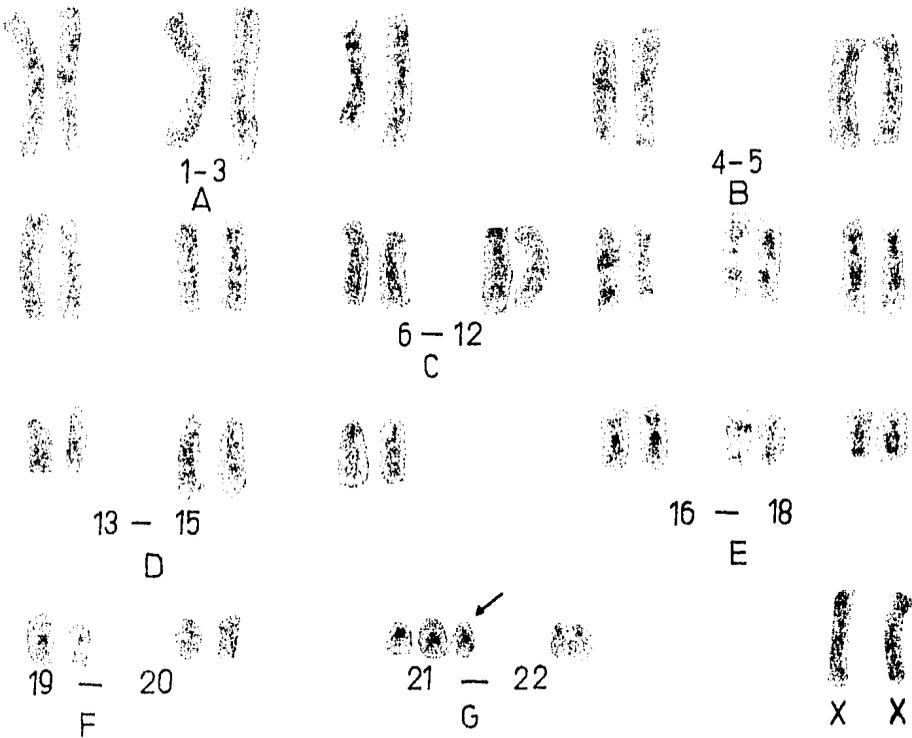


Fig. No. 1. Cariotipo de una Niña con Síndrome de Down, Trisomía Regular (47,XX,+21) (Cortesía de Roberto Guevara, Depto. de Genética, Hosp. Pediatría, C.M.N.).



Fig. No. 2. Tinectomía de un Ratón Hembra, cepa CD-1

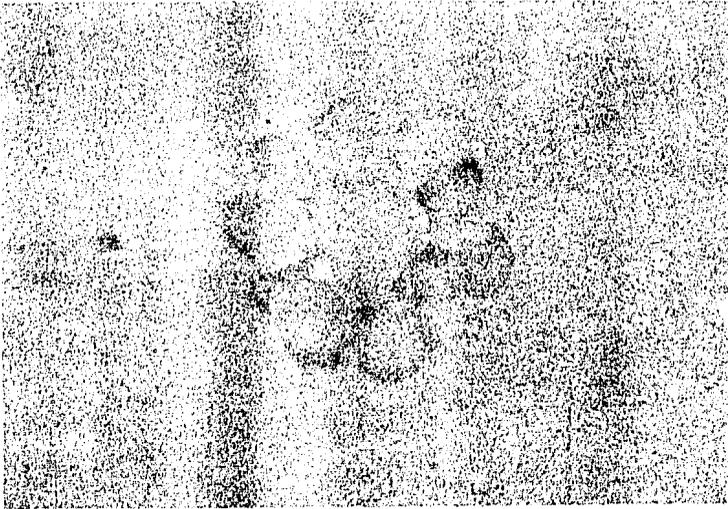


Fig. No. 3. Roseta-E de Sangre Periférica

CAPITULO VIII

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Osoba, D; Miller, J.F.A.P. Evidence for a Humoral Thymus Factor responsible for the Maturation of Immunological Faculty. *Nature* (1963), 199:653-54.
- 2.- Stutman, O.; Yunis, E.J. Studies on Thymus Function. *J. Exp. Med.* (1970), 132:583-611.
- 3.- Bach, J.F.; Carnaud, C. Thymic Factors. *Progress in Allergy.* (1971), 21:342-408.
- 4.- Goldstein, A.L.; Guha, A.; Zatz, M.M. Purification and Biological Activity of Thymosin, a Hormone of the Thymus Gland. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* (1972), 69:1800-3.
- 5.- Bach, J.F.; Dardenne, M. Antigen Recognition by T Lymphocytes. I. *Cellular Immunol.* (1972), 3:1-10.
- 6.- Bach, J.F.; Dardenne, M. Antigen Recognition by T Lymphocytes. II. *Cell. Immunol.* (1972), 3:11-21.
- 7.- Dardenne, M.; Bach, J.F. Studies on Thymus Products. I. *Immunol.* (1973), 25:343-352.
- 8.- Bach, J.F.; Dardenne, M. Antigen Recognition by T Lymphocytes. III. *Cell. Immunol.* (1973), 6:394-406.
- 9.- Bach, J.F.; Dardenne, M. Studies on Thymus Products. II. *Immunol.* (1973), 25:353-66.

- 10.- Bach, J.F.; Papiernik, M.; Dardenne, M. Evidence for a Serum Factor - Secreted by The Human Thymus. *The Lancet* (1972), 2: 1056-58.
- 11.- Dardenne, M.; Pléau, J.M.; Blouquit, J.Y. Characterization of facteur thymique sérique (FTS) in the thymus. II. *Clin. exp. Immunol.* (1980), 42:477-82.
- 12.- Bach, J.F.; Dardenne, M.; Pléau, J.M. Biochemical Characterization of a Serum Thymic Factor. *Nature* (1977), 266:55-56.
- 13.- Dardenne, M.; Pléau, J.M.; Khoa, N. Structural Study of Circulating - Thymic Factor: A Peptide Isolated from Pig Serum. I. Isolation and - Purification. *J. Biol. Chem.* (1977), 252:8040-44.
- 14.- Pléau, J.M.; Dardenne, M.; Blouquit, Y. Structural Study of Circula-- ting Thymic Factor. II. Amino Acid Sequence. *J. Biol. Chem.* (1977), - 252:8045-47.
- 15.- Dardenne, M.; Papiernik, M.; Stutman, O. Studies on Thymus Products. - III. *Immunol.* (1974), 27:299-305.
- 16.- Jambon, B.; Montagne, P. Immunohistologic Localization of FTS in Human - Thymic Epithelium. *J. Immunol.* (1981), 127:2055-59.
- 17.- Monier, J.C.; Dardenne, M.; Pléau, J.M. Characterization of facteur -- thymique sérique (FTS) in the Thymus. I. *Clin. exp. Immunol.* (1980), - 42:470-76.
- 18.- Savino, W.; Dardenne, M. Thymic Hormone-Containing Cells. Characteri-- zation and Localization of Serum Thymic Factor in Young Mouse Thymus - studied by Monoclonal Antibodies. *J. Exp. Med.* (1982), 156:628-33.

- 19.- Dardenne, M; Bach, J.F. Ontogeny of Thymus Factor Secretion. *Ann. - Immunol. (Inst. Pasteur)* (1976), 127 C:963-66.
- 20.- Savino, W.; Dardenne, M.; Bach, J.F. Thymic Hormone-Containing --- Cells. II. *Clin. exp. Immunol.* (1983), 52:1-6.
- 21.- Bach, M.A.; Bach, J.F. Studies on Thymus Products. VI. *Eur. J. Immunol.* (1973), 3:778-783.
- 22.- Niaudet, P.; Beaurain, G. Differences in effect of Isoproterenol - Stimulation on Levels of Cyclic AMP in Human B and T Lymphocytes.-- *Eur. J. Immunol.* (1976), 6:834-36.
- 23.- Gualde, N.; Rigaud, M. Stimulation of Prostaglandin Synthesis by --- the Serum Factor (FIS). *Cell. Immunol.* (1982), 70:362-66.
- 24.- Hill, G.S.; Hinglais, N; Tron, F. Systemic Lupus Erythematosus. --- *Amer. J. Med.* (1978), 64:61-79.
- 25.- Incefy, G.S.; Dardenne, M.; Pahwa, S; Grimes, E. Thymic activity in Severe Combined Immunodeficiency Diseases. *Proc. Natl. Acad. Sci. -* (1977), 74:1250-53.
- 26.- Franceschi, C.; Licastro, F.; Chiricolo, M. Deficiency of Autolo--- gous Mixed Lymphocyte Reactions and Serum Thymic Factor Level in --- Down's Syndrome. *J. Immunol.* (1981), 126:2161-64.
- 27.- Grouchy, J.; Turleau, C. Atlas de las Enfermedades Cromosómicas. --- Edit. Marín, S.A. (1978), p 234-45.
- 28.- Epstein, L.B.; Epstein, C.J. T-Lymphocyte Function and Sensitivity- to Interferon in Trisomy 21. *Cell. Immunol.* (1980), 51:303-18.

- 29.- Gosseye, S.; Nezelof, C.T system Immunodeficiencies in infancy and - childhood. *Pathol. Res. Pract.* (1981), 171:142-58.
- 30.- Kowielowa, Z; Pietrzyk, J; Mytor, B. "E" and "EAC" rosette test of - peripheral blood in Children with Down's Syndrome. *Pediat. Pol.* --- (1980), 55:609-15.
- 31.- Wisniewsky, K.; Cobill, J.M.; Wilcos, C.B. T Lymphocytes in Patients with Down's Syndrome. *Biol. Psychiatry.* (1979), 14:463-71.
- 32.- Hann, H.W.; Deacon, J.C.; London, W.T. Lymphocyte Surface Markers --- and Serum Immunoglobulins in persons with Down's Syndrome. *Am. J. --- Ment. Defic.* (1979), 84: 245-51.
- 33.- Cederqvist, L.L.; Spigelman, S.; Litwin, S.D. Decreased cord blood - IgM and IgA in Trisomy 21. *Am. J. Reprod. Immunol. (USA)* (1981), --- 1:62-4.
- 34.- Spina, C.A.; Smith, D.; Korn, E. Altered Cellular Immune Functions in Patients with Down's Syndrome. *Am. J. Dis. Child.* (1981), 135:251-55.
- 35.- Handzel, Z.T.; Dolfin, Z.; Levin, S. Effect of Thymic Humoral Fac--- tor on Cellular Immune Functions of Normal Children and of Pedia---- tric Patients with Ataxia Telangiectasia and Down's Syndrome. *Pediat. Res.* (1979), 13:803-6.
- 36.- Nishida, Y.; Akaoka, I.; Suzuki, T. Serum Lymphocytotoxins and Lym---

- phocyte responses to Mitogens of Down syndrome person. *Am. J. Ment. Defic.* (1981), 85:596-600.
- 37.- Fekete, G.; Kulcsar, G.; Dan, P. Immunological and Virological Investigations in Down's Syndrome. *Eur. J. Pediatr.* (1982), 138:59-62.
- 38.- Watts, R.W.; Perera, Y.S.; Allsop, J. Immunological and purine enzyme-studies on hyperuricaemic and normouricaemic patients with Down's Syndrome. *Clin. Exp. Immunol.* (1979), 36:355-63.
- 39.- Bjorksten, B.; Back, O.; Gustavson, K.H. Zinc and Immune Function in Down's Syndrome. *Acta. Pediatr. Scand.* (1980), 69:183-87.
- 40.- Nurmi, T.; Huttunen, Kaisa; Lassila, O. Natural Killer Cell Function-- in Trisomy-21 (Down's Syndrome). *Clin. Exp. Immunol.* (1982), 47:735-41.
- 41.- Bach, J.F.; Dardenne, M. Thymus dependency of Rosette Forming Cells. Evidence for a circulating Thymic Hormone. *Transplant. Proc.* (1972), 4:345-49.
- 42.- Bach, M.A. Sera from Both Normal and Thymectomized Animals Produce --- Elevations of Cyclic AMP in Thymocytes. *Cell. Immunol.* (1977), 33:224-228.
- 43.- Chandra, R.K.; Heresi, G. Serum Thymic Factor Activity in Deficiencies- of Calories, Zinc, Vitamin A and Pyridoxines. *Clin. exp. Immunol.* (1980), 42:332-335.
- 44.- Jondal, M.; Holm, G.; Wigzell, H. Surface Markers on Human T and B Lymphocytes. *J. Exp. Med.* (1972), 136:207-15.

- 45.- Rose, N. R.; Friedman, H. El Laboratorio en Inmunología Clínica. 2a.-- Ed. (1984), capítulo 27:p 277.
- 46.- Siegel, Sidney. Estadística no paramétrica. Edit. Trillas. Méx. 8a. -- reimp. (1983), 5:99-108.
- 47.- Downie, N.M. Métodos Estadísticos Aplicados. Edit. Harper & Row. (1981), capítulo 12: p182-203 y capítulo 18: p281-295.
- 48.- Miller, J.F.A.P. Immunological Function of The Thymus. Lancet (1961),-- 2:748-49.
- 49.- Osoba, D.; Miller, J.F.A.P. The Lymphoid Tissues and Immune Responses- of Neonatally Thymectomized Mice Bearing Thymus Tissue in Millipore -- Diffusion Chambers. J. exp. Med. (1964), 119:177-94.
- 50.- Burgio, G.R.; Ugazio, A.; Nespoli, L.; Marcioni, A.F. Derangements of - Immunoglobulin Levels, Phytohemagglutinin Responsiveness and T and B -- cell Markers in Down's Syndrome at Different Ages. Eur. J. Immunol.-- (1975), 5:600-603.
- 51.- Whittingham, S.; Sharma, D.L.B.; Pitt, D.B. Stress Deficiency of the - T-Lymphocyte System Exemplified by Down's Syndrome. Lancet (1977), --- 1:163-166.
- 52.- Burgio, G.R.; Ugazio, A.G.; Nespoli, L. Peripheral Blood "Rosette for- ming Lymphocytes" in Down's Syndrome. Experientia (1974), 30:818.
- 53.- Lenin, S.; Nir, E; Moligner, B.M. T System Deficiency in Down's Syndro_ me. Pediatrics (1975), 56: 123-125.
- 54.- Dardenne, M.; Monier, J.C.; Biozzi, G. Studies on Thymus Products. --- Clin. exp. Immunol. (1974), 17:339-44.

- 55.- Bash, J.A.; Dardenne, M.; Bach, J.F. In Vitro Responses of Rat Lymphocytes Following Adult Thymectomy, III. Prevention by Thymic Factor or --- Increased Suppressor Activity in the Spleen. *Cell. Immunol.* (1976), 26: 308-12.
- 56.- Bach, M.A. Lymphocyte-Mediated Cytotoxicity: Effects of Ageing, Adult - Thymectomy and Thymic Factor. *J. Immunol.* (1977), 119:641-47.
- 57.- Bach, M.A.; Niaudet, P. Thymic Function in NZB Mice. *J. Immunol.* (1976), 117:760-64.
- 58.- Kaiserlian, D.; Dardenne, M. Studies on the Mechanisms of the Inhibitory Effects of Serum Thymic Factor on Murine Allograft Immunity. *Cell. Immunol.* (1982), 66:360-71.
- 59.- Wara, D.W.; Goldstein, A.L.; Doyle, N.E. Thymosin Activity in Patients with Cellular Immunodeficiencies. *N. Engl. J. Med.* (1975), 292:60.
- 60.- Aiuti, F.; Schirmacher, V.; Ammirati, P.; Fiorilli, M. Effect of Thymus Factor on Human Precursor T Lymphocytes. *Clin. exp. Immunol.* (1975), 20:499-503.
- 61.- Zaizov, R.; Vogel, R.; Cohen, I.; Varsano, I. Thymic Hormone (THF) Therapy in Immunosuppressed Children with Lymphoproliferative Neoplasia and Generalized Varicella. *Biomedicine* (1977), 27:105-8.