



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

“CUAUTITLAN”

**AISLAMIENTO, PURIFICACION Y ACTIVIDAD BIOLOGICA DE
LA TIMOSINA OBTENIDA DEL EXTRACTO TOTAL
DE TIMO BOVINO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A

YOLANDA CISNEROS BARGENAS

DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. CARLOS E. SALAS CONTRERAS

CUAUTITLAN IZCALLI, MEX.

1982



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

INDICE.

| | Pag. |
|--|------|
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | I |
| LISTA DE TABLAS Y GRAFICAS..... | 2 |
| I.- RESUMEN..... | 4 |
| II.- INTRODUCCION..... | 5 |
| Antecedentes..... | 5 |
| Argumentos que indirectamente sugieren una función endocrina del timo..... | 7 |
| Injertos de timo encapsulado en cámaras Millipore | 8 |
| Experimentos durante el embarazo..... | 10 |
| Otras evidencias indirectas de la función endocri- na del timo..... | 10 |
| Fundamento del ensayo de rosetas..... | 11 |
| Fundamento del ensayo de transformación blastoide | 12 |
| III.- OBJETIVOS..... | 14 |
| IV.- MATERIAL Y METODOS..... | 15 |
| Material biológico..... | 15 |
| Aislamiento y purificación del extracto total de timo bovino..... | 15 |
| Determinación de la concentración de proteínas -- por el método de Lowry modificado por E.F.Hartree | 17 |
| Determinación de la concentración de carbohidratos por el método del ácido sulfúrico-fenol..... | 18 |
| Timectomía del ratón adulto..... | 19 |
| Separación de las células del bazo del ratón..... | 20 |
| Separación de leucocitos por el método de gradien- te de densidad..... | 21 |

| | Pag. |
|--|------|
| Método para la determinación de linfocitos formadores de rosetas espontáneas..... | 22 |
| Método de transformación blastoide..... | 22 |
| V.- RESULTADOS..... | 24 |
| Aislamiento y purificación del extracto total de timo bovino..... | 24 |
| Determinación de la viabilidad celular..... | 32 |
| Determinación de la concentración óptima estimulante de LFR-E con la fracción 5..... | 32 |
| Determinación de la concentración inhibitoria del 50% de LFR-E y azatioprina..... | 40 |
| Efecto de la fracción 5 en LFR-E tratados con azatioprina..... | 40 |
| Determinación de la reactividad linfoblástica. | 47 |
| VI.- DISCUSION..... | 53 |
| VII.- CONCLUSIONES..... | 57 |
| VIII.- BIBLIOGRAFIA..... | 58 |

LISTA DE ABBREVIATURAS.

| | |
|---------|--|
| μ m | micrómetros |
| mm | milímetros |
| cm | centímetros |
| μ g | microgramos |
| mg | miligramos |
| gr | gramos |
| ml | mililitros |
| LFR-E | Linfocitos formadores de rosetas espontáneas |
| BSA | Albumina sérica bovina |
| PHA | fitohemaglutinina |
| Az | azatioprina |
| F5 | fracción 5 del extracto de timo |
| cpm | cuentas por minuto |
| N-prot | Nitrógeno proteico |
| Ce' | coeficiente de estimulación parcial |
| Ce | coeficiente de estimulación total |
| CeL | coeficiente de estimulación linfoblástica |
| Rn | ratones normales |
| Rtx | ratones timectomizados |
| mM | milimolar |
| M | molar |
| sol | solución |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute 1640 |

LISTA DE TABLAS Y GRAFICAS.

| | | Pag. |
|-------------|--|------|
| Figura No.1 | Diagrama de purificación del extracto total de timo bovino..... | 25 |
| Tabla No.1 | Determinación de la concentración de proteí <u>n</u> as, carbohidratos y actividad biológica de las fracciones obtenidas..... | 27 |
| Tabla No.2 | Determinación de la curva estándar de pro <u>te</u> ínas por el método de Lowry modificado... | 28 |
| Tabla No.3 | Determinación de la curva estándar de carbo <u>h</u> idratos por el método del ácido sulfúrico-fenol..... | 30 |
| Tabla No.4 | Determinación de la viabilidad celular por la exclusión del colorante azul de Tripán,- a diferentes tiempos..... | 33 |
| Tabla No.5 | Determinación de la concentración óptima es <u>ti</u> mulante de LFR-E tempranas y la fracción 5 | 35 |
| Tabla No.6 | Determinación de la concentración óptima es <u>ti</u> mulante de LFR-E tardías y la fracción 5. | 37 |
| Tabla No.7 | Determinación de la concentración inhibito <u>ri</u> a del 50% de LFR-E y azatioprina..... | 41 |
| Tabla No.8 | Determinación del efecto de la fracción 5 - en LFR-E tratados con azatioprina..... | 44 |
| Tabla No.9 | Determinación de la transformación blastoide con fracción 5 y fitohemaglutinina..... | 48 |
| Tabla No.10 | Determinación de LFR-E tempranas y transfor <u>m</u> ación blastoide en 6 pacientes con desnutri <u>ci</u> ón en tercer grado..... | 52 |

| | Pag. |
|---------------|---|
| Gráfica No.1 | Curva estándar de BSA 29 |
| Gráfica No.2 | Curva estándar de Dextrán..... 31 |
| Gráfica No.3 | Determinación de la viabilidad celular a diferentes tiempos..... 34 |
| Gráfica No.4 | Efecto de la fracción 5 del extracto -- total de timo bovino sobre LFR-E tempranas de ratones normales y timectomizados 36 |
| Gráfica No.5 | Efecto de la fracción 5 del extracto -- total de timo bovino sobre LFR-E tardías de ratones normales y timectomizados... 38 |
| Gráfica No.6 | Efecto de azatioprina en LFR-E tempranas de ratones normales y timectomizados 42 |
| Gráfica No.7 | Coefficiente de estimulación parcial de LFR-E tempranas por la fracción 5..... 45 |
| Gráfica No.8 | Coefficiente de estimulación total de -- LFR-E tempranas por la fracción 5..... 46 |
| Gráfica No.9 | Reactividad linfoblástica a fitohemaglutinina..... 49 |
| Gráfica No.10 | Reactividad linfoblástica a fracción 5 en células de bazo de ratones CD-1 timectomizados y normales..... 50 |

I.- RESUMEN.

La falta de desarrollo del timo y la timectomía experimental en animales y en el hombre, han demostrado que influyen en el trasplante de tejidos, desarrollo de enfermedades autoinmunes e inmunodeficiencias. Así también se ha demostrado que la administración de Timosina puede mejorar la respuesta inmunológica mediada por células. Es por lo tanto, de gran importancia estudiar la actividad de la Timosina, y el objetivo del presente trabajo fué, aislar y purificar la fracción biológicamente activa a partir de timo bovino. De esta fuente obtuvimos una fracción que contenía 7.67 µg/ml de proteínas y 2.07 µg/ml de carbohidratos, mostrando tener una actividad biológica similar a la Timosina, determinada por el ensayo de rosetas espontáneas y transformación blastoide en células de bazo de ratones timectomizados, observando un aumento significativo de LFR-E luego de la incubación con 100 µg de la fracción 5 obtenida ($p < 0.0005$). Se determinó el coeficiente de estimulación de los LFR-E tratados con azatioprina y la fracción 5 ($p < 0.005$). En el ensayo de reactividad linfoblástica, no se detectó ningún efecto mitogénico comparando con la fitohemaglutinina. Se estudió un grupo de pacientes (6 niños) con desnutrición en tercer grado, para demostrar in vitro la actividad biológica de la preparación obtenida, observándose un incremento hasta de 73% de LFR-E. Estos resultados indican que la preparación obtenida probablemente induzca la diferenciación del linfocito T, de acuerdo a la hipótesis propuesta por algunos autores.

II.- INTRODUCCION.

El mayor avance en el entendimiento de las funciones de la glándula tímica y sus secreciones endocrinas en la ontogénesis y homeostásis del sistema linfoide y en los mecanismos inmunológicos, fueron hechos en la década pasada. Encontrándose que la función del órgano es producir derivados celulares(1). Esto, ahora está bien establecido y las células timo-dependientes (T), están implicadas en muchos aspectos de la inmunidad, bien sea como células efectoras directas (fenómenos de citotoxicidad), en la secreción de mediadores de hipersensibilidad tardía, ó como regulador en la respuesta inmune mediada por células. Muchas de estas acciones antígeno-específicas y antígeno inespecíficas involucran la secreción de mediadores humorales por células T sensibilizadas. También se induce la secreción de mediadores con propiedades similares a las ya mencionadas, mediante la activación policlonal por fitomitógenos. Se sabe que son secretados por la glándula tímica numerosos factores que están implicados en la diferenciación de las células T.

El tema de hormonas tímicas ha sido materia de controversia durante los últimos años. Sin embargo, en la actualidad hay evidencias de que la glándula tímica produce factores humorales capaces de modificar la función de los timocitos in vitro ó in vivo (1).

Antecedentes.

El estudio de las hormonas tímicas se inicia en el año de 1930, con los estudios de Gregoire y Comsa (2,3,4),

sobre la regeneración del timo irradiado en envolturas artificiales. Gregoire (3), demostró que los implantes de timo - en cerdos y conejos previamente depletados de timocitos cervicales por irradiación, inducían hiperplasias de los nódulos linfoides regionales. Comsa (4), posteriormente demostró que la timectomía en el cobayo, induce cambios en muchas --- glándulas endocrinas, las cuales se pueden corregir con la - administración de extractos tímicos.

Retrospectivamente, fué a principios de los años 60s, en -- que toma un nuevo auge este campo, por el descubrimiento del efecto de la timectomía neonatal en la respuesta inmune. Miller (1), demostró que el timo encapsulado en cámaras Millipore restaura la inmunocompetencia de el ratón neonato timectomizado; así mismo, los hallazgos de mejoría del sistema inmune durante el embarazo del ratón timectomizado neonatalmente (5,6). Sin embargo, estos resultados fueron criticados por los resultados negativos de Miller, al intentar restaurar la inmunocompetencia de ratones timectomizados inyectando extractos tímicos, por lo que la hipótesis de hormona tímica fué poco verosímil (7). Así surge una teoría celular -- que explica la diferenciación de los precursores de las células T al contacto in situ con el epitelio tímico; simultáneamente, con la demostración por Davies (8) utilizando marcadores cromosomales, que las células periféricas de la glándula tímica responden al estímulo de fitohemaglutinina.

Por éstas razones, la hipótesis de hormona tímica fué rechazada, y sólo dos grupos de investigadores la aceptaron: - A.L.Goldstein y A.White (9) en Nueva York; y N.Trainin (10)

en Israel entre los años 1967 y 1971. Los reportes inicialmente fueron criticados por la carencia de especificidad de los extractos heterólogos usados en los experimentos. Sin embargo, el uso de materiales químicamente puros, aunado con sistemas in vitro más sofisticados, incluyendo la demostración de la conversión de células Theta negativas en positivas y de la hormona tímica circulante en sangre periférica apoyaron nuevas evidencias para la hipótesis de hormona tímica. Existe actualmente duda sobre el número de hormonas tímicas, el mecanismo de acción y su importancia en la diferenciación de las células T.

Argumentos que indirectamente sugieren una función endocrina del timo.

La demostración que la función endocrina de la glándula tímica esta generalmente basada sobre los efectos de la extirpación y la corrección de éstos efectos, por la inyección de extractos tímicos ó por implantes de glándula singénica. La extirpación del timo y la administración de extractos libres de células, no son procedimientos sencillos, y tampoco conducen a una interpretación fácil, ya que las alteraciones dramáticas del sistema inmune, sólo se logran con timentomías asociadas a irradiaciones sub-letales, no observándose cambios tan severos únicamente con la timentomía prolongada en animales adultos y neonatos.

Dado que el ratón es el modelo animal más utilizado en Inmunología, la obtención de extractos de glándula tímica murina es muy limitada, por lo que muchos investigadores (10) ---

utilizaron extractos crudos heterólogos para reconstituir la inmunocompetencia, estableciendo nuevas interrogantes en este campo. Finalmente, el trasplante de timo es probablemente más accesible para abordar nuevas líneas de investigación.

Injertos de timo encapsulado en cámaras Millipore.

Como se ha mencionado anteriormente, la reconstitución de la función normal de las células T, se logra con injertos de timo singénico; en forma similar, el injerto de timo encapsulado en membranas impermeables a células, reconstituye la inmunocompetencia de ratones neonatos timectomizados (6,10).

Las cámaras para difusión de extractos libres de células son generalmente preparadas de un material plástico o celulosa (10). La impermeabilidad celular de las cámaras es materia de controversia, primero se consideró que un poro de 0.45 μm no permitía el paso de células (11,12), pero esto fue desmentido por varios autores (10,13,14,15). Este punto, fue confirmado con experimentos estudiando el comportamiento del cromosoma T-6 de injerto de timo; algunas células derivadas del timo de un donador, pueden ser detectadas en las poblaciones de los órganos linfoides del huésped (16). En los injertos con células de sarcoma ó tumores linfocitarios L-1210 en cámaras con tamaño de poro de 0.45 μm , murieron más del 20% de los ratones que los recibieron (17). En otros estudios (15,18) utilizaron cámaras con membranas con un tamaño de poro de 0.22 μm , siendo estrictamente impermeables a células, además no se identificaron células fuera de la cámara con el cromosoma T-6 marcado. Se demostró(5) también, que el implante de timo singénico en cámaras con un tamaño de

poro de $0.45 \mu\text{m}$, reconstituía la inmunocompetencia del ratón timectomizado neonatalmente, evitaba además la pérdida de peso y el enanismo. Además restaura las poblaciones linfoides circulantes en sangre y órganos linfoides, aunque no de una manera consistente (5).

La restauración de la inmunocompetencia involucra la producción de anticuerpos a eritrocitos de carnero (19), rechazo a injertos de piel (1) y reacción injerto contra huésped (16,20). Estos experimentos fueron criticados, sobre las bases de la permeabilidad celular, mencionado antes. Sin embargo, estos resultados fueron confirmados usando cámaras con membranas con un tamaño de poro de $0.22 \mu\text{m}$ (6,16). Resultados similares se obtuvieron con cámaras conteniendo timoma no linfóide, inducido químicamente por la aplicación intratímica directa de 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) (16).

Contrariamente no se pudo restaurar la inmunocompetencia con una cámara vacía o con cámaras conteniendo tejido normal de bazo o nódulos linfáticos.

Finalmente, podríamos mencionar datos recientes obtenidos con injertos de timo en cámaras Millipore, en los cuales se demuestra que pueden inducir la restauración de los niveles de factor tímico circulante (21), de células Theta positivas, células Ig-negativas en el ratón atímico (22). Recientemente se demostró, que las células T marcadas fueron reexpresadas por la incubación de células de bazo de ratón timectomizado con implante de epitelio tímico puro en cámaras Millipore (23).

Experimentos durante el embarazo.

El ratón hembra CBA timectomizado neonatalmente, cruzado con un ratón macho normal, muestra que durante el embarazo se mejora su respuesta inmune, demostrándose por la producción de anticuerpos anti-eritrocitos de carnero y el rechazo a injertos de piel. La asociación de la función hormonal del timo con el embarazo es probable, porque no hubo dicha restauración durante un pseudoembarazo. El paso de células linfoides fetales a través de la placenta puede ser descartado, ya que el análisis citológico muestra una total ausencia de marcadores cromosomales T-6 en los tejidos linfoides de la madre (24). Por lo tanto, el paso transplacentario de sustancias humorales del timo fetal, es la explicación más lógica de esta restauración. Así mismo, la reaparición de niveles de factor tímico circulante fueron valorados por el ensayo de rosetas en la tercera semana del embarazo (25). Se menciona esto porque es motivo de controversia, la reproducibilidad de los experimentos. En particular, Stutman (15), fué incapaz de reproducirlos en ratones C3Hf.

Otras evidencias indirectas de la función endocrina del timo.

Los injertos de timo son actualmente usados para reconstituir la función de las células T en niños con inmunodeficiencias. La rápida reaparición de la función de las células T en pocas horas, esta en favor de la secreción humoral del timo (26,27). Así mismo, una restauración similar fué obtenida en algunos casos, con injertos de timo en cámaras Millipore (28). Esto ha originado la importante participación respecto a la maduración de las células T por la acción de -

la secreción del epitelio actuando a distancia del órgano, -- en contra de un contacto directo de un precursor de células T en un microambiente tímico. Podemos mencionar sin embargo, que los estudios celulares realizados por Davies (8), usando marcadores cromosomales en el ratón, indica que cualquier -- efecto de injerto de timo libre no encapsulado en los 10 días después de la timectomía, probablemente la diferenciación local se deba a la acción de la secreción del timo.

Estos estudios dieron como resultado en 1965 la identificación de un factor linfopoyético del extracto tímico, la preparación de una forma estable de la fracción biológicamente activa (Timosina) en 1966 y su purificación en 1972 (29).

A partir de esta fecha se han diseñado bioensayos para -- identificar la actividad biológica de la timosina, de los -- más empleados en la actualidad y con resultados confiables -- se describirán a continuación, además por ser los utilizados en el desarrollo de nuestro trabajo. Esto subraya la necesidad de interpretación crítica y del significado biológico de estos ensayos.

Fundamento del ensayo de rosetas.

Existen principalmente dos sub-poblaciones de linfocitos, una dependiente del timo y la otra localizada en la bolsa de Fabricio de las aves y en diversos órganos en otros vertebrados; los linfocitos B sintetizan inmunoglobulinas, los linfocitos T a su vez participan en los mecanismos de rechazo a -- injertos y tumores. Ambas sub-poblaciones T y B son indistinguibles por el criterio morfológico, por lo que se han utilizado diversas técnicas para su identificación. Se ha --

descrito (22), para identificar a los linfocitos T la utilización de marcadores de superficie; Theta, Thy, LyI, 2, 3; -- así mismo, se ha utilizado la capacidad de los linfocitos -- para formar una configuración de roseta con eritrocitos de -- carnero, observando que la formación de rosetas depende de -- la temperatura y el tiempo. Las variaciones en el número de linfocitos T formadores de rosetas, ha definido dos poblaciones funcionalmente diferentes; linfocitos formadores de rosetas tempranas (LFR-E tem) ó activas que corresponden a -- tiempos de incubación cortos con los eritrocitos de carnero (60 minutos) y los linfocitos formadores de rosetas tardías (LFR-E tar) ó totales, que corresponden a las rosetas formadas después de un tiempo sustancialmente largo de incubación (18 horas)(30). Por éste procedimiento se ha calculado que -- un 65% de linfocitos de sangre humana periférica son T.

Fundamento del ensayo de transformación blastoide.

Los linfocitos de mamíferos normales son células en reposo que pueden ser estimulados de alguna manera. La estimulación induce al linfocito a empezar una serie de cambios que lo -- hace metabólicamente más activo, aumenta la síntesis de proteínas y sufre una transformación blástica. Este proceso en el cual resulta una nueva síntesis de DNA y división celular es llamado "transformación blastoide". Dicho ensayo es de -- utilidad para; determinar el estado funcional de las células inmunocompetentes, la detección de factores séricos que deprimen la actividad del linfocito, evidencia de sensibilizaciones previas, reacciones de histocompatibilidad y para el estudio de sub-poblaciones de linfocitos, tales como células

T supresoras y la generación de mediadores de la inmunidad -
mediada por células (31,32).

La metodología básica de éstos ensayos es esencialmente la
misma, no importando la especie, el sitio original del lin--
focito ó el tipo de antígeno o mitógeno usado. El procedi---
miento involucra la selección de la población linfocítica, -
cultivo de las mismas células in vitro durante largos perío-
dos de tiempo con o sin estimulante y la detección de cambi-
os en la síntesis de DNA en las células. La incorporación --
de un radioisótopo, Tritio-timidina en el DNA permite que --
pueda ser cuantificada la transformación blastoide.

III.- OBJETIVOS.

El mecanismo por el cual la fracción 5 del extracto total de timo bovino neonato aumenta la inmunidad celular en varios modelos animales, no está completamente entendido, pero se sabe que ésta fracción incrementa in vitro el número de linfocitos T de los pacientes con inmunodeficiencias primarias o secundarias, y en pacientes con enfermedades malignas; siendo posible demostrar esto por la propiedad que tienen los linfocitos T de formar rosetas espontáneas con los eritrocitos de carnero. Por lo anterior, es importante aislar y demostrar la actividad biológica de las distintas fracciones obtenidas de un extracto total de timo bovino, por lo cual nos planteamos los siguientes objetivos:

- 1.- Obtener la fracción biológicamente activa de un extracto total de timo bovino neonato.
- 2.- Demostrar por medio de dos ensayos in vitro (formación de rosetas espontáneas y transformación blastoide), la actividad biológica de las fracciones obtenidas en ratones timectomizados.
- 3.- Probar la actividad biológica de las fracciones obtenidas en linfocitos de personas sanas y de pacientes desnutridos.

IV.-MATERIAL Y METODOS.

Material biológico.

a). Glándula tímica de 80 bovinos neonatos, proporcionados por cortesía de Industrial de Abastos, Atzacapozalco México.

b). Ratones cepa CD-I blancos, hembras de 8 semanas de edad originalmente obtenidos del Bioterio de Biología Experimental de la Facultad de Medicina, UNAM. Aislados y mantenidos en el Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional, IMSS.

Todos los animales tuvieron un peso que osciló entre 25--30 gramos, se mantuvieron a 19-24°C y se alimentaron con -- Rodent Lab. Chow (Raldstou Purina Co.) y agua.

c). Especímenes de sangre periférica de 10 adultos sanos, donadores profesionales del Banco de Sangre del Centro Médico Nacional, IMSS y de seis pacientes con diagnóstico de desnutrición en tercer grado (edad de uno a seis meses). A todos los individuos se les extrajo de 5 a 10 ml de sangre de una vena periférica del pliegue del codo.

Aislamiento y purificación del extracto total de timo bovino.

(29).

-Preparación del timo.

Se colectó la glándula tímica por desprendimiento de 80 bovinos de 1 a 50 días de nacidos. Se transportaron en recipientes refrigerados. Las muestras fueron seleccionadas, desechando el tejido adiposo y cápsula fibrosa que lo envuelve, se fraccionó en pequeños trozos, obteniendo un total de 1.2-Kg. Toda la preparación se realizó a 4°C.

-Aislamiento y purificación.

El timo fué homogenado en 5 litros de NaCl 0.15 M y 50 ml de octanol (antiespumante), esta mezcla fué centrifugada a 15000 xg durante 20 minutos a 0°C en una centrífuga refrigerante (R-5 Superspeed Refrigerated Centrifuge, Sorvall). El sedimento constituido por material nuclear se desechó, y el sobrenadante se consideró como la fracción I, ésta fué sometida a un calentamiento a 80°C durante 60 minutos en agua a temperatura constante, obteniéndose un voluminoso precipitado formado de proteínas desnaturalizadas que fué separado por centrifugación a 15000 xg durante 20 minutos a 0°C. El sobrenadante de color amarillo translúcido se consideró como la fracción 2, a ésta se le agregaron 5 volúmenes de acetona a -10°C, obteniendo un precipitado que se colectó por filtración con un embudo Buchner (Whatman I), el cual fué lavado con 5 volúmenes de acetona a -10°C. Se obtuvo un polvo blanquecino que se consideró como la fracción 3, éste polvo fué colocado en un desecador conteniendo carbonato de calcio y se mantuvo la presión reducida durante 72 horas a 4°C. Obteniendo un polvo blanco seco, el cual fué resuspendido en 10 volúmenes de NaPO₄ 10 mM, se agitó durante 60 minutos a temperatura ambiente. Una pequeña cantidad de polvo insoluble fué removido por centrifugación a 15000 xg durante 20 minutos a 0°C. El sobrenadante correspondió a la fracción 4, se ajustó la concentración proteica a 25 mg/ml (método de Lowry modificado). Hecho lo anterior se precipitó, con una solución saturada de sulfato de amonio al 25%, el precipitado fué removido por centrifugación a 15000 xg durante 20 minutos a 0°C, al sobrenadante así obtenido se le ajustó la --

acidez a pH 4 con ácido acético glacial al 10%. Esto se ----
llevó a una precipitación con sulfato de amonio al 50% (14.6
gr/100 ml), se mantuvo en agitación constante durante 60 mi-
nutos a temperatura ambiente. El escaso precipitado fué re--
movido por centrifugación a 15000 xg durante 20 minutos a 0
°C, y disuelto en solución buffer Tris-Cl 10 mM, pH 8; a ésta
solución se le ajustó la concentración de proteínas a 10 mg/ml.
Se hizo una ultrafiltración con membranas Millipore UM-10, •
el filtrado fué colectado a 4°C y desalado a través de una -
columna de cromatografía (5 x 80 cm), empacada con Sephadex
G-25 fino (Pharmacia Fine Chemicals AB Uppsala, Sweden) y equi-
librada con agua desionizada. El eluado obtenido fué liofili-
zado, esto fué considerado como la fracción 5. (figura No.I)

Determinación de la concentración de proteínas por el método
de Lowry modificado por E.F.Hartree (35).

Este método se usó para la determinación del contenido pro-
teico de cadauna de las fracciones obtenidas en el proceso -
de purificación del extracto total de timo bovino.

Se utilizaron los siguientes reactivos: cristales de sero-
albúmina bovina (BSA) (160 µg/ml). Sol. A (carbonato de so--
dio 20 gr, hidróxido de sodio 4 gr disuelto en 1000 ml de --
agua destilada); sol. B (sulfato de cobre anhidro 100 mg en
10 ml de agua destilada); sol. C (tartrato de sodio y potasio
200 mg en 10 ml de agua destilada); sol. D (49 ml de sol. A,
0.5 ml de sol. B y 0.5 ml de sol. C) y sol. E (reactivo de -
Folin-Ciocalteu diluído dos veces con agua destilada).

Se enumeraron una serie de tubos; al tubo No.I no se le --
adicionó albúmina, a los tubos del No.2 al No.6 se les adi--

cionó 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1.0 ml de albúmina respectivamente, a todos los tubos se les adicionó agua desionizada para completar 1.0 ml, posteriormente se adicionó 5 ml de sol. D en cada tubo, se agitaron manualmente, se dejaron reposar -- 15 minutos a temperatura ambiente. Al cabo de este tiempo se adicionó 1 ml de la sol. E, inmediatamente fueron agitados -- fuertemente con un vibrador y fueron colocados en baño de -- agua a 50°C durante 10 minutos. Se dejaron enfriar a tempe-- ratura ambiente, se leyó la absorbancia a 700 nm, usando co-- mo blanco el tubo No.1.

Para las muestras problema, se pesó 100 µg de cada una de las fracciones obtenidas y se diluyeron en 10 ml de agua, -- se trataron de la misma forma antes mencionada, sustituyendo la albúmina por la muestra diluída. La concentración correc-- ta de albúmina, se determinó leyendo la absorbancia a 280 nm y multiplicando por el coeficiente de extinción (1.515 mg/ml). (Tabla No.2, gráfica No.1).

Determinación de la concentración de Carbohidratos por el método del ácido sulfúrico-fenol (37).

Este método fué utilizado para conocer la concentración de carbohidratos de cada una de las cinco fracciones obtenidas en la purificación del extracto total de timo bovino.

Se utilizaron los siguientes reactivos; dextrán tipo 100 C (Sigma Chem), el cual fué previamente secado (100 µg/ml), fenol al 5% y ácido sulfúrico concentrado.

Se colocaron una serie de tubos, cantidades crecientes de dextrán, que fueron de 0.0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 y 0.5 ml, se adicionó agua desionizada para llevar a un volúmen de 0.5 ml

posteriormente se adicionó 0.5 ml de fenol y 2.5 ml de ácido sulfúrico; inmediatamente se agitaron con un vibrador y se dejaron enfriar a temperatura ambiente durante 60 minutos, al cabo de este tiempo se leyó el desarrollo de color a 490 nm contra un blanco de reactivos. Para las muestras problema, se pesó 100 µg de cada una de las fracciones obtenidas y se diluyeron en 10 ml de agua, se trataron de la forma antes mencionada, sustituyendo el dextrans por la muestra diluida (tabla No.3, gráfica No.2).

Timectomía del ratón adulto (38).

El ratón fué anestesiado con tiopental sódico (20Th Century Chemical de Mex.), en una dosis de 30 a 60 mg/Kg de peso, vía intraperitoneal. La pared anterior del tórax fué lavada con solución de benzal y colocado en posición prona, en una tabla de corcho. Los cuatro miembros fueron inmovilizados con cinta adhesiva, la piel fué esterilizada con unas gotas de alcohol al 70%. Se hizo una incisión en la piel a lo largo de la línea media y a la mitad del esternón, inmediatamente abajo del cuello. La tabla de corcho fué acomodada para que la cabeza del animal quedara del lado izquierdo del operador. El esternón fué sujetado firmemente con unas pinzas y cortado transversalmente a la mitad del tercer espacio intercostal. El timo se observó inmediatamente bajo la incisión; el esternón fué sujetado hacia arriba, usando las pinzas y una cánula fué llevada al interior hasta hacer contacto con el timo, la succión por medio de una bomba de vacío, se realizó de manera variable hasta el desprendimiento total

de los dos lóbulos tímicos. Se cerró el tórax con hilo de seda 4 ceros y finalmente se suturó la piel. Se vigilaron los animales hasta la recuperación total.

Separación de las células de bazo del ratón (29).

Se utilizaron ratones cepa CD-1 normales y timectomizados 20 días previos a la esplenectomía. A todos los animales que se les encontró remanentes de tejido tímico, fueron descartados. Los animales fueron sacrificados por descerebración. El abdomen fué limpiado con alcohol al 70%, y el bazo fué removido asépticamente a través de un corte toracoabdominal. Al bazo se le hicieron pequeños cortes en la cápsula fibrosa para desarreglar la estructura celular. El tejido se pasó a través de una malla de acero inoxidable estéril (poro 53 μ m) y fué presionado con un émbolo de cristal, lavando con solución balanceada de Hank (cloruro de sodio 8 gr, cloruro de potasio 0.4 gr, cloruro de calcio 0.14 gr, fosfato ácido de sodio 0.12 gr, fosfato ácido de potasio 0.06 gr, bicarbonato de sodio 0.35 gr, dextrosa 1.0 gr, rojo de fenol 0.007 gr en 1000 ml de agua destilada y desionizada), para que las células fueran arrastradas y se recibieron en un tubo Oak-Ridge de propileno de 15 ml. Las células así obtenidas, se resuspendieron suavemente con una pipeta pasteur. El material celular fué centrifugado a 400 xg (1500-1800 rpm) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se retiraron las dos terceras partes del sobrenadante y se agregó de 2-3 ml de solución de cloruro de amonio 0.15 M, pH 7 a 37°C durante 15 minutos, al cabo de este tiempo se lavaron dos veces más las células con solución balanceada de Hank. Al final del último

lavado se dejó un volumen de 1 ml, el cual fué resuspendido suavemente, se tomó una alícuota con una pipeta de glóbulos blancos y se aforó con azul de Tripán (azul de Tripán 0.2% - cuatro partes y cloruro de sodio 4.25% una parte), se agitó durante tres minutos y se deshecharon las primeras gotas, se depositó una alícuota en un hemocitómetro, para determinar el número de células y la viabilidad de las mismas por exclusión del colorante. Se ajustó la concentración a 5×10^6 células por mililitro y la viabilidad fué mayor al 80%.

Separación de leucocitos por el método de gradiente de densidad (39). Se separaron leucocitos de sangre humana completa, la cual contiene 55-65% de linfocitos T.

Se extrajeron 5 ml de sangre periférica en una jeringa heparinizada (0.5 ml de Heparina 1000 UI), y se adicionó lentamente en un tubo Oak-Ridge de propileno el cual contenía 5 ml de Ficoll-Paque (Pharmacia Fine Chemicals AB Uppsala, Sweden), densidad 1.067 gr/ml. Se centrifugó a 400 xg durante 40 minutos a 4°C. Después de la centrifugación se observaron cuatro capas; la primera de la parte superior correspondió al suero, la segunda al paquete de leucocitos, la tercera al Ficoll-Paque y la cuarta al paquete de eritrocitos. Se separó el paquete de leucocitos con una pipeta pasteur, y se lavaron tres veces con solución balanceada de Hank. Finalmente, fueron resuspendidas en 1 ml de solución Hank, se tomó una alícuota con una pipeta de glóbulos blancos y se aforó con azul de Tripán. Se ajustó la concentración a 5×10^6 células por mililitro y la viabilidad fué mayor al 90%.

Método para la determinación de linfocitos formadores de rosetas espontáneas (LFR-E) (30). De la suspensión de células obtenidas del bazo de los ratones ó de la sangre humana periférica, se tomaron alícuotas de 0.25 ml y se colocaron en tubos de plástico (Falcon 12 x 75 mm), y se incubaron con -- con diferentes concentraciones de azatioprina (Burroughs Wellcome, Mex.); fracciones I, 2, 3, 4, 5 y albúmina bovina sérica. A 37°C durante 90 minutos, luego se adicionó 0.25 ml -- de una suspensión de eritrocitos de carnero al 0.05% en solución Hank. Así mismo fueron incubadas 15 minutos a 37°C, -- al cabo de este tiempo fueron reincubadas a 4°C durante 60 -- minutos, posteriormente fueron centrifugadas a 400 xg 5 minutos, se deshechó la mitad del sobrenadante, se resuspendió -- suavemente y se tomó una alícuota en un hemocitómetro. Se -- contaron un total de 300 células con el objetivo 40 x, calculándose la media aritmética. Los resultados se reportan en porcentaje, considerándo como linfocitos formadores de rosetas espontáneas a todos aquellos que se han unido a 3 ó más eritrocitos de carnero. Una vez realizado el conteo, se incubaron a 4°C durante 18 horas más, correspondiendo a los --- linfocitos formadores de rosetas espontáneas tardías o totales.

Método de transformación blastoide (40). De la suspensión de células obtenidas del bazo de los ratones ó sangre humana -- periférica, por lo métodos anteriormente descritos, en condiciones estériles y lavadas con medio RPMI-1640 (GIBCO), enriquecido con suero fetal de ternera (GIBCO) inactivado a 56 °C durante 30 minutos, L-glutamina 2 mM (GIBCO), N-2-hidroxi-

etilpiperazina-N'-2-ácido eténsulfónico (buffer HEPES, GIBCO) 10 mM, penicilina 50 UI/ml (Lakeside) y estreptomycin 50 µg/ml (Lakeside). Se colocaron 2×10^6 células en un mililitro de medio de cultivo en cada tubo (Falcon 12 x 75 mm), se adicionó fitohemaglutinina (DIFCO, lote 676566) en concentra---ciones de 50, 100 y 200 µl de una solución stock de 1 mg/ml. A otra serie de tubos se les adicionó 50, 100 y 200 µl de la fracción 5 del extracto total de timo bovino (1 mg/ml). Se incubaron durante 72 horas a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. Transcurrido este tiempo, se tomó una alícueta de cada tubo y se determinó la viabilidad celular por exclusión del colorante azul de Tripán. Se adicionó 25 µl de H₃-Timidina - (2 µCi/mmol), se incubaron durante 18 horas más. Al cabo de este tiempo, se cosecharon manualmente utilizando filtros de fibra de vidrio (Whatman GF/A 2.4 cm), se lavaron con una sol de timidina (0.242 mg/ml), se adicionó posteriormente ácido tricloreacético al 5% a 4°C, finalmente una solución de etanol al 70%. Fueron secados y colocados en viales con 2 ml de líquido de centelleo (2,5-difeniloxazole (PPO) 4 gr; dimetil 1-4-bis(5-fenil oxazolil) benceno (dimetil POPOP) 100 mg di---sueitos en 1000 ml de tolueno), los viales fueron cerrados.- Se determinó la incorporación de material radioactivo en un espectrofotómetro (Liquid Scintillation Spectrometer, Packard Tri-Carb mod. 3380). Los resultados fueron reportados en cuentas por minuto (cpm), se calculó la media aritmética de -- los cultivos por triplicado y la desviación estándar.

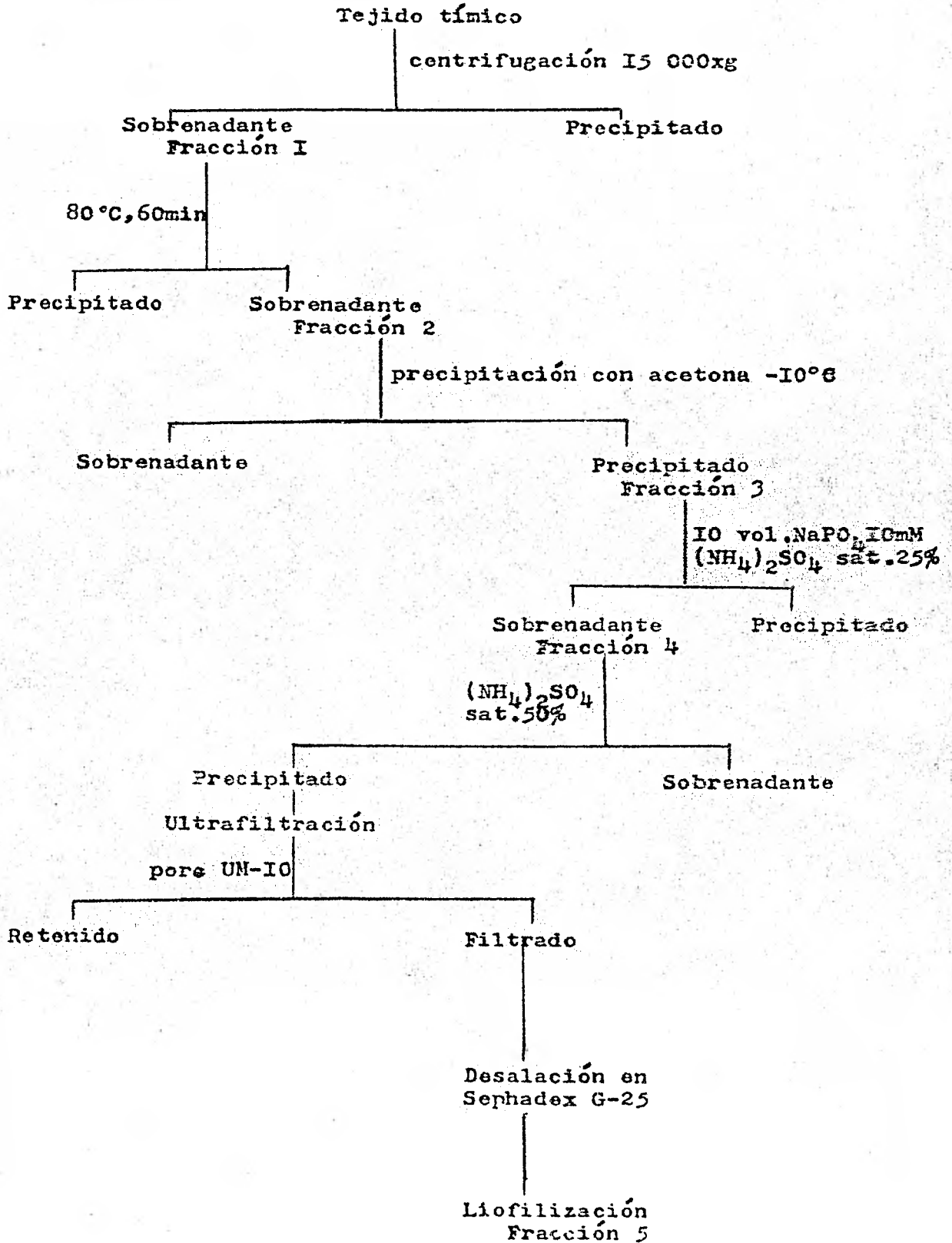
V.-RESULTADOS.

Aislamiento y purificación del extracto de timo bovino.

El procedimiento de extracción y purificación para la obtención de la fracción biológicamente activa está esquematizado en la figura No.I. Este procedimiento fué diseñado para trabajar gran cantidad de tejido tímico y obtener un buen rendimiento. La glándula tímica fué extraída de 30 bovinos neonatos recién muertos, inmediatamente se procedió a la limpieza y selección de la misma. Se realizó una primera centrifugación a 15000 xg durante 20 minutos a 0°C, obteniendo un voluminoso sedimento, constituido por gran cantidad de cromatina, característica del tejido linfoide, el sobrenadante obtenido de color amarillo claro correspondió a la fracción I. Después de un calentamiento a 80°C, se separaron las proteínas desnaturalizadas, teniendo en cuenta que la fracción biológicamente activa es estable a ésta temperatura (29), el sobrenadante obtenido correspondió a la fracción 2.

Después de la precipitación con acetona a -10°C se obtuvieron 10 gramos de polvo blanco equivalente a la fracción 3. Se ajustó la concentración de proteínas a 25 mg/ml, para disminuir la concentración. El fraccionamiento con sulfato de amonio al 25%, es para efectuar una precipitación salina. Este procedimiento removió proteínas sin actividad biológica, medida por el ensayo de la formación de rosetas. Después de la centrifugación a 15000 xg, se modificó la acidez del sobrenadante a pH 4 adicionando 79 ml de ácido acético al 10%. Luego, al adicionar sulfato de amonio sólido hasta una con---

Figura No. I
Diagrama de Purificación del Extracto total de Timo Bovino.



centración de 50% de saturación, aparece un precipitado debido a proteínas deshidratadas que ocasionaron una disminución en la solubilidad, éste precipitado fué separado por centrifugación. En el proceso de ultrafiltración a través de membranas Millipore poro UM-10, fueron separadas sustancias con pesos moleculares menores de 15.000 daltons, obteniendo una eficiencia en la filtración de 24 ml/hora. De un volumen de 1000 ml se concentró a 80 ml, el filtrado fué colectado a 4°C y posteriormente fué pasado a través de una columna empacada con Sephadex G-25 fino, equilibrada con agua destilada y desionizada para eliminar sales y nucleótidos contaminantes. El eluado fué liofilizado, obteniendo finalmente un polvo blanco, que correspondió a la fracción 5. El rendimiento total de 1 Kg de tejido tímico fué de 2.5 gramos.

Se obtuvieron cinco fracciones, cuyas concentraciones proteicas fueron de: 288.98, 94.62, 72.70, 21.92 y 7.67 µg/ml respectivamente. Simultáneamente se determinó el contenido de carbohidratos, obteniendo: 15.05, 11.09, 10.10, 8.51 y 2.07 µg/ml para las fracciones 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente.

No se observó actividad biológica en las fracciones 1, 2, 3 y 4, pero fué evidente en la fracción 5 medida por el ensayo de la formación de rosetas espontáneas (tabla No.1).

En el modelo experimental se utilizaron ratones adultos de la cepa CD-1, normales y timectomizados. A los ratones adultos de 8 semanas de edad, se les sometió a timectomía total para provocar una depleción de la población de linfocitos T.

Veinte días después se sacrificaron los animales para extirparles el bazo, y haciendo una disección total para compro--

Determinación de la concentración de proteínas, carbohidratos y actividad biológica medida por el ensayo de rosetas, de cada una de las cinco fracciones obtenidas.

| Fracción | concentración proteínas($\mu\text{g/ml}$) | concentración carbohidratos($\mu\text{g/ml}$) | actividad biológica |
|----------|---|---|---------------------|
| 1 | 288.98 | 15.05 | - |
| 2 | 94.62 | 11.09 | - |
| 3 | 72.70 | 10.10 | - |
| 4 | 21.92 | 8.51 | - |
| 5 | 7.67 | 2.07 | + |

- La actividad biológica se determinó por el ensayo de la formación de rosetas espontáneas, incubando durante 90 minutos con concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 $\mu\text{g/ml}$ de cada una de las fracciones obtenidas, en las cuatro primeras no se detectó actividad.

+ Se detectó actividad biológica a 100 $\mu\text{g/ml}$.

Tabla No. 1.- Resultados obtenidos del promedio de la determinación por duplicado de la concentración proteica, de carbohidratos y actividad biológica de las fracciones obtenidas.

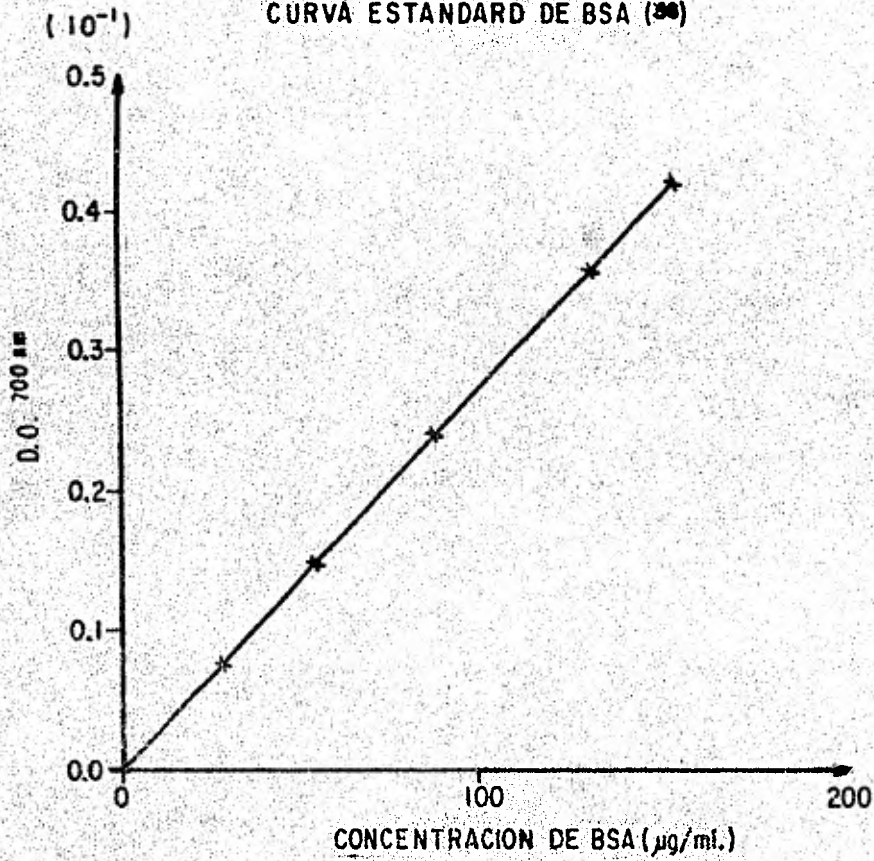
Resultados obtenidos de la determinación de la curva estándar de proteínas por el método de Lowry modificado por E.F.Hartree.

| No.de tubo | Albúmina ml (a) | Agua ml (b) | Sol.D ml(c) | Sol.E ml(d) | D.O. 700nm | Concentración (µg/ml) |
|------------|-----------------|-------------|-------------|-------------|------------|-----------------------|
| 1 | 0.0 | 1.0 | 5.0 | 1.0 | 0.0 | 0.0 |
| 2 | 0.2 | 0.8 | 5.0 | 1.0 | 0.079 | 28.86 |
| 3 | 0.4 | 0.6 | 5.0 | 1.0 | 0.148 | 54.07 |
| 4 | 0.6 | 0.4 | 5.0 | 1.0 | 0.240 | 87.68 |
| 5 | 0.8 | 0.2 | 5.0 | 1.0 | 0.375 | 137.00 |
| 6 | 1.0 | 0.0 | 5.0 | 1.0 | 0.427 | 156.00 |

- (a) Albúmina sérica bovina (160 µg/ml)
- (b) Agua destilada y desionizada
- (c) Sol.D (49 ml de sol.A, 0.5 ml de sol. B y 0.5 ml de solC)
- (d) Sol.E reactivo de Folin-Ciocalteu diluido (1:2)

Tabla No. 2.- Curva estándar de albúmina sérica bovina determinada por el método de Lowry modificado por E.F. Hartree(36).

GRAFICA No 1
CURVA ESTANDARD DE BSA (30)



Curva estándar de albúmina sérica bovina
obtenida por el método de Lowry modifica
do por E.F.Hartree.

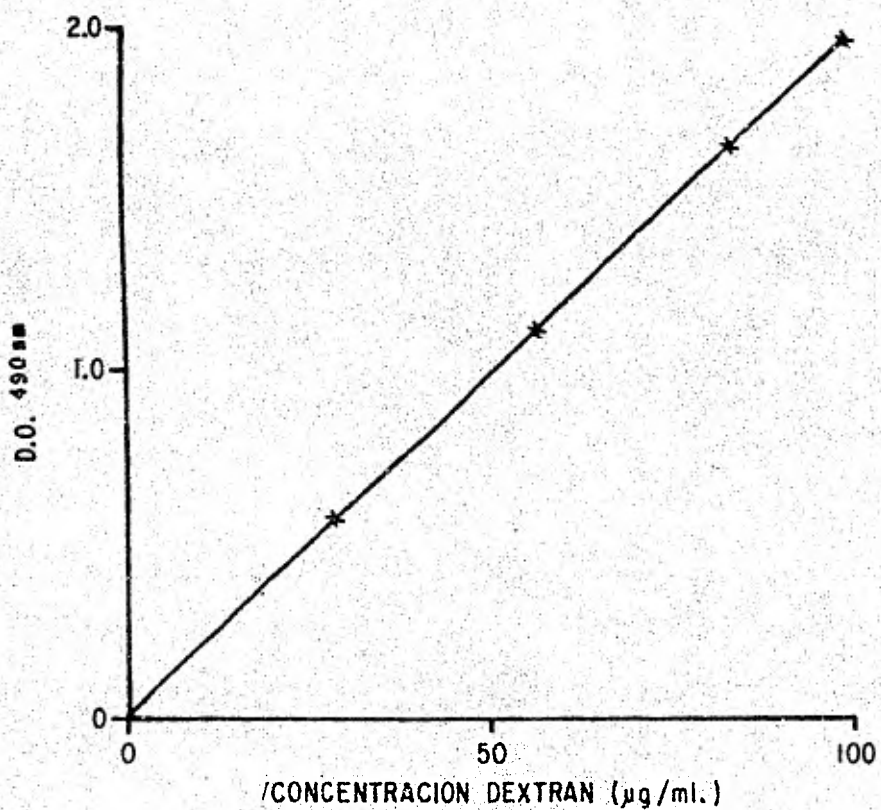
Resultados obtenidos de la determinación de la curva estándar de carbohidratos por el método del ácido sulfúrico-fenol.

| No.de tubo | Dextrán ml (a) | Agua ml(b) | Fenol ml (c) | Acido sulfúrico ml (d) | D.O. 490 nm | Concentración(µg/ml) |
|------------|----------------|------------|--------------|------------------------|-------------|----------------------|
| 1 | 0.0 | 0.5 | 0.5 | 2.5 | 0.0 | 0.0 |
| 2 | 0.1 | 0.4 | 0.5 | 2.5 | 0.584 | 29.5 |
| 3 | 0.2 | 0.3 | 0.5 | 2.5 | 0.869 | 43.91 |
| 4 | 0.3 | 0.2 | 0.5 | 2.5 | 1.166 | 58.91 |
| 5 | 0.4 | 0.1 | 0.5 | 2.5 | 1.554 | 78.52 |
| 6 | 0.5 | 0.0 | 0.5 | 2.5 | 1.979 | 100.00 |

- (a) Dextran tipo 100 C (100 µg/ml)
- (b) agua destilada y desionizada
- (c) fenol al 5%
- (d) ácido sulfúrico concentrado

Tabla No.3.- Curva estándar de dextrán determinada por el método del ácido sulfúrico-fenol (37).

GRAFICA No 2
CURVA ESTANDAR DE DEXTRAN (37)



Curva estándar de dextrán para la determinación de la concentración de carbohidratos por el método del ácido sulfúrico-fenol.

bó la timectomía total en los ratones timectomizados ó confirmar la presencia del timo en los ratones control. Este modelo experimental se diseñó para; determinar la concentración óptima estimulante de la F5, la concentración inhibitoria del 50% de LFR-E con Az y el ensayo de transformación blastoide.

Determinación de la viabilidad celular.

Durante el procedimiento de separación de células de bazo de los ratones, se determinó la viabilidad de los linfocitos por exclusión del colorante azul de Tripán, obteniendo los siguientes resultados: en los ratones normales en el tiempo cero fué de 96% y en los ratones timectomizados 95.75%. A los 60 minutos, 89.25% y 90.25% respectivamente, que representa el tiempo promedio de la manipulación celular; los resultados correspondientes a los tiempos intermedios se describen en la tabla No.4. No se realizó el experimento cuando la viabilidad fué menor al 80% (gráfica No.3).

Determinación de la concentración óptima estimulante de LFR-E con la fracción 5.

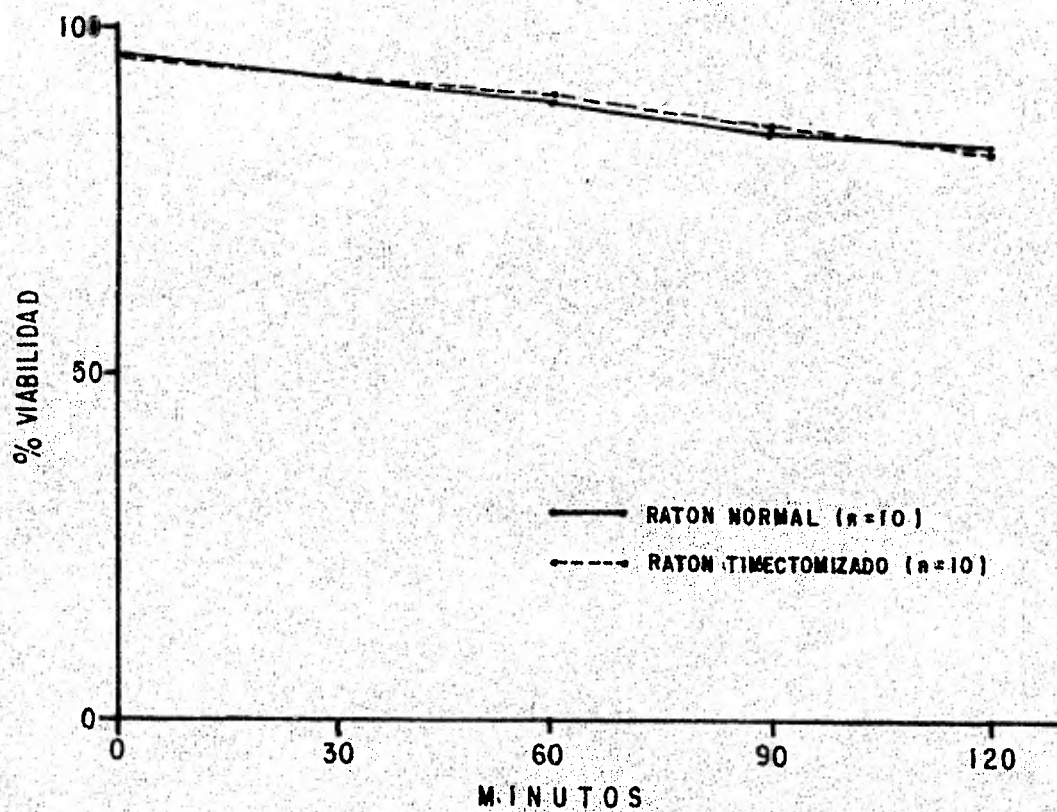
Las células aisladas del bazo de los ratones normales y timectomizados, así como de sangre humana, fueron incubadas durante 90 minutos con la F5 en concentraciones de 1, 10, 100 y 1000 µg/ml, y un tubo control. La media aritmética de las cifras basales de LFR-E tempranas de los ratones normales fueron de 6.5%, resultando ser aproximadamente 4 veces mayores a la obtenida con los ratones timectomizados que fué de 1.46%. Así mismo, se observó que la máxima estimulación fué a 100 µg de F5, obteniendo 9.63% de LFR-E tempranas para los Rtx y -

Determinación de la viabilidad celular por la exclusión del colorante azul de Tripán, a diferentes tiempos.

| | MINUTOS | | | | |
|------------------------|--------------------------|-------|-------|-------|-------|
| | 0 | 30 | 60 | 90 | 120 |
| | PORCENTAJE DE VIABILIDAD | | | | |
| n=10 | % | % | % | % | % |
| Células de bazo de Rn | 96.0 | 92.75 | 89.25 | 85.50 | 83.0 |
| Células de bazo de Rtx | 95.75 | 93.50 | 90.25 | 86.0 | 82.50 |

Tabla No.4.- Resultados obtenidos del promedio de 10 determinaciones en células de bazo de ratones normales y timectomizados.

GRAFICA No 3
DETERMINACION DE LA VIABILIDAD CELULAR A DIFERENTES TIEMPOS



Se graficaron los resultados obtenidos de la determinación de la viabilidad celular a diferentes tiempos durante el proceso de separación, lavado y conteo celular.

Determinación de la concentración óptima
estimulante de LFR-E tempranas y la fracción 5.

| n=10 | | FRACCION 5 (µg/ml) | | | | | BSA 16 |
|---|-----------|--------------------|-------|-------|-------|-------|-----------|
| | | 0 | 1 | 10 | 100 | 1000 | |
| LFR-E de Rn | \bar{x} | 6.5 | 8.06 | 9.32 | 14.39 | 6.87 | 6.64 |
| | S | 1.21 | 1.12 | 0.68 | 1.84 | 3.76 | 1.16 |
| | k | 0.29 | 0.27 | 0.20 | 0.44 | 0.91 | 0.28 |
| LFR-E de Rtx | \bar{x} | 1.46 | 4.3 | 5.59 | 9.63 | 5.07 | 3.0 |
| | S | 0.38 | 1.25 | 0.64 | 0.81 | 0.81 | 1.12 |
| | k | 0.09 | 0.30 | 0.15 | 0.19 | 0.19 | 0.27 |
| LFR-E de indivi-- duos sa- nos | \bar{x} | 43.16 | 43.91 | 48.07 | 58.07 | 35.7 | 39.1 |
| | S | 24.01 | 28.09 | 19.36 | 12.96 | 17.64 | 9.0 |
| | k | 5.83 | 6.83 | 4.07 | 3.15 | 4.28 | 2.18 |

\bar{x} media aritmética

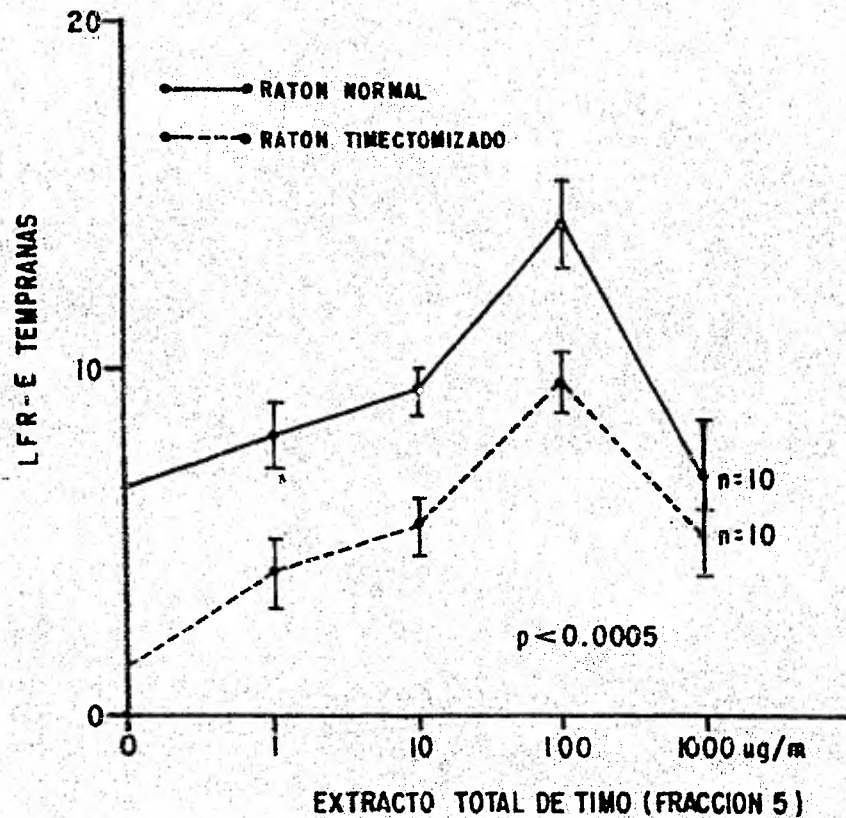
S varianza

$$k = \frac{Sc}{\sqrt{n}}$$

Tabla No. 5.- En esta tabla se muestran los resultados obtenidos de los promedios del conteo por triplicado de las 10 determinaciones de los LFR-E tempranas incubados con la fracción 5 y un control de BSA.- Los resultados están expresados en porcentaje, se reporta el intervalo de confianza, calculado a un nivel del 95% ($\mu = \bar{x} \pm k$).

GRAFICA N o-4

EFFECTO DE LA FRACCION 5 DEL EXTRACTO TOTAL DE TIMO BOVINO SOBRE LFR-E TEMPRANAS DE RATONES NORMALES Y TIMECTOMIZADOS.



En la gráfica se muestran los resultados obtenidos de la determinación de la concentración óptima estimulante de LFR-E tempranas con la fracción 5.

Determinación de la concentración óptima estimulante de
LFR-E tardías y la fracción 5 .

| n=10 | | FRACCION 5 (µg/ml) | | | | | ESA 16 |
|--|-----------|--------------------|-------|-------|-------|-------|-----------|
| | | 0 | 1 | 10 | 100 | 1000 | |
| LFR-E de Hn | \bar{x} | 8.06 | 6.24 | 8.6 | 12.6 | 3.35 | 3.8 |
| | S | 1.82 | 10.75 | 7.84 | 41.34 | 4.24 | 2.89 |
| | k | 0.44 | 2.61 | 1.90 | 10.05 | 1.03 | 0.70 |
| LFR-E de Rtx | \bar{x} | 1.16 | 0.54 | 2.38 | 11.07 | 4.05 | 0.6 |
| | S | 0.57 | 0.20 | 0.12 | 3.16 | 0.90 | 0.04 |
| | k | 0.13 | 0.04 | 0.02 | 0.76 | 0.21 | 0.009 |
| LFR-E de indivi-- duos sa- nos. | \bar{x} | 48.93 | 45.80 | 50.08 | 67.10 | 18.90 | 5.1 |
| | S | 19.36 | 20.25 | 31.36 | 9.0 | 10.89 | 11.56 |
| | k | 4.7 | 4.92 | 7.62 | 2.18 | 2.64 | 2.81 |

\bar{x} media aritmética

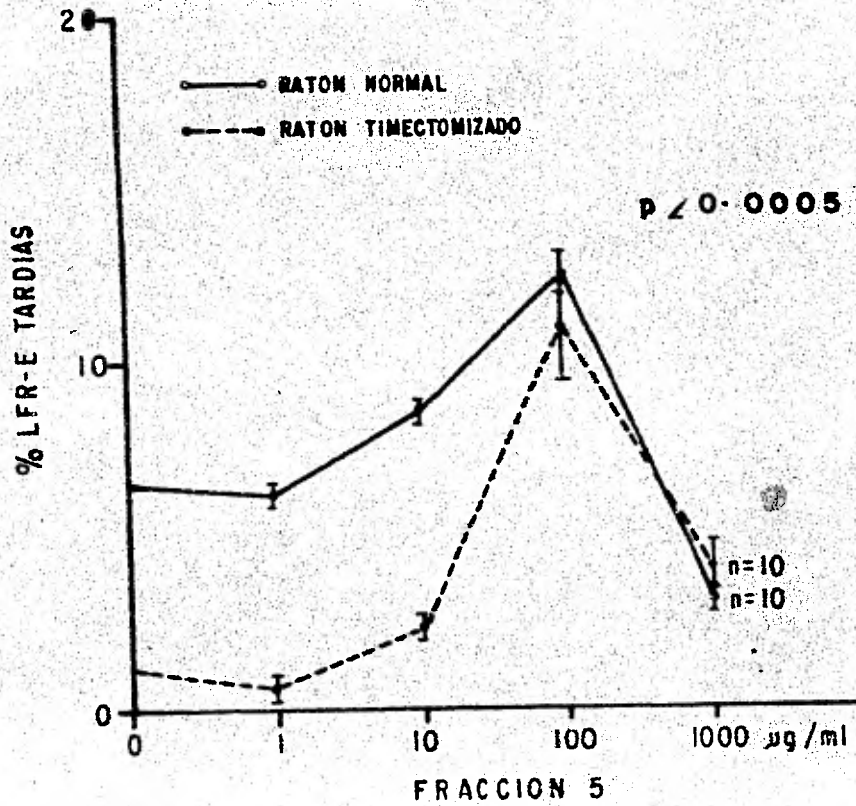
S varianza

$$k = \frac{Sc}{\sqrt{n}}$$

Tabla No. 6.- Resultados expresados en porcentaje, obtenido de los promedios del conteo por triplicado de las 10 determinaciones de los LFR-E tardías, - se reporta además los valores obtenidos del cálculo del intervalo de confianza (95%) --
($\mu = \bar{x} \pm k$).

GRAFICA No 5

EFFECTO DE LA FRACCION 5 DEL EXTRACTO TOTAL DE TIMO BOVINO SOBRE LOS LFR-E TARDIAS DE RATONES NORMALES Y TIMECTOMIZADOS.



En la gráfica se muestran los resultados obtenidos de la determinación de la concentración óptima estimulante de la fracción 5 sobre LFR-E tardías luego de la incubación durante 18 horas.

de 14.39% de LFR-E para los ratones normales. Utilizando el método estadístico de t-student para medias dependientes, se compararon las cifras basales y los resultados obtenidos luego de incubar con 100 µg/ml de F5, y en la cual se obtuvo el máximo efecto estimulante, obteniendo un valor de $p < 0.0005$ (gráfica No.4). La adición de una concentración mayor de F5 (1000 µg/ml), no activó el sistema desmedidamente, el factor limitante está marcado por el número decreciente de LFR-E. Este decremento no fué significativo en ambos casos, al obtener una media aritmética de 6.8% en los ratones normales y 5.07% en los ratones timectomizados (tabla No.5). Los LFR-E tempranas de sangre de individuos normales mostraron un aumento significativo ($p < 0.005$), al obtener un promedio de 43.16% cifra basal y 58.07% luego de la incubación con 100 µg de la F5 (tabla No.5). Se observó además, el mismo efecto decreciente al aumentar diez veces la concentración de F5 (1000 µg/ml), obteniendo un promedio de 35.7% de LFR-E tempranas. Una vez realizado el conteo de los LFR-E tempranas, se procedió a cuantificar los LFR-E tardías ó totales, en donde el promedio basal correspondiente a los ratones normales fué de 8.06%, siendo seis veces mayor al promedio basal obtenido con el grupo de ratones timectomizados que fué de 1.16% de LFR-E tardías. En forma similar, luego de incubar las células con la F5 (100µg/ml) y de transcurrir 18 horas, el grupo de ratones timectomizados mostró un valor promedio de 11.07% y los ratones normales de 12.06% (tabla No.6). También se comparó, los resultados promedios basales y los resultados obtenidos donde se obtuvo el máximo efecto, obte-

niendo una diferencia significativa ($p < 0.005$) (gráfica No.5). En las determinaciones de LFR-E de individuos sanos, se obtuvo un promedio basal de 48.93% y con la F5 (100 $\mu\text{g/ml}$) 67.1%. En lo que respecta a la incubación control, usando BSA (16 $\mu\text{g/ml}$ peso seco), no hubo efecto estimulante, ya que la cifra obtenida de 39.1% de LFR-E equivale a la determinación basal correspondiente a los linfocitos incubados con los eritrocitos de carnero únicamente (tabla No.5).

Determinación de la concentración inhibitoria del 50% de LFR-E y azatioprina. Las células obtenidas del bazo de ratones normales, timectomizados y de sangre humana periférica, fueron incubadas durante 90 minutos con 12.5, 25 y 50 $\mu\text{g/ml}$ de azatioprina. Observándose que los LFR-E se inhiben al aumentar la concentración. En el grupo de ratones normales se obtuvieron 6.5% de LFR-E cifra basal y 3.61% con 50 $\mu\text{g/ml}$ de azatioprina; en el grupo de ratones timectomizados, se obtuvieron 1.46% de LFR-E promedio basal y con azatioprina 0.15% (tabla No.7). Sabiendo que la concentración inhibitoria requerida, es aquella en la cual se inhibe el 50% de los LFR-E, correspondió a dicha concentración 50 $\mu\text{g/ml}$ de azatioprina. Se observó también, que si se prolonga el tiempo de incubación a 18 horas, la inhibición es total en todas las concentraciones probadas. Este efecto fué similar en los LFR-E de sangre humana periférica, o sea, de un valor promedio basal de 43.16% disminuyó hasta 25.1% con 50 $\mu\text{g/ml}$ de azatioprina. Cabe aclarar que la viabilidad en los LFR-E tardías fué mayor al 70%.

Efecto de la fracción 5 en LFR-E tratados con azatioprina. Una vez determinada la concentración óptima estimulante de LFR-E

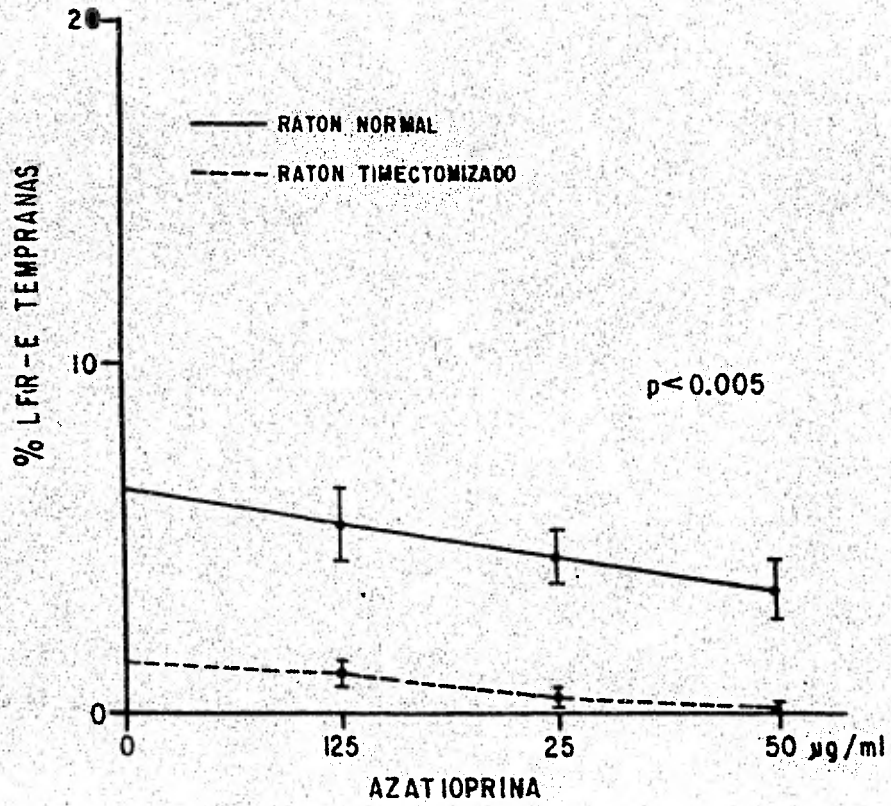
Determinación de la concentración inhibito-
ria del 50% de LFR-E y azatioprina.

| n=10 | | AZATIOPRINA (µg/ml) | | | |
|----------------------------|-----------|---------------------|-------|------|-------|
| | | 0 | 12.5 | 25 | 50 |
| LFR-E de Rn | \bar{x} | 6.5 | 5.56 | 4.6 | 3.61 |
| | S | 1.21 | 1.76 | 0.70 | 0.82 |
| | k | 0.29 | 0.42 | 0.17 | 0.19 |
| LFR-E de Rtx | \bar{x} | 1.46 | 1.28 | 0.63 | 0.15 |
| | S | 0.38 | 0.30 | 0.14 | 0.04 |
| | k | 0.09 | 0.07 | 0.03 | 0.009 |
| LFR-E de individuos sanos. | \bar{x} | 43.16 | 38.5 | 31.1 | 25.1 |
| | S | 24.01 | 30.25 | 16.0 | 21.16 |
| | k | 5.83 | 7.35 | 3.89 | 5.14 |

\bar{x} media aritmetica
 S varianza
 $k = \frac{Sc}{\sqrt{n}}$

Tabla No.7.- Se muestran los resultados obtenidos de la determinación de los LFR-E luego de la incubación con diferentes concentraciones de azatioprina. Los resultados están expresados en porcentaje, se reportan además, las medias aritméticas, la varianza y el intervalo de confianza calculado para un nivel de 95%, ($\mu = \bar{x} \pm k$).

GRAFICA No 6
EFECTO DE AZATIOPRINA EN LFR-E TEMPRANAS DE
RATONES NORMALES Y TIMECTOMIZADOS



Resultados obtenidos luego de la incubación de LFR-E con azatioprina a diferentes concentraciones.

y la fracción 5 (100 µg/ml), y la concentración inhibitoria del 50% de LFR-E con azatioprina (50 µg/ml), se procedió a - incubar las células con ambas sustancias, se trabajó simul- - táneamente un tubo control conteniéndo azatioprina y albúmi- - na sérica bovina (16 µg/ml peso seco), en concentración equi- - valente en contenido proteico a la fracción 5 obtenida (7.67 µg/ml). Obteniéndo en el grupo de ratones normales, cifras - promedio de 7.09% de LFR-E tempranas luego de la incubación con Az-F5, resultando ser 1.5 veces mayor a las obtenidas con Az-BSA que fué de 4.61% de LFR-E. Simultáneamente, en el - grupo de ratones timentomizados, se obtuvo 5.7% de LFR-E --- con Az-F5 y un promedio de 3.53% de LFR-E con Az-BSA.

Los LFR-E tempranas de individuos sanos mostraron variacio- - nes, o sea, con la incubación con Az-F5 se obtuvo un promedio de 32.1%, siendo 1.6 veces mayor al promedio obtenido con Az- BSA de 19.6%. Al realizar el conteo de LFR-E tardías ó tota- - les, se observó que en la incubación con Az-BSA, hubo una in- - hibición total en ambos casos de los grupos de ratones norma- - les y timentomizados (tabla No.8). Simultáneamente, los LFR-E de sangre humana periférica presentaron cifras despreciables de 2.3% luego de la incubación con Az-BSA. Se realizaron los cálculos correspondientes para determinar los coeficientes de estimulación parcial y total que consisten en lo siguiente:

$$Ce' = \frac{\text{LFR-E} + F5}{\text{LFR-E}} \quad ; \quad Ce = \frac{\text{LFR-E} + F5 + \text{Az}}{\text{LFR-E} + \text{Az}}$$

Donde:

Ce' coeficiente de estimulación parcial

Ce coeficiente de estimulación total

LFR-E linfocitos formadores de rosetas espontáneas, cifras ba- - sales.

Determinación del efecto de la fracción 5 en
LFR-E tratados con azatioprina.

LFR-E tempranas.

| n=10 | | ^a Az-F5 | ^b Az-BSA | ^c Ce' | ^d Ce |
|----------------------------|-----------|--------------------|---------------------|------------------|-----------------|
| LFR-E de Rn | \bar{x} | 7.09 | 4.61 | 2.04 | 2.20 |
| | S | 0.65 | 0.75 | 0.21 | 0.18 |
| | k | 0.15 | 0.18 | 0.05 | 0.04 |
| LFR-E de Rtx | \bar{x} | 5.7 | 3.53 | 8.30 | 7.01 |
| | S | 0.73 | 0.70 | 25.50 | 12.25 |
| | k | 0.17 | 0.17 | 6.20 | 2.97 |
| LFR-E de individuos sanos. | \bar{x} | 32.1 | 19.6 | 1.35 | 1.25 |
| | S | 20.25 | 5.29 | 0.01 | 0.25 |
| | k | 4.29 | 1.28 | 0.002 | 0.06 |

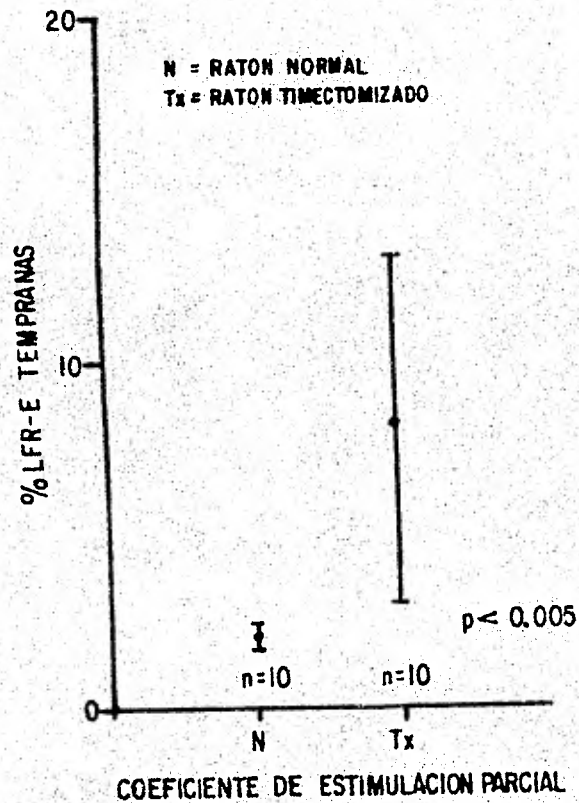
LFR-E tardías.

| | | | |
|---------------------------|-----------|-------|------|
| LFR-E de Rn | \bar{x} | 3.93 | 0.0 |
| | S | 0.86 | 0.0 |
| | k | 0.20 | 0.0 |
| LFR-E de Rtx | \bar{x} | 3.0 | 0.0 |
| | S | 0.42 | 0.0 |
| | k | 0.10 | 0.0 |
| LFR-E de individuos sanos | \bar{x} | 37.2 | 2.3 |
| | S | 12.25 | 1.0 |
| | k | 2.97 | 0.55 |

- ^a azatioprina (50 µg/ml) y fracción 5 (100 µg/ml)
^b azatioprina (50 µg/ml) y albúmina sérica bovina (16 µg/ml)
^c coeficiente de estimulación parcial
^d coeficiente de estimulación total

Tabla No.8.- Resultados de 10 determinaciones expresados en porcentaje, se reporta la media aritmética (\bar{x}), la varianza (S) y el valor de k (S_c/\sqrt{n}), correspondiente al intervalo de confianza de 95% ($\mu = \bar{x} \pm k$).

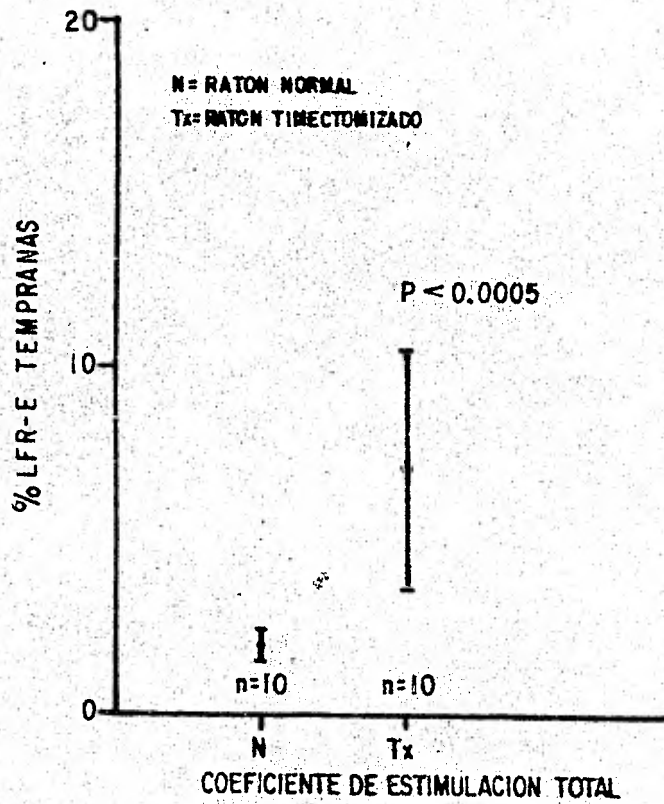
GRAFICA N o 7
COEFICIENTE DE ESTIMULACION PARCIAL DE
LFR-E TEMPRANAS POR LA FRACCION 5



$$Co = \frac{LFR-E + F5}{LFR-E}$$

Gráfica que muestra la media aritmética y la desviación estándar de la determinación del coeficiente de estimulación parcial calculado con las 10 determinaciones basales y las obtenidas con la concentración óptima estimulante de la fracción 5 (100 µg).

GRAFICA No 8
COEFICIENTE DE ESTIMULACION TOTAL DE LFR-E
TEMPRANAS POR LA FRACCION 5.



$$Ce = \frac{LFR-E + F5 + Az}{LFR-E + Az}$$

Gráfica que muestra la media aritmética y la desviación estándar de la determinación del coeficiente de estimulación total de LFR-E tempranas y la fracción 5 (100µg/ml).

F5 determinación de LFR-E con fracción 5 (100 µg/ml)

Az determinación de LFR-E con azatioprina (50 µg/ml)

Se compararon los coeficientes de estimulación parcial de los grupos de ratones normales y timentomizados mostrando -- una diferencia significativa ($p < 0.0005$) (gráfica No.7) y lo correspondiente para los coeficientes de estimulación total, ($p < 0.005$) (gráfica No.8).

Determinación de la reactividad linfoblástica. Las células separadas en condiciones de absoluta esterilidad, fueron colocadas en una serie de tubos a los cuales se les adicionó - 50, 100 y 200 µl de PHA; simultáneamente, a otra serie de tubos se les adicionó 50, 100 y 200 µl de F5, para determinar algún probable efecto mitogénico. Se realizó el experimento por triplicado, se calculó la media aritmética y la desviación estándar, obteniendo que la PHA estimuló a los linfocitos de los ratones normales 6.6 veces, sin embargo, los linfocitos de los ratones timentomizados no respondieron a este estímulo. Por otra parte, no se observó efecto mitogénico -- con la F5, dado que el mayor coeficiente de estimulación --- linfoblástica obtenido fué 2.0 en los ratones timentomizados, y en los ratones normales fué de 2.1. El criterio que se siguió para considerar efecto mitogénico, fué que el coeficiente de estimulación linfoblástica fuera mayor a 2.5 (tabla No. 9). El coeficiente de estimulación linfoblástica se calculó de acuerdo a la siguiente relación:

$$\text{Coef.} = \frac{\text{cpm de linfocitos estimulados}}{\text{cpm de linfocitos no estimulados}}$$

Se observó también, que en el cultivo control de las células de los ratones timentomizados las cpm fueron del orden -

Determinación de la transformación blastoide
con la fracción 5 y la fitohemaglutinina.

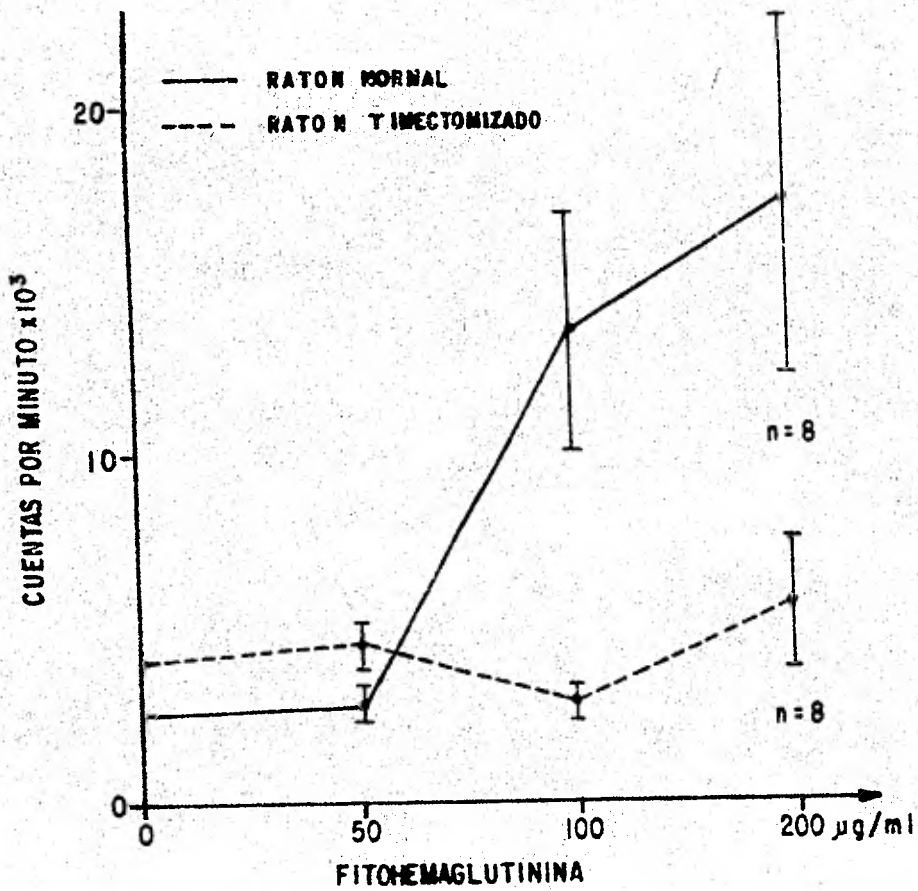
| n=10 | | FITOHEMAGLUTININA (µg/ml) | | | |
|--------------------------|-----------|---------------------------|------|-------|-------|
| | | 0 | 50 | 100 | 200 |
| | | cpm | cpm | cpm | cpm |
| Células de bazo de Rn | \bar{x} | 2671 | 2730 | 13000 | 17707 |
| | DS | 934 | 548 | 4245 | 6524 |
| | CeL | | 1.0 | 5.1 | 6.6 |
| Células de bazo de Rt | \bar{x} | 4144 | 4505 | 5762 | 2963 |
| | DS | 2019 | 858 | 2517 | 751 |
| | CeL | | 1.0 | 1.1 | 0.7 |

| n=10 | | FRACCIÓN 5 | | | |
|--------------------------|-----------|------------|------|------|------|
| | | 0 | 50 | 100 | 200 |
| | | cpm | cpm | cpm | cpm |
| Células de bazo de Rn | \bar{x} | 2671 | 3095 | 5690 | 3096 |
| | DS | 934 | 879 | 2774 | 2281 |
| | CeL | | 1.1 | 2.1 | 1.1 |
| Células de bazo de Rt | \bar{x} | 4144 | 4592 | 5325 | 8402 |
| | DS | 2019 | 851 | 2408 | 2131 |
| | CeL | | 1.1 | 1.2 | 2.0 |

\bar{x} media aritmética
 DS desviación estándar
 cpm cuentas por minuto
 CeL coeficiente de estimulación linfoblástica

Tabla No. 9.- Resultados de la determinación de la transformación blastoide en células de bazo de ratones normales y timectomizados con diferentes concentraciones de PHA y F5.

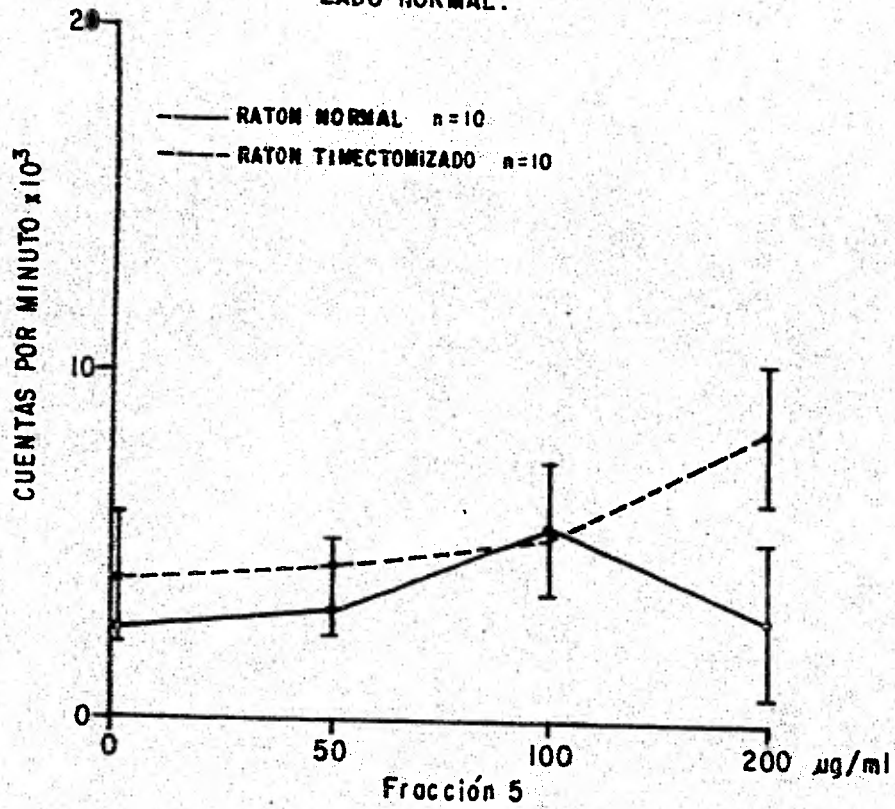
GRAFICA No 9
REACTIVIDAD LINFOBLASTICA A FITOHEMAGLUTININA



Resultados de la determinación de la actividad linfoblástica de células de bazo de ratones a fitohemaglutinina.

GRAFICA No 10

REACTIVIDAD LINFOBLASTICA A FRACCION 5 EN
CELULAS DE BAZO DE RATON CD-1 TIMECTOMI-
ZADO NORMAL.



Resultados de la determinación de la reactivi-
dad linfoblástica de células de bazo de rato-
nes a fracción 5.

de 4144 ± 2019 siendo ligeramente mayores a las obtenidas en los ratones normales que fueron del orden de 2671 ± 934 (gráficas No.9 y 10).

Se estudió un grupo de seis niños cuyas edades oscilaron entre 1 y 6 meses, todos con diagnóstico de desnutrición en tercer grado. Se evaluó la formación de rosetas, y el rango obtenido fué de 23% a 40% inicialmente, ó sea la incubación basal correspondiente a los linfocitos y eritrocitos de carnero solamente, luego de la incubación in vitro con la fracción 5 (100 $\mu\text{g/ml}$), el rango obtenido fué de 40% a 58% de LFR-E. Se calculó el incremento de acuerdo a la siguiente relación:

$$\text{Incremento} = \frac{\text{LFR-E con F5} - \text{LFR-E sin F5}}{\text{LFR-E sin F5}} \times 100$$

En algunos casos se detectó un incremento mayor (tabla No. 10), esto se debe a que probablemente exista alguna otra enfermedad asociada. Se determinaron también los coeficientes de estimulación linfoblástica, en dos casos se obtuvo una respuesta favorable a PHA (CeL=3.0). El resto de los pacientes no respondieron. Lo que respecta a la F5, no se detectó efecto mitogénico significativo (tabla No.10).

Determinación de LFR-E tempranas y transformación blastoide
en seis pacientes con desnutrición en tercer grado.

| No. de paciente | LFR-E tempranas | | | Transformación blastoide | |
|-----------------|------------------------|----------------------|---------------------------|--------------------------|----------------------|
| | ^a inicial % | ^b final % | ^c incremento % | ^d CeL F5 | ^e CeL PHA |
| 1 | 23 | 40 | 73 | 0.8 | 1.3 |
| 2 | 40 | 58 | 45 | 0.9 | 1.3 |
| 3 | 34 | 45 | 32 | 1.2 | 3.0 |
| 4 | 30 | 45 | 50 | 2.2 | 0.9 |
| 5 | 40 | 46 | 15 | 0.5 | 1.2 |
| 6 | 29 | 47 | 62 | 1.1 | 3.0 |

- ^a cifra basal que corresponde a la incubación de linfocitos y eritrocitos de carnero.
- ^b cifra final que corresponde a la incubación de linfocitos con 100 µg de F5 y eritrocitos de carnero.
- ^c incremento que corresponde a la diferencia entre la cifra final menos inicial entre cifra inicial por 100.
- ^d coeficiente de estimulación linfoblástica y la fracción 5 (100 µg/ml).
- ^e coeficiente de estimulación linfoblástica y fitohemaglutina (100 µg/ml).

Tabla No.10.- En esta tabla se muestran los resultados obtenidos del estudio de seis pacientes con desnutrición, se determinó la reactividad linfoblástica y LFR-E con la fracción 5.

VI.-DISCUSION.

El extracto obtenido del tejido tímico libre de células (--- fracción 5)(29), tuvo un contenido proteico de 7.67 µg/ml y 2.07 µg/ml de carbohidratos. Lo que nos indica que el extracto tiene una constitución probable de glicoproteína. La actividad biológica de éste extracto es similar a la reportada por Goldstein (9) considerando que su preparación no contenía carbohidratos. La actividad biológica y el contenido proteico de las diferentes fracciones obtenidas durante el proceso de extracción, mostraron que la actividad biológica es evidente en la fracción 5 y el contenido de N-proteico es menor al de las otras fracciones, señalando esto como una característica del proceso de purificación.

La ausencia de actividad biológica en las fracciones I, 2, 3 y 4 la explicamos por las diferencias en los métodos utilizados en la literatura para establecer una misma concentración. En otras palabras, no conocemos con precisión las condiciones estándar de estos métodos, que refieren actividad biológica de las fracciones 3 y 4. Existen claras diferencias en la detección de la actividad biológica, si se emplea el peso seco de las fracciones o el contenido proteico de las mismas así como la curva de referencia calibrada con albúmina o con alguna otra proteína. Por lo que es posible que las fracciones 3 y 4 tengan actividad biológica es por las condiciones experimentales utilizando células obtenidas de médula ósea, en donde la población linfoide es más indiferenciada, 7-

que la obtenida de bazo de ratón y sangre humana periférica (29). La viabilidad de las células de bazo de los ratones -- fué del 90% como promedio a los 60 minutos, esto nos permiti-- tió excluir un factor celular inherente al procedimiento de la técnica de manipulación, que modificara nuestros resultados estableciendo interpretaciones equivocadas de estimula-- ción con la fracción biológicamente activa. Por lo que las - determinaciones con la concentración óptima estimulante de - la fracción 5 esta exenta de un defecto de la viabilidad -- celular. La actividad biológica de la fracción 5 se obtuvo en forma óptima a una concentración de 100 µg en linfocitos de ratones normales, timentomizados; así como de sangre hu-- mana periférica. Estos resultados observados con los LFR-E - de ratones no difiere con los publicados (41); sin embargo, - observamos estimulación de los LFR-E tempranas (tabla No.5), esta sensibilidad de las células a la fracción 5 sugiere un mayor número de células T indiferenciadas en estos individuos. Quizás por las repetidas extracciones de sangre; sin embargo, esto tendrá que confirmarse con otros estudios. El -- efecto de la concentración de fracción 5 a 1000 µg al disminuir en forma significativa los LFR-E tempranas (tabla No.5) y tardías (tabla No.6) de ratones y humanos, puede deberse a la saturación de receptores de membrana para eritrocitos de carnero. Este fenómeno se ha confirmado por otros investigadores, sin que se tenga una clara explicación (42).

Para evidenciar el efecto biológico de la fracción 5, utilizamos linfocitos de bazo incubados previamente con azatio--- prina, sabiendo que la azatioprina es un antimetabolito que

ejerce un efecto inmunosupresor en los LFR-E. Esta acción -- inmunosupresora es mayor al aumentar la concentración de -- azatioprina, por lo que es importante evitar un efecto letal en la célula linfoide, determinando la concentración de azatioprina inhibitoria del 50% de LFR-E (29,41). Nuestros resultados en este sentido, demostraron que la concentración inhibitoria del 50% es a 50 µg de azatioprina, la viabilidad se mantuvo por arriba del 80% (tabla No.7). Además observamos que en el tiempo de incubación de 18 horas el efecto de la azatioprina es de inhibición total y la viabilidad fué -- mayor al 70%. En estas condiciones, los linfocitos incubados con fracción 5 tuvieron un efecto estimulante en las determinaciones de rosetas tempranas y tardías (tabla No.8), en ratones normales y timentomizados estadísticamente significativo ($p < 0.0005$). Por los resultados en donde se describen los coeficientes de estimulación de LFR-E tempranas (tabla No.8), se sugiere una mayor estimulación en los linfocitos de ratones timentomizados, debido a un mayor número de células indiferenciadas sensibles a azatioprina y a la fracción 5. Es importante mencionar, que el menor efecto estimulante de la fracción 5 en LFR-E de sangre humana periférica estimado a través de los coeficientes de estimulación parcial y total, lo que significa que el número de linfocitos T indiferenciados es menor que en los ratones (tabla No.8).

Con el desarrollo de técnicas in vitro más sofisticadas -- para estimar la función de las células T, se ha observado en la timentomía cambios drásticos en la población de células -- linfoides inmunocompetentes, como es la falta de respuesta --

a fitohemaglutinina observada en las células linfoides de -- bazo de ratones timectomizados (43). Estos mismos resultados los confirmamos en nuestro trabajo, observando los coeficientes de estimulación con fitohemaglutinina que son muy pequeños de 0.7 en ratones timectomizados, y de 5.1 en ratones -- normales (tabla No.9). Que interpretamos como una depleción -- de células timo-dependientes en ratones timectomizados. Con -- esta orientación tratamos de medir el efecto mitogénico de -- la fracción 5 en linfocitos de bazo de ratones normales y ti -- mectomizados. Sin demostrarse efecto mitogénico de la fracci -- ón 5 a distintas concentraciones, lo que excluye la posibili -- dad de que tenga efecto estimulante de las células linfoides -- independiente al efecto de maduración; de otra manera, la frac -- ción 5 no comparte mecanismos similares de estimulación mito -- génica al de los fitomitógenos. Por lo tanto no estimula la -- proliferación de nuevas células como un mecanismo más de re -- constitución inmunológica. De los pacientes estudiados, algu -- nos pudieron tener deficiencia de precursores de células T; -- en esta instancia, adicionando fracción 5, podría aumentar -- significativamente los LFR-E (44). Aunque sus LFR-E aumenta -- ron de 23-40% a 40-58% (tabla No.10) luego de la incubación -- con 100 µg de la fracción 5, el sistema no se activo despro -- porcionadamente.

Hay trabajos que no excluyen la posibilidad de combinar -- bioensayos in vitro-in vivo, por ejemplo luego de administrar -- F5 en animales determinar inmunofluorescencia con los LFR-E -- simultáneamente. Además, queda clara la sustitución de la re -- constitución de la inmunocompetencia por medio de una terapia -- con fracción biológicamente activa, a el transplante de timo (34).

VII.- CONCLUSIONES.

- 1.- La fracción 5 obtenida del extracto total de timo bovino mostró tener una actividad biológica similar a la Timosina - reportada por A.L.Goldstein, la cual contiene una concentración de 7.67 µg/ml de proteína y 2.07 µg/ml de carbohidratos.
- 2.- La concentración óptima estimulante de la preparación -- obtenida en LFR-E de ratones timentomizados, normales y sangre humana periférica fué a 100 µg/ml. Siendo ésto, más evidente en los LFR-E tratados con azatioprina ($p < 0.0005$). Estos resultados apoyan la hipótesis de que el efecto estimulante de la formación de rosetas, corresponde a un mayor número de células linfoides indiferenciadas.
- 3.- No se demostró efecto mitogénico de la fracción 5 en los linfocitos de bazo de ratones normales y timentomizados a diferentes concentraciones, por lo que se piensa, que no tiene efecto de proliferación similar a los fitomitógenos.

VIII.-BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Miller, J.F.A.P. y Osoba, D.: Role of the thymus in the -- origin of immunological competence; in Wolstenholme and Knight Ciba Found. Study Group. Nature and Origin of Immunologically Competent Cells. No. 62; 16 (1963).
- 2.- Gregoire, C.; Recherches sur le symbiose lymphoépithéliale au niveau du thymus de mammifère. Archs. Biol., Liège 46; 717 (- 1935).
- 3.- Gregoire, C. y Duchateau, G.: A study on lympho-epithelial symbiosis in thymus. Reactions of the lymphatic tissues to - extract and to implants of epithelial components of thymus.- Archs. Biol., Liège 68; 269 (1956).
- 4.- Comsa, J.: Action of the purified thymic hormone in thy--- mectomized guinea pigs. Am. J. Med. Sci. 250; 79 (1965).
- 5.- Osoba, D. y Miller, J.F.A.P.: Evidence for a humoral thymus factor responsible for the maturation of immunological fac--- culty. Nature, Lond. 199; 653 (1963).
- 6.- Osoba, D.: The effects of thymus and other lymphoid organs enclosed in Millipore chambers on neonatally thymectomized - mice. J. Exp. Med. 122; 633 (1965).
- 7.- Sprent, J. y Miller, J.F.A.P.: Failure of thymosin to recons- titute neonatally thymectomized mice. The Walter and Eliza - Hall Ints. for Med. Research, Ann. Rep., 74 (1970).
- 8.- Davies, A.J.S.: The thymus and the cellular basis of immu- nity. Trans. Rev. 1; 43 (1969).
- 9.- Goldstein, A.L.; Guha, A.; Zats, M.M.; Hardy, M. y White, A.: Pre- paration and characterization of thymic extracts. Ann. N.Y. -- Acad. Sci. 69; 1800 (1972).

- 10.- Trainin, N.: Thymic hormones and the immune response. --
Physiol. Rev. 54; 272 (1974).
- 11.- Holub, M.: Antibody production by lymphocytes after in --
vitro contact with bacterial antigen and transfer to newborn
rabbits. Nature, Lond. 181; 122 (1958).
- 12.- Shelton, E. y Rice, M.E.: Studies on mouse lymphomas. II. --
Behavior of three lymphomas in diffusion chambers in relation
to their invasive capacity in the host. J. Natl. Cancer Inst. 21;
137 (1958).
- 13.- Capalbo, E.E.; Albright, J.F. y Bennett, W.E.: Evaluation of
the diffusion chambers culture technique for study the mor--
phological and functional characteristics of lymphoid cells -
during antibody production. J. Immun. 92; 243 (1964).
- 14.- Hays, E.F.: Growth and morphology of mouse lymphoma cells
in diffusion chambers. Proc. Soc. expl. Biol. Med. 117; 45 (1964).
- 15.- Stutman, O. y Good, R.A.: Thymus Hormones; in Davies and --
Carter Contemporary topics in immunobiology. 2; 299 (1973).
- 16.- Stutman, O.; Yunis, E.J. y Good, R.A.: Carcinogen-induced --
tumors of the thymus. III. Restoration of neonatally thymecto-
mized mice with thymomas in cell impermeable chambers. J. natn.
Cancer Inst. 43; 499 (1969).
- 17.- Law, L.W.; Dunn, T.B.; Trainin, N. y Levey, R.H.: Studies of -
thymic function; in Defendi and Metcalf the thymus, p. 105 (Wis-
tar Inst. Press Philadelphia, 1964).
- 18.- Barclay, T.J.; Weissman, I.L. y Kaplan, H.S.: Discussion of
paper by Law, Dunn, Trainin and Levey; in Defendi and Metcalf
the thymus, p. 117 (Wistar Inst. Press, Philadelphia, 1964).
- 19.- Law, L.W.; Trainin, N.; Levey, R.H. y Barth, W.F.: Humoral thy-

mic factor in mice further evidence. Science, N.Y. 143:1049 (1964).

20.- Stutman, O.; Yunis, E.J. y Good, R.A.; Studies on thymus -- function. I. Cooperative effect of thymic function and lymphohemopoietic cells in restoration of neonatally thymectomized mice. J. Exp. Med. 132:583 (1970).

21.- Dardenne, M.; Papiernik, M.; Bach, J.F. y Stutman, O.; Studies on thymus products. III. Epithelial origin of the thymic hormone. Immunology 27:299 (1974).

22.- Roelants, G.E.; Mayor, K.S.; Hagg, L.B. y Loor, F.; Immature T lineage lymphocytes in athymic mice. Presence of TL, life span and homeostatic regulation. Eur. J. Immunol. 6:75 (1976).

23.- Papernik, M.; Nabarra, B. y Bach, J.F.; In vitro secretion of a humoral factor by human thymic epithelial cells. Clin. Exp. Immunol. 19:281 (1975).

24.- Osoba, D.; Effect of pregnancy on the restoration of --- immunological responses in neonatally thymectomized female mice; in Carter and Davies Contemporary topics in Immunology, 2:293 (1973).

25.- Bach, J.F.; Dardenne, M. y Bach, M.A.; Demonstration of a -- circulating thymic hormone in mouse and in man. Transplant Proc. 5:523 (1973).

26.- August, C.S.; Rosen, F.S. y Kay, H.E.M.; Implantation of --- foetal thymus restoring immunological competence in a patient with aplasia (DiGeorge's Syndrome). Lancet II:1210 (1968).

27.- Cleveland, N.W.; Fogel, B.J. y Hay, H.E.M.; Foetal thymic -- transplant in a case of DiGeorge's syndrome. Lancet II:1211 (1968).

- 28.- Steele, R.W.; Limas, C.; Thurman, G.B. y Bellanti, J.; Familial thymic aplasia. Attempted reconstitution with foetal thymus in a Millipore diffusion chamber. *New Engl. J. Med.* 287:787 (--- 1972).
- 29.- Goldstein, A.L.; Purification and properties of bovine -- thymosin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 249:125 (1975).
- 30.- Bach, J.F.; Evaluation of cells T and thymic serum factors in man using the rosette technique. *Transplant. Rev.* 16:196 (1973).
- 31.- Avrum, Z.; Lynch, J.M.; Transformation antigens on stimulated lymphocytes. *J. Immunol.* 114:717 (1975).
- 32.- Jon, R.S. y Hatfield, S.; Activation of purified human thymus derived (T) cells by mitogens. *J. Immunol.* 116:357 (1976).
- 33.- Bach, J.F.; Bach, M.A.; Dardenne, M. y Pleau, J.M.; The mode - of action of thymic hormones. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 249:33 (1979).
- 34.- Wara, D.W. y Amman, A.J.; Activation of T-cell rosettes -- in immunodeficient patients by thymosin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* -- 249:308 (1975).
- 35.- Bach, J.F. y Carnaud, C.; Thymic Factors. *Prog. Allergy* 21:- 342 (1976).
- 36.- Hartree, E.F.; Determination of Protein. A modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. - *Anal. Biochem.* 48:422 (1972).
- 37.- Dubois, M.; Gilles, K.A. y Smith, F.; Determination of the - carbohydrate. *Anal. Chem.* 28:350 (1956).
- 38.- Weir, D.M.; Handbook of Experimental Immunology. Blackwell Scientific Publications, Second ed. A.3.17 (1973).
- 39.- Boyum, A.; Isolation of mononuclear cell granulocytes --- from human blood. *Scand. Lab. Clin. Invest. supp.* 97:77 (1968).

- 40.- Nowell, C.P.; Phytohemagglutinin; An initiator of mitosis -
in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res.* 20; 462 (--
1960).
- 41.- Each, J.F.; Dardenne, M. y Davies, A.J.S.; Early effect of -
adult thymectomy. *Nature, New Biol.* 231; 110 (1971).
- 42.- Johnston, J.M. y Wilson, D.B.; Origin of immune reactive -
lymphocytes in rats. *Cell Immunol.* 1; 430 (1970).
- 43.- Ikehara, S. y Hamashima, Y.; Immunological restoration of
both thymectomized and athymic nude mice by a thymus factor.
Nature, 258; 335 (1975).