

84  
293



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO  

---

---

FACULTAD DE QUIMICA

ACCION DE TP-1 Y ZINC SOBRE LA RESPUESTA  
DE LOS LINFOCITOS T EN RATONES  
DESGASTADOS

T E S I S  
Que para obtener el Título de  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
p r e s e n t a

HORTENSIA NACHELLI MALPICA LOPEZ



México, D. F.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1994



## **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.

Jurado asignado



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

Presidente Profra. AIDA NAVAS PEREZ

Vocal Profr. SATURNINO DE LEON CHAPA

Secretario Dr. FERNANDO GARCIA-TAMAYO

1er Suplente Profra. PATRICIA ELVIRA BERRON RUIZ

2do. Suplente M. en C. LUIS IGNACIO TERRAZAS VALDES

Sitio donde se desarrolló el Tema:

Laboratorio de Investigación en Inmunología  
del Departamento de Biología,  
Facultad de Química, UNAM.

Asesor del Tema:

Dr. Fernando García-Tamayo

Supervisor Técnico:

M.C. Luis Ignacio Terrazas Valdés

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Fernando García-Tamayo', written over a horizontal line.

Sustentante:

Hortensia Nachelli Malpica López

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Nachelli Malpica L.', written over a horizontal line.

Con todo cariño,

A mi hermosa familia.

A mis maravillosos amigos.

A mis maestros.

## Mi especial agradecimiento

Al Dr. Fernando García-Tamayo por su asesoría en la elaboración de este trabajo.

Al M. en C. Luis Ignacio Terrazas V. por su valiosa ayuda y supervisión en la parte experimental del trabajo.

A mis compañeras de laboratorio.

A Laboratorios Serono de México, S.A. y de manera especial al Q.F.B. Francisco Ruiz-Puente por su generosa donación de la hormona TP-1 y referencias bibliográficas.

A la Dra. Patricia Ostrosky del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, por la donación de reactivos.

Al Dr. Carlos Larralde del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, por permitirnos hacer uso del instrumental de su laboratorio.

Al Dr. Ismael Lares Assef, del Instituto Nacional de Pediatría, por permitirnos el acceso al contador de centelleo del Departamento de Investigación.

## INDICE

CAPITULO 1. INTRODUCCION	1
CAPITULO 2. ANTECEDENTES	3
2.1. Desgaste Experimental	3
2.2. Timo	9
2.2.1. Anatomía del timo	9
2.2.2. Células epiteliales del timo	10
2.2.3. Ontogenia del timo	14
2.2.4. Hormonas del timo	16
2.2.5. Timosinas	18
2.2.6. Timulina	19
2.2.7. Factor tímico humoral	20
2.2.8. Timopoyetina	20
2.2.9. Timoestimulina	20
2.3. Interacción entre zinc e Inmunidad	21
2.4. Interacciones inmuno-neuroendócrinas	25
CAPITULO 3. OBJETIVOS E HIPOTESIS	29
CAPITULO 4. DISEÑO DEL EXPERIMENTO	31
CAPITULO 5. MATERIAL Y METODOS	33

CAPITULO 6. RESULTADOS	38
6.1. Proliferación de los timocitos y linfocitos del bazo de ratones sanos.	38
6.2. Proliferación de los timocitos y linfocitos del bazo de ratones desgastados.	38
6.3. Proliferación de los timocitos y linfocitos del bazo, de ratones sanos y desgastados tratados con TP-1	40
6.4. Proliferación de los timocitos y linfocitos del bazo, de ratones sanos y desgastados tratados con Zn.	43
6.5. Proliferación de los timocitos y linfocitos del bazo, de ratones sanos y desgastados tratados con TP-1 y Zn.	46
6.6. Efecto de los tres diferentes tratamientos sobre la proliferación de timocitos y linfocitos del bazo en ratones desgastados.	49
CAPITULO 7. DISCUSION	51
CAPITULO 8. CONCLUSIONES	58
CAPITULO 9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	61

## CAPITULO 1. INTRODUCCION

---

A pesar de los grandes alcances logrados recientemente en el campo de la Inmunología, gracias al desarrollo de métodos de ingeniería genética y a la utilización de una tecnología avanzada, aún es mucho lo que falta por conocer acerca del origen, desarrollo, regulación y funcionamiento del sistema inmune.

Se conoce que el sistema inmune está constituido por un conjunto heterogéneo de células cuyas actividades representan un medio natural de defensa específica del organismo ante la continua agresión por parte de agentes exógenos (en su mayoría microorganismos causantes de enfermedades infecciosas), así como de agentes endógenos constitucionales o adquiridos (por ejemplo los promotores de enfermedades autoinmunes).

El progreso de la Inmunología ha permitido la aplicación de vacunas y tratamientos inmunoestimulantes o inmunosupresores que han contribuido a solucionar numerosos problemas de salud pública que anteriormente tenían tasas de mortalidad elevadas. Unidas al uso racional de los antibióticos, las aplicaciones médicas de la Inmunología han aumentado la vida media de la población mundial. Actualmente, las personas



inmunodeficientes o inmunosuprimidas tienen expectativas mucho mejores que las de hace varias décadas. Sin embargo, sobrevivir con un compromiso crónico del sistema inmunitario (inmunodeficiencias) o soportando la agresión prolongada por agentes endógenos o exógenos (infecciones, neoplasias, stress, desnutrición, etc.) representa un riesgo y también tiene un precio. Las personas que se encuentran en las condiciones anteriores, tienen una tendencia a desarrollar síndromes debilitantes que se manifiestan por el desmedro progresivo del organismo y que, inevitablemente, terminan con la muerte del individuo en un plazo más o menos corto.

Los experimentos realizados en el Departamento de Biología de la Facultad de Química han permitido desarrollar un modelo de enfermedad desgastante experimental, inducido en ratones jóvenes, los cuales comparten varias de las alteraciones físicas e inmunológicas que tienen las personas con enfermedades primarias que evolucionan hacia el desgaste. El modelo experimental ha sido útil para estudiar los cambios inmunológicos de un organismo desgastado (1) y para investigar los beneficios de varios procedimientos profilácticos o terapéuticos (2). En este trabajo se presentan los resultados obtenidos al estudiar la respuesta proliferativa de los linfocitos del bazo y del timo de animales desgastados experimentalmente que, además, estuvieron sometidos a diferentes tratamientos, con una hormona tímica y sales de zinc.

## CAPITULO 2. ANTECEDENTES.

---

### 2.1. DESGASTE EXPERIMENTAL

En el año 1957, Brent y Billingham (3) observaron que después de la inyección intraperitoneal de células inmunológicamente competentes en ratones recién nacidos o con un sistema inmunitario inmaduro, los animales presentaban una reacción sistémica injerto-contra-huésped ("graft versus host" o GvH). La reacción GvH de los animales recién nacidos se caracterizaba por una considerable atrofia del tejido linfoide propio, la cual se manifestaba como una deficiencia inmunitaria que facilitaba las infecciones recurrentes en la piel y tubo digestivo. Como una consecuencia, los animales presentaban un retraso en su crecimiento y desarrollo, así como un peso corporal significativamente inferior al de sus controles sanos. Por todo esto, la reacción GvH del ratón recién nacido fue denominada enfermedad del desmedro o encanijamiento ("runting disease"). El término fue aplicado porque los ratones tenían la apariencia de animales enanos.

Cinco años después de los experimentos de Billingham, en 1962, Miller (4) pudo provocar la aparición de un síndrome de encanijamiento, similar al de la reacción GVH, mediante la timectomía de ratones recién nacidos. Los animales timectomizados también presentaban retraso en el crecimiento, debilidad general y un peso corporal inferior al de sus controles, todo ello asociado a infecciones recurrentes que causaban diarreas y lesiones en la piel. Una vez instalado este cuadro clínico, poco a poco se agravaba la condición física de los ratones los cuales terminaban por desarrollar una caquexia y morían antes de los tres o cuatro meses de edad. En estos casos, la inmunodeficiencia de los ratones estaba causada por la falta del timo y se expresaba por la atrofia de los órganos linfoides secundarios. Los experimentos de Miller permitieron establecer una relación más firme entre el encanijamiento de los animales y la falta o la deficiencia de la glándula timo.

Como el deterioro físico progresivo, que podía llegar a la caquexia, era el síntoma más evidente de los animales recién nacidos a los cuales se les inducían las dos enfermedades anteriores, éstas fueron consideradas ejemplos de enfermedades desgastantes ("wasting diseases") provocadas experimentalmente. Algunos autores (5) propusieron que el uso del vocablo encanijamiento debía estar limitado a los animales recién nacidos (porque en ellos se presentaba un retraso del crecimiento) y que el término desgaste solo debía ser utilizado para describir la emaciación o el desmedro de los animales adultos que ya no modificaban su desarrollo. Sin embargo, otros autores continuaron utilizando los vocablos desgaste y encanijamiento como sinónimos.

En 1964, Ekstedt (6) encontró otra manera de inducir el síndrome del encanijamiento, nuevamente en ratones recién nacidos, mediante la inyección intraperitoneal de bacterias inactivadas o extractos de las mismas. Los ratones que recibían este tratamiento presentaban hiperirritabilidad, anorexia, pérdida de peso, debilidad, involución tímica, depresión de la síntesis de anticuerpos y una marcada disminución en el crecimiento. Sin embargo, a diferencia de los modelos experimentales anteriores, en este caso Ekstedt pudo observar que, una vez terminado el tratamiento inductor del síndrome del encanijamiento, los ratones recuperaban paulatinamente la condición física e inmunológica de los animales sanos. Los mismos resultados se obtuvieron después de inyectar cortisona en animales jóvenes (7).

En 1966, Flanagan (8) describió un ratón mutante atímico, que tenía una sobrevida inferior a las 25 semanas y que fue denominado desnudo por su falta de pelo. Poco tiempo después, Pantelouris y otros autores (9) observaron que cuando los ratones desnudos presentaban infecciones virales o bacterianas, éstos desarrollaban rápidamente un síndrome desgastante. Paterson (10) y Jutila (11) propusieron entonces que las endotoxinas de las bacterias Gram-negativas podían ser las responsables de los principales síntomas de las enfermedades desgastantes.

En 1967, Pierpaoli y Sorkin (12) realizaron varios estudios sobre las relaciones entre el timo y la hipófisis, a propósito de una cepa (Snell Bagg) de ratones enanos con hipopituitarismo congénito, en los cuales el desarrollo de la enfermedad desgastante era una consecuencia, directa o indirecta, de una hipotrofia tímica. Otros trabajos (13) realizados

durante esa década demostraron que la eliminación o la reducción de algunos elementos traza de la dieta también provocan un estado de inanición comparable al desgaste.

Más adelante, en 1970, Asanuma, Goldstein y White (14) lograron demostrar que la aparición del síndrome del desgaste podía ser prevenida mediante la administración intraperitoneal de la hormona timosina. En esa fecha ya era conocido que las inmunodeficiencias facilitaban las infecciones recurrentes y que éstas tenían una participación importante en el desarrollo del desgaste. Diferentes autores habían demostrado que, la administración de algunos antibióticos (15) o el mantener a los animales en condiciones libres de gérmenes (16), impedían la aparición del síndrome. Trabajos más recientes (17) han revelado que la caquexia de los animales inyectados con TNF $\alpha$ /caquectina puede ser impedida mediante la inducción de la síntesis de anticuerpos anti-TNF y que las inyecciones de los mismos inhiben la aparición del shock durante una bacteremia letal (18). Cuando los ratones sanos son inoculados con células tumorales a las cuales se les ha transfectado el gene humano que codifica para la síntesis de la caquectina, los ratones presentan un desgaste progresivo y mueren más rápidamente que los ratones inoculados con las mismas células tumorales sin transfectar que no producen TNF  $\alpha$  (19). Asimismo, se ha observado que la suplementación de zinc a la dieta también evita la emaciación de los animales que presentan una deficiencia de este elemento traza (20).

Actualmente se conocen diversos métodos para inducir el síndrome del desgaste en animales de laboratorio. En todos ellos es necesario provocar un compromiso inmunológico que facilite la diseminación de enterobacterias comensales y promueva la aparición de infecciones recurrentes. Casi todos

los animales desgastados experimentalmente se caracterizan por presentar hipoplasia tímica causada por el procedimiento inductor. Los mismos resultados se obtienen mediante la extirpación de la misma glándula. Sin embargo, según la cepa y la edad de los animales utilizados, el procedimiento de inducción puede provocar diversos grados de lesión en la glándula tímica y diferentes formas de evolución de la enfermedad. Algunos síndromes desgastantes son definitivos y causan la muerte del animal a corto plazo mientras que otros sólo son transitorios. Asimismo, el compromiso de la respuesta inmunitaria, humoral y/o celular, puede ser diferente cuando se estudia la inmunocompetencia de los linfocitos de animales que han sido desgastados utilizando distintos procedimientos.

Algunas de las enfermedades desgastantes provocadas experimentalmente en animales de laboratorio semejan el cuadro clínico que exhiben algunas personas que presentan una complicación de varias enfermedades primarias o la etapa terminal de una infección crónica. En estos casos, las similitudes han permitido el uso de los modelos experimentales para probar la efectividad de algunas medidas profilácticas y/o terapéuticas, así como para estudiar los diversos mecanismos relacionados con la lesión de la glándula timo y el desgaste progresivo del organismo animal.

Ahora bien, es necesario tener en cuenta que el deterioro inmunológico de los animales desgastados puede ser distinto según el procedimiento inductivo utilizado. La caquexia del animal desgastado sólo permite establecer similitudes entre la pérdida de peso de éste y la del que ha sido desnutrido por una reducción en la ingesta de proteínas o calorías. Sin embargo, existen diferencias contrastantes entre la competencia inmunológica de los animales desnutridos por una ingesta

deficiente de proteínas y la de los animales que llegan a tener el mismo grado de desnutrición a causa de un desgaste experimental (21).

De acuerdo a los estudios inmunológicos realizados en los últimos años en nuestro laboratorio, el síndrome del desgaste en ratones recién nacidos inyectados con estafilococos muertos se caracteriza por una disminución grave de la producción de anticuerpos, la cual sólo se recupera aproximadamente 15 días después de terminar la serie de inyecciones con bacterias muertas. En ese momento, los animales exhiben una etapa de recuperación que eleva significativamente la síntesis de anticuerpos (22). Además, los ratones desgastados muestran una pérdida de la tolerancia inmunológica hacia antígenos administrados oralmente (23) y una disminución de su capacidad para desarrollar reacciones de hipersensibilidad de tipo tardío a pesar de que sus linfocitos esplénicos pueden inducir reacciones GvH de la misma intensidad que los linfocitos de animales sanos (24). Otros resultados han revelado que, activadas en condiciones basales, las células esplénicas de los animales desgastados presentan una mayor actividad enzimática mitocondrial y una mayor capacidad de reducir sales de tetrazolium (25). Asimismo, los ratones desgastados presentan una mayor permeabilidad en el tubo digestivo en relación a sus controles sanos (26), una mayor producción de TNF por macrófagos peritoneales estimulados *in vitro* con bacterias muertas (27), una disminución en el contenido de zinc en la sangre y el hígado y, en cambio, una alta concentración de zinc en la glándula timo (24).

## 2.2. TIMO.

Los órganos linfáticos o linfoides se clasifican en centrales o primarios y periféricos o secundarios. Los órganos linfáticos centrales son los sitios de producción autónoma de nuevos linfocitos, de modo que entre ellos se incluyen la médula ósea y el timo, mientras que los periféricos, como los ganglios linfáticos, el bazo, las amígdalas y otras estructuras linfoides propias de las mucosas y la piel, son los sitios donde se infiltran los linfocitos que se forman y/o maduran en la médula y el timo.

### 2.2.1. Anatomía del timo.

El timo es un órgano linfático primario que tiene una forma triangular y está bilobulado. La mayor parte del timo se encuentra situada inmediatamente atrás de la porción superior del esternón, donde se observa como una masa aplanada de color gris rosado.

Histológicamente, la glándula timo se encuentra multilobulada y se divide en dos zonas bien definidas que se denominan la corteza y la médula. La cápsula constituye una envoltura de tejido conectivo que cubre la parte externa. La corteza de cada lóbulación está dividida en superficial y profunda, contiene un solo tipo de células epiteliales, macrófagos y numerosos timocitos. En contraste, la médula se compone de múltiples tipos de células epiteliales, aisladas o conformando arreglos específicos, así como de macrófagos, células interdigitantes, y un número menor de linfocitos. Cabe mencionar que es en la unión corticomédular donde se encuentra la mayor población de células interdigitantes.



Estudios por microscopía electrónica (28) han demostrado que el timo del ratón está constituido, además de linfocitos, granulocitos y mastocitos, por un componente celular epitelial y otro no epitelial.

### 2.2.2. Células epiteliales del timo.

El componente epitelial del timo, estudiado principalmente en ratones, está formado por diferentes tipos de células donde se encuentran atrapados los linfocitos. Las tres clases de células del componente epitelial se identifican con los números romanos I, II y III de acuerdo a Nabarra (29), aunque recientemente otros autores han elaborado con ayuda de anticuerpos monoclonales una nueva clasificación fenotípica que incluye seis clases de epitelio (30).

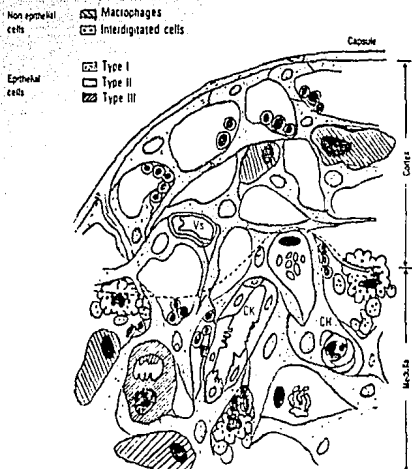


Figura 1. Esquema de la células epiteliales y no epiteliales del timo (28).

Las células tipo I están presentes en la corteza y la médula, mientras que las células tipo II y III sólo están presentes en la médula de la glándula. Además, existen otras células que se reagrupan formando dos tipos de asociaciones que se encuentran también en la médula. Estas asociaciones dan lugar a la formación de estructuras conocidas como cavidades quísticas y corpúsculos de Hassal.

Por su parte, el componente no epitelial de la glándula timo está constituido principalmente por dos tipos de células que están profundamente relacionadas con el componente epitelial. Estas son los macrófagos y las células interdigitantes.

A continuación se describen brevemente algunas de las características estructurales y funcionales de las células de los componentes epitelial y no epitelial del timo.

Las células epiteliales tipo I se definen por dos características específicas : la presencia de tonofilamentos en su citoplasma y la existencia de desmosomas entre sus células. Están localizadas en las zonas medular y cortical del timo y son el único tipo de célula epitelial existente en esta última zona. Tienen una forma elongada, su núcleo es largo y ovalado, y la cromatina que contienen está distribuida en una forma dispersa. El citoplasma posee una matriz fibrilar con tonofilamentos, varios organelos y vacuolas con gránulos densos en las que se ha demostrado la presencia de zinc. Es importante mencionar que algunos autores (29) han observado que el número y tamaño de las vacuolas se incrementa al administrar cortisona y en las personas o animales de edad avanzada. Los

anticuerpos policlonales anti-timulina se unen preferentemente a este tipo de vacuolas, por lo que se ha propuesto que ellas podrían constituir una forma de gránulos de secreción de las hormonas tímicas.

Las células epiteliales tipo II se encuentran localizadas solamente en la médula del timo. Los estudios realizados en ratones revelan que tienen una forma globular u ovalada y son más voluminosas que las del tipo I. Sus núcleos son claros y contienen cromatina. Su citoplasma es moderadamente denso y contiene tonofilamentos que unen los desmosomas. Como característica particular, las células tipo II contienen en su citoplasma una red de alvéolos que forman un laberinto vacuolar donde es frecuente encontrar virus que infectan a los ratones. Se piensa que estas células tienen una actividad biológica importante en los fenómenos de secreción o que constituyen un sistema de transporte para los productos de secreción.

Las células epiteliales tipo III se encuentran en la médula tímica y son ovaladas y extendidas. Su núcleo es excéntrico y su citoplasma es ligeramente más denso que el de las células descritas anteriormente conteniendo varias mitocondrias pequeñas. La característica más notable de estas células es una cavidad larga y/o redonda que ocupa una gran parte del citoplasma. El lumen de esta cavidad está bordeado por cilios o microvellosidades. Respecto a su función algunos autores consideran que, al igual que las vacuolas de otras células epiteliales, están involucradas en la secreción de factores tímicos. Sin embargo, se ha comprobado que las células tipo III producen una secreción glicoprotéica sulfatada la cual no concuerda con la naturaleza de las hormonas tímicas que tienen una naturaleza química polipeptídica.

Como se mencionó anteriormente, las células epiteliales pueden unirse con otro tipo de células para formar estructuras específicas. Estas asociaciones entre células pueden formar cavidades quísticas, que son más o menos elongadas y ramificadas y se encuentran rodeadas de células. Además, las asociaciones celulares pueden formar estructuras redondas, conocidas como corpúsculos de Hassal, donde las células se disponen en una forma concéntrica. Ambos tipos de asociación dan lugar a la formación de estructuras que constituyen parte de la médula tímica. Como se han observado linfocitos circulando alrededor de las cavidades quísticas, se piensa que éstas podrían tener como función indicarle al linfocito una trayectoria a través de las dos zonas del timo durante el proceso de diferenciación. Respecto a los corpúsculos de Hassal algunos autores piensan que intervienen en la regulación de la proliferación celular y la lisis de timocitos y de otras células del timo.

La microscopía electrónica también ha demostrado la existencia de un componente no epitelial en el timo de ratones. En los animales jóvenes se han observado dos tipos de células que están muy relacionadas con las células epiteliales. Las primeras son los macrófagos, que se encuentran en la corteza y en la médula del timo. Las segundas son las células interdigitantes, que se encuentran principalmente en la unión corticomedular y en la médula de la glándula. Ambos tipos de células, en conjunto con las células epiteliales tímicas, constituyen la red donde quedan atrapados los linfocitos. Los macrófagos poseen funciones fagocíticas y tienen la función de eliminar los restos de células muertas. Se caracterizan porque su citoplasma contiene lisosomas y grandes fagolisosomas, en donde se pueden identificar linfocitos que han sido fagocitados y que tienen diferentes etapas de lisis. Por otra parte las

células interdigitantes tienen como rasgo particular que su citoplasma se prolonga en forma de pseudópodos, lo cual permite que aumente su área de contacto con los linfocitos cercanos. Además al igual que los linfocitos B, expresan sobre su membrana el antígeno B7 que es el ligando de la molécula CD28, la cual está presente en la membrana de los timocitos más inmaduros. Actualmente se cree que las células interdigitantes llevan a cabo diversas funciones que anteriormente fueron atribuidas a los macrófagos. En resumen, se ha propuesto que tienen la capacidad de presentar antígenos, producir citocinas, secretar prostaglandinas y, por lo tanto, contribuir a la selección de los linfocitos T.

### 2.2.3. Ontogenia del timo.

La relación entre el tamaño del timo y el del resto del cuerpo alcanza su valor máximo al nacimiento. Posteriormente el timo continúa aumentando de tamaño, aunque disminuye su relación con el peso del cuerpo. A partir del inicio de la pubertad, el timo presenta una involución y comienza a disminuir gradualmente su tamaño con el paso de los años. No obstante, la glándula continúa activa y puede desarrollar sus funciones inmunológicas con un nivel de efectividad que permite conservar la inmunidad de los adultos y de las personas ancianas.

En las últimas décadas ha aumentado considerablemente nuestro conocimiento sobre las funciones del timo para controlar el desarrollo y la maduración del sistema inmune, particularmente de los linfocitos T. La generación de células T inmunocompetentes requiere la influencia de microambientes tímicos intactos en donde ocurren numerosas interacciones

celulares, las cuales pueden darse por contacto celular directo o por la producción y difusión de factores solubles que tienen una acción local. Actualmente se acepta que tanto las células epiteliales como las no epiteliales del timo, proveen "señales" que inducen la maduración de las células T en desarrollo o que dan lugar a la eliminación de aquellas que están programadas en una forma autorreactiva o aberrante. Se ha comprobado que la diferenciación de células T está dirigida hacia la generación de linfocitos T que tengan un receptor (TCR) apropiado para reconocer antígenos (31). De este modo, en el timo sólo son seleccionadas aquellas células T cuyo receptor es capaz de reconocer, con la afinidad adecuada, péptidos extraños en el contexto de moléculas MHC propias (selección positiva). Asimismo, en este órgano son eliminadas aquellas células T cuyo receptor es capaz de reconocer péptidos propios ligados al MHC (selección negativa).

La primera etapa de la ontogenia de las células T se inicia con la migración hacia el timo de las células precursoras (pre-T) derivadas de la médula ósea. Las células epiteliales de la corteza y médula secretan la hormona timotaxina que atrae a las células precursoras propiciando que éstas entren por la corteza tímica primero y posteriormente pasen a la unión corticomedular y la médula. Durante ese trayecto, los linfocitos pre-T tienen contacto con diferentes microambientes tímicos que están caracterizados por contener células que pueden presentar antígenos o que liberan mediadores o factores que influyen en el curso de la maduración de los linfocitos T.

Es en esta segunda etapa de la ontogenia cuando los timocitos doble-negativos (CD4<sup>(-)</sup> y CD8<sup>(-)</sup>), proliferan y dan lugar primero a células

CD8<sup>(+)</sup>, y después, a linfocitos CD4<sup>(+)</sup> y CD8<sup>(+)</sup> (células doble-positivas), que tienen un grado más avanzado de maduración. Más adelante, estas células se multiplican y terminan por generar, en la médula del timo, los linfocitos T que tienen solamente uno u otro de estos dos marcadores.

#### 2.2.4. Hormonas del timo.

Maximow (32) fue uno de los primeros en observar que, desde un punto de vista histológico, existe una interacción íntima entre los timocitos y las células epiteliales del timo. Él propuso que los elementos epiteliales parecían atraer a las células linfoides para estimular su proliferación cerca del ambiente tímico. Posteriormente, Comsa (33) observó alteraciones en el tejido endócrino y linfóide de animales sin timo y encontró que eran reversibles al administrar extractos tímicos.

Actualmente, las observaciones y los hallazgos obtenidos en las últimas décadas sugieren que el timo pertenece a la familia de las glándulas endócrinas. Igualmente se acepta que el timo, una glándula principal de la inmunidad, ejerce sus funciones biológicas a través de, por lo menos, dos mecanismos: 1) Proporcionando un microambiente en el cual maduran y se diferencian las células pre-T, que provienen de la médula ósea; y 2) secretando varias hormonas polipeptídicas que están involucradas en la inducción de la diferenciación, la maduración y la selección de las células T (34), en la modulación de la respuesta inmunitaria de las mismas (35), así como en la regulación de la síntesis de algunas hormonas hipofisiarias (36).

En los últimos 20 años se han obtenido varios extractos biológicamente activos y factores tímicos, cuyas actividades biológicas han sido estudiadas *in vivo* e *in vitro*. Estas investigaciones han demostrado que las hormonas tímicas tienen como actividad fundamental la proliferación y la maduración de los linfocitos T, así como la regulación de la actividad funcional de las células T efectoras (37).

Las alteraciones en los niveles de las hormonas tímicas en el suero, tanto en animales como en humanos, se correlacionan con las alteraciones de la reactividad inmunitaria en varias enfermedades, principalmente en las inmunodeficiencias congénitas y adquiridas, en las enfermedades autoinmunitarias, en el envejecimiento y en algunos tipos de neoplasia. Por esta razón se ha recurrido a la inmunoterapia con diferentes productos del timo que han sido administrados a numerosos pacientes. A continuación se mencionan los productos obtenidos del timo que han sido más estudiados.

TABLA I. Principales hormonas del timo.

FACTOR TIMICO	PM (daltones)	Fuente	Mecanismo	
			Origen	de acción
1. Timosina (TF-5)	12600	Timo	+	cGMP
2. Timosin Alfa <sub>1</sub>	3107	Timo	+	cGMP
3. Timulina (FTS-Zn)	857	Suero	+	?
4. Factor tímico humoral (THF)	3220	Timo	-	cAMP
5. Timopoyetina (TP-5)	5662	Timo	+	cGMP
6. Timoestimulina (TP-1)	12000	Timo	?	?



Además de los anteriores, existen varios otros productos tímicos que en la actualidad se encuentran en estudio. Entre ellos se pueden citar la timopentina (fracción obtenida de la timopoyetina), el timolip (extracto lipídico bovino) y el thymex-L (extracto protéico). Se ha comprobado que estos factores también tienen la propiedad de aumentar la respuesta inmune en animales inmunosuprimidos (38).

#### 2.2.5. Timosinas.

Las timosinas pertenecen a una familia de péptidos con función hormonal, y son producidas por células epiteliales del timo de bovinos. Todas ellas son importantes en el mantenimiento y el funcionamiento del sistema inmune. Estos péptidos tienen la capacidad de regular las actividades biológicas de varias subpoblaciones de linfocitos T, incluyendo a los ayudadores y supresores. Algunas de sus actividades hormonales influyen directamente sobre los linfocitos, mientras que otras actúan directamente sobre el sistema nervioso central.

Se ha observado que la fracción 5 de la timosina, un extracto parcialmente purificado del timo bovino, influye sobre la producción de IL-2, IFN, CSF, MIF y, a nivel de la pituitaria, estimula *in vitro* la liberación de ACTH, Prl y GH. Asimismo, se ha observado que la timosina  $\alpha$ -1, el primer péptido aislado a partir de la fracción 5 de la timosina, estimula la producción de IFN y MIF por los linfocitos y, a nivel de hipotálamo y pituitaria, estimula la liberación de ACTH, Prl, TSH y LH (36).

## 2.2.6. Timulina .

Respecto a la timulina se ha demostrado que es biológicamente activa cuando está acoplada al zinc. Estudios por resonancia magnética nuclear indican que existen dos formas conformacionales de la hormona. La primera carece de zinc y es biológicamente inactiva, la segunda, se obtiene después de unir el zinc a un sitio específico, lo cual cambia su conformación tridimensional y la torna activa. Aún se desconoce el lugar donde se lleva a cabo el acoplamiento del factor tímico con el elemento traza.

El uso terapéutico de la hormona en personas inmunodeficientes ha sido exitoso (39). Diferentes trabajos han revelado que la timulina tiene la capacidad de unirse a receptores de alta afinidad, de inducir la expresión de los marcadores de las células T y que, además, estimula el buen funcionamiento de las mismas para llevar a cabo la citotoxicidad alogénica, la función supresora de los linfocitos T y la producción de IL-2 (40).

Por otra parte, se ha observado que la timulina también participa en las interacciones bidireccionales que existen entre los sistemas inmune y neuroendócrino. Varios experimentos han demostrado, *In vitro* e *In vivo*, que la secreción de timulina así como la proliferación de las células epiteliales del timo pueden ser estimuladas por la hormona prolactina de la hipófisis. También se ha observado que, a ciertas dosis, los esteroides sexuales estimulan la producción de la hormona tímica *in vitro* (41).

#### 2.2.7. Factor tímico humoral.

Este factor es un octapéptido que tiene efecto en la producción de IL-2, CSF, IFN, y MIF. Asimismo se ha observado que tiene la capacidad de contrarrestar el daño ocasionado, en células epiteliales corticales tímicas, por la administración experimental de dosis elevadas de cortisona (42).

#### 2.2.8. Timopoyetina (Tpo).

La Tpo es un péptido de 48 aminoácidos cuyo sitio activo está formado por cinco aminoácidos. Aún se desconoce su influencia directa sobre el sistema inmune. Sin embargo, se ha demostrado que este factor se une específicamente al receptor para acetilcolina causando una interrupción en la transmisión de las señales neuromusculares (43).

#### 2.2.9. Timoestimulina (TP-1).

TP-1 es una preparación de timo bovino que corresponde a una mezcla de polipéptidos termoestables, que tienen pesos moleculares inferiores a 12 kDa. Este compuesto es capaz de inducir la expresión de los marcadores de las células T y estimula la proliferación y las funciones efectoras de las mismas. TP-1 también estimula la producción de IFN, CSF, IL-2 y MIF. Algunos autores señalan que, como un tratamiento de apoyo, tiene efectos benéficos para los pacientes con cáncer ya que disminuye la incidencia de efectos colaterales causados por la quimioterapia (44). TP-1 también ha sido administrada con éxito en niños con inmunodeficiencias primarias que tienen el timo hipoplásico (45). Otros estudios *in vitro* han revelado que la hormona no incrementa los niveles de cAMP en timocitos y linfocitos (46). En términos generales, TP-1 se utiliza regularmente en el

tratamiento de trastornos inmunitarios primarios o secundarios, que están causados por un déficit numérico o funcional de los linfocitos T.

### 3. INTERACCION ENTRE ZINC E INMUNIDAD.

Desde hace varios años se conoce la importancia que tienen el zinc y otros nutrientes en el desarrollo y mantenimiento del sistema inmunológico. Sin embargo, fue necesario realizar varios estudios para comprobar el papel esencial de este elemento traza en la respuesta inmune. Ya con anterioridad se había establecido una relación entre la deficiencia de zinc y la patogénesis de ciertas enfermedades tales como anemia falciforme, alcoholismo, varias enfermedades gastrointestinales, quemaduras y acrodermatitis enteropática. También se había informado la existencia de niveles reducidos de zinc en personas con infecciones agudas, en mujeres embarazadas y en pacientes en estado post-operativo. La linfocitopenia, la respuesta anérgica a la sensibilización de la piel y las infecciones recurrentes manifestadas por personas con una ingesta de zinc deficiente, fueron las manifestaciones que principalmente hicieron pensar que la deficiencia de este elemento traza compromete las principales funciones del sistema inmune.

Hasta el momento se ha demostrado que, tanto en humanos como en animales, la deficiencia de zinc tiene consecuencias graves sobre los mecanismos defensivos de los vertebrados. La deficiencia de zinc ha sido asociada a una alta susceptibilidad a enfermedades infecciosas y anomalías en la inmunidad humoral y celular. Asimismo se ha observado

que la mayoría de estas manifestaciones desaparecen al administrar el elemento traça como un suplemento dietético.

Actualmente se continúan los estudios para conocer más detalladamente el mecanismo o mecanismos de acción del zinc sobre los órganos y las células del sistema inmune. Entre las últimas investigaciones realizadas en ratones, se pueden mencionar las que han comprobado que el estrés producido por una dieta deficiente en zinc (47), es comparable, en magnitud, al causado por una dieta deficiente en proteínas, biotina, carbohidratos, etc., o bien al inducido experimentalmente mediante inyecciones de LPS. Bajo estas condiciones de estrés, los ratones presentan una atrofia tímica que compromete particularmente la corteza de la glándula. Por otra parte, algunos autores (48) han demostrado que la deficiencia de zinc en el modelo murino está asociada a un aumento en la producción de corticosteroides, que tienen una actividad inmunosupresora. En los animales con una deficiencia de zinc también se ha comprobado una reducción en el número absoluto de linfocitos y fagocitos mononucleares, acompañada por una respuesta disminuida de los linfocitos T ayudadores, los linfocitos T citotóxicos y las células NK, así como una depresión de las reacciones cutáneas de hipersensibilidad retardada (DTH) ante la estimulación antigénica.

Muchos de los resultados obtenidos hasta ahora han permitido comprobar que el zinc tiene funciones específicas sobre el sistema inmune. Un ejemplo es el caso de la actividad biológica del zinc como cofactor de algunas hormonas tímicas. Datos recientes han demostrado que la tímulina, una hormona tímica dependiente de zinc que se une a receptores de alta afinidad e induce la expresión de los marcadores de las células T, también

estimula las funciones citotóxicas y supresoras de estas mismas células y la producción de interleucinas. La deficiencia de este elemento causa una disminución en la actividad de la hormona timulina, así como una reducción de los niveles normales de timopoyetina y de factor sérico tímico (49). También se conoce que el zinc es un importante cofactor para una gran cantidad de metaloenzimas, como algunas aldolasas, deshidrogenasas, proteasas, transcriptasas y polimerasas (50).

Los estudios *in vitro* han demostrado que la adición de concentraciones definidas de sales de zinc a sistemas de cultivo, pueden dar lugar a la activación policlonal de linfocitos T de humano y por lo tanto se ha considerado al zinc como un mitógeno inespecífico. Asimismo se ha observado que el zinc es importante en la activación de linfocitos T cuando éstos son estimulados con PHA y Con-A (50). Sin embargo, algunos autores han informado que las concentraciones altas del elemento traza en el medio de cultivo pueden provocar la inhibición de la respuesta proliferativa de células T que son estimuladas con mitógenos (51). Es importante señalar que los estudios *in vitro* arriba mencionados, se han llevado a cabo con linfocitos T humanos, ya que trabajos realizados con células murinas no han dado resultados consistentes (52).

A pesar de las investigaciones realizadas, todavía no está claro el mecanismo mediante el cual la deficiencia de zinc afecta al sistema inmune y particularmente la función de las células T. En la literatura consultada se han encontrado varias hipótesis que se mencionan a continuación. Algunos autores (53) han demostrado que la deficiencia de zinc disminuye la capacidad de los linfocitos T para producir IL-2. Se cree posible que el zinc también está involucrado en la proliferación de

los linfocitos, modulando la actividad de la RNA- o timidina-sintetasa y de la proteína cinasa C. Los autores que han comprobado que el zinc estimula los fagocitos mononucleares y aumenta la producción y la secreción de IL-1 y TNF  $\alpha$ , que son estimuladores de linfocitos, consideran posible que, por estas razones, la deficiencia del elemento traza disminuya la calidad de la respuesta inmune (54). Según otros, la elevación de los niveles de corticosteroides causados por deficiencia de zinc es la verdadera causa de la inmunosupresión del sistema (47). También han sido involucrados los trastornos en el tránsito de linfocitos (el cual es un proceso que está influido por proteínas que unen metales) y la integridad de la membrana (que está alterada por la deficiencia de zinc) (55). Estas dos circunstancias pueden provocar una depresión de la respuesta de los linfocitos. La especificidad de la actividad biológica del zinc ante las células T sugiere que, tal vez, el elemento traza es necesario en los procesos de diferenciación, probablemente a través de su unión a las hormonas tímica dependientes de zinc.

Aunque el zinc ha sido considerado como no tóxico para el organismo, de todos modos si es ingerido en grandes cantidades se pueden presentar síntomas de intoxicación tales como náusea, vómito, dolor epigástrico, letargia, y fatiga. Existe evidencia que sugiere que la suplementación con zinc puede tener consecuencias adversas e inclusive causar alteraciones en el sistema inmune. Lo anterior se observó cuando al tratar a individuos sanos con 300 mg de zinc por día durante 6 semanas, se registró una disminución de los índices de la función inmune tales como la estimulación de linfocitos, migración quimiotáctica y fagocitosis de bacterias. Sin embargo, cantidades inferiores de Zn (220 mg de zinc por día, durante 1 mes) administradas a una población de individuos de edad

avanzada, tuvieron el efecto contrario en la función inmune. Los beneficios obtenidos en este caso fueron un aumento en la respuesta humoral y celular, así como un incremento en el número de linfocitos circulantes. Resultados similares han sido observados en niños desnutridos a los cuales se les administró zinc por vía oral. Algunos autores explican lo anterior argumentando que, aparentemente, en las personas sanas las cantidades excesivas de zinc interfieren con la asimilación de otros nutrientes tales como el cobre y hierro debido a un fenómeno de competencia. Es posible que sólo en los casos en los que exista una deficiencia de zinc (las personas ancianas, los desnutridos, etc) la suplementación de la dieta con zinc de lugar a efectos benéficos en el organismo.

Por otra parte, estudios recientes revelan que algunas enfermedades experimentales, como el síndrome del desgaste inducido por la administración de estafilococos muertos, provocan diferencias inversamente proporcionales en la captación de  $^{65}\text{Zn}$  por diversos tejidos linfoides como el timo y el bazo. Los resultados de estos últimos trabajos (56) muestran que el timo del animal desgastado aumenta progresivamente la captación de este elemento traza en las 120 horas siguientes a su administración intraperitoneal, mientras que en el bazo del mismo animal sucede lo contrario. La administración de la hormona TP-1 revierte estos resultados.

#### 4. INTERACCIONES INMUNO-NEUROENDOCRINAS

Las relaciones que habían sido propuestas entre los sistemas inmune y neuroendócrino se pudieron demostrar claramente después del descubrimiento de receptores para neuropéptidos sobre la membrana de los



linfocitos. Los estudios realizados hasta ahora sugieren que el sistema nervioso central está involucrado en la respuesta inmune.

Se ha observado que alteraciones espontáneas o inducidas en el sistema neuroendócrino pueden causar modificaciones funcionales en la reactividad inmune (57). Las evidencias demuestran que la administración experimental de ciertas dosis de las hormonas producidas por la pituitaria, tales como la hormona del crecimiento y la prolactina, dan lugar a la liberación de timulina por células epiteliales tímicas, y al crecimiento de la glándula timo aumentando la respuesta inmune dependiente de linfocitos T (58). También se ha visto que los andrógenos y estrógenos regulan positivamente la proliferación de linfoblastos tímicos aunque todavía no se ha demostrado si su acción es directa o no, ya que se han identificado receptores para hormonas sexuales en el citosol de células epiteliales tímicas pero no en pretimocitos. Por otra parte se ha observado que al aumentar las dosis de las mismas hormonas sexuales o administrando glucocorticoides, es posible inducir la involución de la glándula timo.

Por otra parte, se sabe que el timo, el bazo, los ganglios linfáticos y otros órganos linfoides periféricos, están innervados por fibras nerviosas colinérgicas y adrenérgicas y son estimulados por la acetilcolina y la adrenalina respectivamente. Se ha comprobado que los linfocitos T tienen receptores para estos y otros neurotransmisores donde dependiendo del tipo de receptor estimulado, aumenta o disminuye la proliferación linfocítica. A continuación se citan algunos de los receptores para neurotransmisores que han sido encontrados en linfocitos principalmente (59).

TABLA II. Receptores para neurotransmisores.

RECEPTOR	CELULAS QUE LO CONTIENEN
ACTH	ESPLENOCITOS MURINOS
BETA-ENDORFINA	CELULAS LINFOBLASTOIDES
ENCEFALINA	ESPLENOCITOS MURINOS
VIP	LINFOCITOS
GH	LINFOCITOS
SUSTANCIA P	CELULAS LINFOBLASTOIDES
INSULINA	LINFOCITOS

Por otro lado, el sistema neuroendócrino parece actuar no solamente como un modulador del sistema inmune, sino también como blanco de las señales producidas por éste. Ejemplos de tales interacciones son las alteraciones que pueden ser inducidas en el eje hipotalámico-hipofisiario, ya sea mediante la extracción de órganos linfoides importantes tales como el timo, o por la presencia de citocinas obtenidas por estimulación antigénica durante el curso de la respuesta inmune (60).

Otros resultados han demostrado la síntesis local de neuropéptidos tales como vasopresina y oxitocina en tejido tímico (61). Asimismo se ha observado la producción de hormona del crecimiento y prolactina a nivel de RNA por células linfoides activadas y un incremento en la liberación de ésta última en la pituitaria por la acción de hormonas tímicas (62). Este nuevo concepto, en favor de la regulación del sistema neuroendócrino por el sistema inmune, cada vez es más aceptado a pesar de que aún faltan estudios por realizar.

Considerando lo anterior, es posible distinguir de manera general dos formas de interrelaciones de tipo inmuno-neuroendócrino importantes. La primera incluye las interacciones entre el sistema neuroendócrino y el timo que dependen de la presencia de diversos péptidos que sintetiza y secreta esta glándula, algunos de los cuales son hormonas capaces de inducir la diferenciación de células T. La segunda incluye interacciones que se llevan a cabo en la periferia, entre las señales neuroendócrinas y los productos secretados por células inmunocompetentes que han sido estimuladas por un antígeno. Como ejemplo se mencionan los cambios producidos en las células del hipotálamo y la hipófisis ante una estimulación antigénica.

### CAPITULO 3. OBJETIVOS E HIPOTESIS.

---

De acuerdo a datos obtenidos a partir de trabajos recientes (23,24) realizados en el laboratorio de Inmunología de la Facultad de Química (UNAM), el síndrome del desgaste en ratones inducido por el método de Ekstedt se caracteriza, a nivel inmunológico, por la observación de 1) una baja producción de anticuerpos, 2) una disminución de la tolerancia inmunológica hacia los antígenos administrados oralmente, 3) una disminución de las reacciones cutáneas de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH), y 4) una concentración elevada de zinc en timo.

Considerando lo anterior y con el fin de ampliar el estudio de la inmunidad celular del modelo murino desgastado, la presente investigación tiene dos objetivos principales. El primero es conocer el efecto del síndrome del desgaste, en ratones recién nacidos, sobre la respuesta celular de los linfocitos T, midiendo la proliferación *in vitro* de células esplénicas y timocitos estimulados con Concanavalina A. Cabe mencionar que hasta ahora sólo se habían realizado estudios sobre linfocitos obtenidos de los órganos linfoides secundarios y de la sangre de los animales. El segundo objetivo es comprobar si la administración del extracto tímico bovino TP-1 (proporcionado por Laboratorios Serono de México, S.A.) y/o

zinc tienen la capacidad de prevenir el daño inmunológico del animal desgastado y devolver una respuesta proliferativa normal a los linfocitos T de los animales desgastados.

Antes de iniciar el trabajo experimental del presente estudio se propusieron las siguientes hipótesis.

1) Los linfocitos esplénicos y los timocitos de los ratones desgastados deben tener una respuesta proliferativa deprimida al ser estimulados *in vitro* con Concanavalina A.

2) La administración de TP-1, Zn o TP-1 + Zn debe generar una recuperación de la respuesta proliferativa de los linfocitos en los animales desgastados.

3) El tratamiento con TP-1 + Zn debe tener un efecto sinérgico sobre la respuesta celular de linfocitos de bazo y de timo, comparando los resultados a los obtenidos cuando éstos son aplicados en forma independiente.

## CAPITULO 4. DISEÑO DEL EXPERIMENTO.

---

Con la finalidad de alcanzar los objetivos anteriores se diseñaron los siguientes experimentos.

1. Inducción experimental del síndrome del desgaste.
2. Estudio del efecto del desgaste sobre la proliferación de los timocitos y linfocitos esplénicos estimulados con el mitógeno Con-A.
3. Estudio del efecto que tiene la administración intraperitoneal de la hormona timoestimulina (TP-1) sobre las tasas de proliferación de los linfocitos, del timo y del bazo, encontradas en los animales desgastados y en sus controles sanos.
4. Estudio del efecto que tiene la administración intraperitoneal de zinc sobre las tasas de proliferación de los linfocitos, del timo y del bazo, obtenidas a partir de ratones desgastados y sus respectivos controles sanos.

5. Estudio del efecto que tiene la administración intraperitoneal de TP-1 + zinc sobre las tasas de proliferación de los linfocitos, del timo y del bazo, encontradas en los ratones desgastados y en sus respectivos controles sanos.

En resumen, los experimentos fueron realizados de acuerdo a el siguiente esquema que muestra 4 grupos de animales separados según el tratamiento recibido. Cada grupo se dividió, a su vez, en subgrupos de animales sanos y desgastados, de cinco animales cada uno.

---

<u>Ratones Sanos</u>	<u>Ratones Desgastados</u>
1. Ratones sin tratamiento (n = 5)	Ratones sin tratamiento (n = 5)
2. Ratones con TP-1 (n = 5)	Ratones con TP-1 (n = 5)
3. Ratones con Zn (n = 5)	Ratones con Zn (n = 5)
4. Ratones con TP-1 + Zn (n = 5)	Ratones con TP-1 + Zn (n = 5)

---

De cada uno de los 40 ratones se obtuvieron el bazo y el timo para preparar un total de 80 suspensiones de células. Finalmente, de cada suspensión se procedió a estudiar, por triplicado, la incorporación de timidina tritiada al núcleo, en condiciones basales (sin estímulo) y en presencia de Con-A.

## CAPITULO 5. MATERIAL Y METODOS.

---

1. Animales. Se utilizaron ratones Balb/c, de ambos sexos, recién nacidos y de cuatro semanas de edad, que fueron obtenidos del Bioterio de la Facultad de Química (UNAM), en donde permanecieron durante todo el experimento bajo condiciones convencionales.

2. Bacterias. *Staphylococcus aureus* de la cepa ATCC 6538 fueron cultivados en medio BHI a 37°C, con agitación constante durante 18 horas. La suspensión de bacterias se lavó tres veces con solución salina isotónica (SSI) estéril y posteriormente se inactivó con calor a 121°C durante 30 minutos. Las bacterias se recolectaron por centrifugación y finalmente se ajustaron nefelométricamente a  $5 \times 10^9$  bacterias/ml en SSI estéril. Esta suspensión fue conservada a 4°C hasta el momento de su uso bajo condiciones de esterilidad.

3. Inducción del síndrome del desgaste. La enfermedad experimental fue provocada por la inyección intraperitoneal (IP) de 0.1 ml de la suspensión de estafilococos inactivados en ratones recién nacidos. Esta dosis se repitió cada tercer día durante cuatro semanas. El método es una modificación (1) del que fue propuesto por Ekstedt (6).



4. Tratamiento. Los ratones que habían recibido las inyecciones de estafilococos y sus correspondientes controles sanos que sólo fueron inyectados IP con SSI, fueron separados en cuatro grupos. Los animales del primer grupo recibieron, durante todo el experimento, dos dosis intraperitoneales a la semana de 50  $\mu$ l de la hormona timoestimulina (TP-1) durante un mes, la cual fue diluida en SSI estéril a una concentración de 80  $\mu$ g/ml y preparada inmediatamente antes de su inyección. Los animales del segundo grupo recibieron, una vez a la semana durante un mes, una inyección intraperitoneal de 50  $\mu$ l de acetato de zinc diluido en SSI estéril a una concentración de 100  $\mu$ g/ml. Los ratones del tercer grupo recibieron un tratamiento con timoestimulina + zinc, a las mismas dosis mencionadas y siguiendo los mismos esquemas de inoculación. La única diferencia consistió en que, al inyectar la segunda dosis semanal de la hormona, ésta fue diluida en la solución de acetato de zinc en lugar de utilizar SSI. Los ratones del cuarto grupo no recibieron ningún tratamiento.

5. Separación de las células. Las células se obtuvieron del bazo y timo de los ratones. Los animales fueron anestesiados con éter e inmediatamente se procedió a darles muerte por dislocación cervical. Cinco animales de cada subgrupo fueron seleccionados y, bajo estrictas condiciones de esterilidad, se les abrió la cavidad abdominal y torácica, y se procedió a extirpar el bazo y la glándula timo. Las células de ambos órganos fueron disgregadas en 5 ml de solución salina balanceada (BSS) estéril añadida a una caja Petri colocada sobre hielo. Las suspensiones de células fueron lavadas dos veces con BSS. Posteriormente fueron suspendidas en una solución hemolizante de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  al 80% y TRIS BASE al 20% en agua desionizada, con el propósito de eliminar los glóbulos rojos. Al final se

obtuvieron 80 suspensiones de células (40 de linfocitos de timo y 40 de linfocitos esplénicos), procedentes de 20 ratones sanos y 20 desgastados.

6. Medio de cultivo. Una vez eliminados los eritrocitos, se procedió a resuspender las células esplénicas y los timocitos en 1 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (Hy Clone, Laboratories Inc., U.S.A.) suplementado con suero bovino fetal al 10% (Flow Laboratories Inc., U.S.A.) que había sido previamente inactivado 30 minutos a 56°C. A este medio también se añadió Penicilina-Estreptomicina 100x (Microlab, México) al 1%, aminoácidos no esenciales 100x (Microlab, México) al 0.5%, Piruvato 100mM (Microlab, México) al 0.5%, L-glutamina 200mM al 0.5%, ácido N-hidroxietil piperina N-2-Etanosulfónico (HEPES) (Microlab, México) 25mM y una solución de bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>) al 2% en agua desionizada. El medio de cultivo se mantuvo a 4°C y fue suplementado el día de su uso bajo condiciones de esterilidad. La viabilidad de las células se determinó por exclusión del colorante azul tripano, preparado al 0.4% en SSI. El número de células fue determinado mediante un conteo bajo microscopio, con ocular 10x y objetivo 40x, utilizando la cuadrícula de una cámara de Neubauer. Una vez contadas las células viables, la suspensión fue ajustada de tal manera que el número de células deseado ( $300 \times 10^3$ ) quedara siempre resuspendido en un volumen de 100 ul.

7. Estimulación de las células con un mitógeno. Bajo condiciones de esterilidad, con campana de flujo laminar, a cada uno de los 96 pozos de 300 ul de una microplaca (Costar, U.S.A.), se añadieron 100 ul de la suspensión de células esplénicas o timocitos más 100 ul del medio de cultivo RPMI 1640 recién suplementado. De cada animal, sano o desgastado, incluido en alguno de los 4 grupos experimentales, las células del timo o

del bazo fueron colocadas, por triplicado, en dos series de pozos. En la primera serie de tres pozos se añadió el mitógeno utilizado para estimular la proliferación de los linfocitos, mientras que la segunda serie de tres pozos sirvió para obtener las lecturas basales de las células no estimuladas, por lo cual se les añadió el mismo volumen de medio de cultivo que no contenía el mitógeno. La estimulación de las células con mitógeno se realizó agregando al medio de cultivo 100  $\mu$ l de una solución de Concanavalina-A (Con-A) (Sigma Chemical Co., U.S.A.), preparada a partir de una solución de 4000  $\mu$ g/ml del mitógeno en NaCl 6M que fue diluida en el medio de cultivo hasta tener la concentración deseada de 2  $\mu$ g/ml. La microplaca fue cerrada y se mantuvo durante 54 horas en una incubadora (Quee, U.S.A.) a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, con 19.7% de humedad.

8. Incorporación al núcleo de la [<sup>3</sup>H]-timidina. Después de 54 horas de cultivo, a las células de cada pozo, cultivadas y estimuladas o no con la Con-A, se les añadieron 10  $\mu$ l de medio de cultivo que contenían 1  $\mu$ Ci de [<sup>3</sup>H]-timidina (New England Nuclear, U.S.A.) con una actividad específica de 6.7 Ci/mmol. Posteriormente la microplaca se incubó 18 horas más a 37°C, bajo las mismas condiciones de atmósfera y humedad mencionadas. Al término de la incubación las células fueron procesadas en un cosechador (modelo 24 v. Brandel, U.S.A.) que depositó el contenido insoluble de cada pozo sobre papel fibra de vidrio (Whatman, U.S.A.) con poros de 0.4  $\mu$ m. Las tiras de papel se dejaron secar a temperatura ambiente y, posteriormente, las muestras de cada pozo fueron separadas e introducidas en viales (Wheaton, U.S.A.) de 20 ml que contenían 4 ml de líquido de centelleo compuesto por 2,5-difenil oxazol (PPO) y P, [bis(2,5-fenil oxazol)] benceno (POPOP). Estas dos sustancias se disolvieron en tolueno el mismo día de su uso y la solución se mantuvo a 4°C hasta el momento de añadirla a los

viales. La radioactividad de cada muestra fue medida en un contador de centelleo (TRI-CARB 300, Packard, U.S.A.). Las lecturas fueron registradas como cuentas por minuto (cpm). La evaluación de la proliferación celular se llevó a cabo por la resta de las cpm obtenidas por la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina al núcleo de las células estimuladas menos las cpm obtenidas en condiciones basales.

9. Análisis estadístico. Las diferencias entre las medias de los valores obtenidos en los grupos estudiados fueron calculadas según un análisis de varianza (ANOVA).

## CAPITULO 6. RESULTADOS.

---

### 6.1. Estudio de la proliferación de los timocitos y linfocitos del bazo de ratones sanos estimulados con el mitógeno Con-A.

La adición del mitógeno Con-A al medio de cultivo para estimular *in vitro* los timocitos y los linfocitos esplénicos de ratones sanos, provocó un aumento de la proliferación celular en las dos poblaciones de células. En estas condiciones, la incorporación nuclear de timidina tritiada fue superior en los linfocitos esplénicos de los ratones sanos que en los timocitos de los mismos animales.

### 6.2. Estudio de la proliferación de los timocitos y linfocitos del bazo de ratones desgastados estimulados con el mitógeno Con-A.

En el segundo experimento, al adicionar la Con-A a los cultivos de linfocitos del timo y el bazo de ratones desgastados, se pudo observar que, nuevamente, la respuesta fue diferente según el origen de los linfocitos. Sin embargo, los timocitos de los ratones desgastados mostraron una mayor tasa de proliferación respecto a los timocitos de los ratones sanos control, mientras que los linfocitos del bazo de los ratones desgastados

disminuyeron su respuesta proliferativa en relación a la de las células esplénicas de los ratones sanos. Los resultados se presentan en la Tabla 3 y se expresan gráficamente en la Figura 1.

TABLA 3. Respuesta proliferativa *in vitro*, de los linfocitos del timo y el bazo de ratones desgastados y de sus controles sanos.

Ratones	Células		
	TIMO	BAZO	
	CPM (media $\pm$ DS)		
Sanos (n = 5)	60,789 $\pm$ 11,397	194,887 $\pm$ 37,738	(P<0.05)
Desg. (n = 5)	105,677 $\pm$ 20,980	95,162 $\pm$ 21,480	(P>0.05)
	(P<0.05)	(P<0.05)	

### RESPUESTA PROLIFERATIVA A LA CON-A DE LINFOCITOS EN RATONES

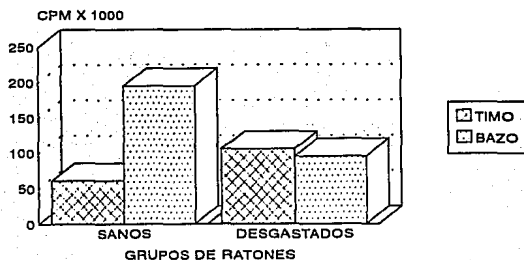


Figura 1.

### 6.3. Estudio de la proliferación de los timocitos y linfocitos del bazo en ratones sanos y desgastados tratados con TP-1.

En el tercer experimento, se pudo observar que el tratamiento *in vivo* de los ratones desgastados con la hormona TP-1 (1mg/kg) "normalizó" la respuesta proliferativa de los linfocitos de timo y de bazo cuando éstos fueron estimulados *in vitro* con el mitógeno Con-A. En cambio, el mismo tratamiento con TP-1 administrado *in vivo* a los ratones sanos no modificó significativamente la respuesta proliferativa al mismo mitógeno.

En los animales sanos que recibieron el tratamiento con la hormona TP-1 se observó una disminución no significativa en la cantidad de timidina tritiada incorporada al núcleo de células tímicas. Este mismo efecto fue mucho más evidente en el grupo de ratones desgastados que recibieron la misma dosis de la hormona, los cuales disminuyeron significativamente su tasa de proliferación. Sin embargo, en los ratones desgastados, la disminución de la respuesta de los timocitos a la Con-A significó una "normalización" de la misma, en relación al grupo control de animales sanos que recibieron el mismo tratamiento. Los resultados de este experimento se presentan en la Tabla 4 y se expresan gráficamente en la Figura 2.

TABLA 4. Respuesta proliferativa *in vitro*, de los linfocitos del timo de ratones desgastados y de sus controles sanos, antes y después de administrar el tratamiento *in vivo* con la hormona TP-1.

Ratones	Células de Timo		
	Tratamiento		
	TP-1 (-)	TP-1 (+)	
	CPM (media $\pm$ DS)		
Sanos (n = 5)	60,789 $\pm$ 11,397	36,727 $\pm$ 10,527	(P>0.05)
Desgastados (n = 5)	105,677 $\pm$ 20,980	42,286 $\pm$ 19,622	(P<0.05)
	(P<0.05)	(P>0.05)	

### RESPUESTA PROLIFERATIVA A LA CON-A DE LINFOCITOS DE TIMO DE RATONES

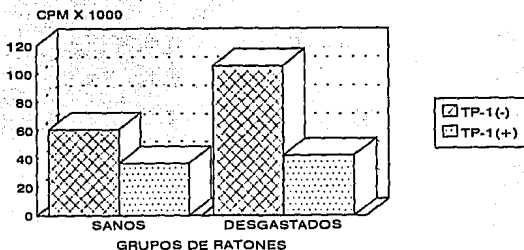


Figura 2.



Al estudiar el efecto de la hormona TP-1 sobre la respuesta linfoproliferativa de las células esplénicas, nuevamente se encontraron diferencias entre los ratones sanos y desgastados. El tratamiento con la hormona no modificó la respuesta de los linfocitos del bazo de los animales sanos. En cambio, en los animales desgastados se pudo observar que, después de recibir la hormona, la incorporación de la timidina tritiada de las células esplénicas aumentó significativamente hasta casi igualar la de los linfocitos del bazo de los animales sanos tratados también con la hormona. Los resultados aparecen en la Tabla 5 y se expresan gráficamente en la Figura 3.

TABLA 5. Respuesta proliferativa *in vitro*, de los linfocitos del bazo de ratones desgastados y de sus controles sanos, antes y después de administrar el tratamiento *in vivo* con la hormona TP-1.

Ratones	Células de Bazo		
	Tratamiento		
	TP-1 (-)	TP-1 (+)	
	CPM (media $\pm$ DS)		
Sanos (n = 5)	194,887 $\pm$ 37,738	189,053 $\pm$ 34,328	(P>0.05)
Desgastados (n = 5)	95,162 $\pm$ 21,480	174,875 $\pm$ 30,433	(P<0.05)
	(P<0.05)	(P>0.05)	

## RESPUESTA PROLIFERATIVA A LA CON-A DE LINFOCITOS DE BAZO DE RATONES

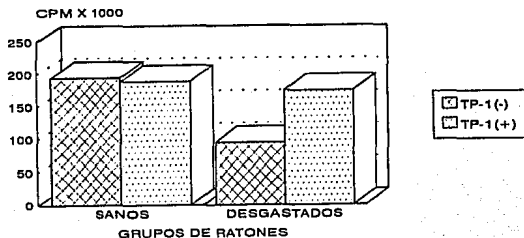


Figura 3.

6.4. Estudio de la proliferación de los timocitos y de los linfocitos del bazo de ratones sanos y desgastados tratados con Zn.

En el cuarto experimento, al estudiar si las inyecciones intraperitoneales de zinc modificaban o no la respuesta proliferativa de los linfocitos de timo y de bazo de los animales a los cuales se les inducía el síndrome del desgaste, se obtuvieron resultados similares a los que habían sido observados después del tratamiento con la hormona TP-1. La administración intraperitoneal de zinc redujo significativamente la cantidad de timidina tritiada incorporada al núcleo de los timocitos en los animales desgastados e incluso en los controles normales que recibieron el mismo tratamiento. No existe una diferencia significativa entre ambas respuestas. No obstante, la depresión de la respuesta a la Con-A fue mucho más evidente en el caso de los animales desgastados. Ya que los timocitos de los animales desgastados sin tratamiento tenían notablemente aumentada su respuesta proliferativa a la Con-A, se consideró que la administración

*in vivo* de sales de zinc también "normalizaba" la respuesta proliferativa *in vitro* de estas células. Los resultados aparecen en la Tabla 6 y se expresan gráficamente en la Figura 4.

TABLA 6. Respuesta proliferativa *in vitro*, de los linfocitos del timo de ratones desgastados y de sus controles sanos, antes y después de administrar el tratamiento *in vivo* con sales de zinc.

Ratones	Células de Timo		
	Tratamiento		
	Zn (-)	Zn (+)	
CPM (media $\pm$ DS)			
Sanos (n=5)	60,789 $\pm$ 11,397	29,159 $\pm$ 10,333	(P<0.05)
Desgastados (n = 5)	105,677 $\pm$ 20,980	40,199 $\pm$ 18,462	(P<0.05)
	(P<0.05)	(P>0.05)	

### RESPUESTA PROLIFERATIVA A LA CON-A DE LINFOCITOS DE TIMO DE RATONES

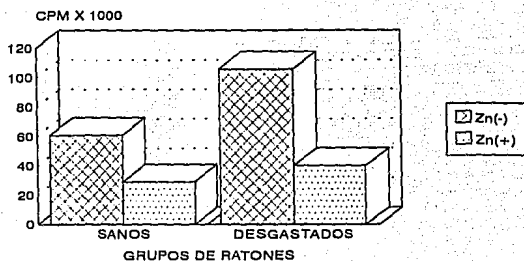


Figura 4.

En el mismo experimento donde se estudió el efecto del tratamiento con sales de zinc, los resultados obtenidos con las células del bazo de los ratones control tratados, fueron similares a los observados en el grupo control que recibió el tratamiento con TP-1. Después de la administración intraperitoneal de las sales de zinc, las células del bazo de los ratones sanos no disminuyeron significativamente su respuesta proliferativa cuando fueron estimuladas *in vitro* con la Con-A. El mismo tratamiento provocó un aumento significativo de la respuesta proliferativa de los esplenocitos de los ratones desgastados que, de esta forma, "normalizaron" su respuesta al mitógeno. Se observa que no hay diferencia significativa entre la respuesta de los esplenocitos de los animales desgastados tratados con zinc, y la del grupo control que recibió el mismo tratamiento. Los resultados aparecen en la Tabla 7 y se expresan gráficamente en la Figura 5.

TABLA 7. Respuesta proliferativa *in vitro*, de los linfocitos del bazo de ratones desgastados y de sus controles sanos, antes y después de administrar el tratamiento *in vivo* con sales de zinc.

Ratones	Células de Bazo		
	Tratamiento		
	Zn (-)	Zn (+)	
	CPM (media $\pm$ DS)		
Sanos (n=5)	194,887 $\pm$ 37,738	144,516 $\pm$ 27,317	(P>0.05)
Desgastados (n = 5)	95,162 $\pm$ 21,480	169,020 $\pm$ 33,719	(P<0.05)
	(P<0.05)	(P>0.05)	

## RESPUESTA PROLIFERATIVA A LA CON-A DE LINFOCITOS DE BAZO DE RATONES

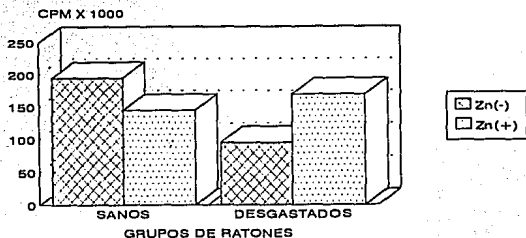


Figura 5.

6.5. Estudio de la proliferación de los timocitos y linfocitos del bazo de ratones sanos y desgastados tratados con TP-1 + Zn.

Los respuesta a Con-A obtenida con los timocitos de animales desgastados tratados con TP-1 + Zn fueron similares a los obtenidos en los animales desgastados tratados únicamente con zinc. Se observa que el tratamiento con ambos componentes disminuye significativamente la respuesta proliferativa de los timocitos de los ratones desgastados e incrementa significativamente la del grupo control que recibió el mismo tratamiento. Los resultados aparecen en la Tabla 8 y se expresan gráficamente en la Figura 6.

TABLA 8. Respuesta proliferativa *in vitro*, de los linfocitos del timo de ratones desgastados y de sus controles sanos, antes y después de administrar el tratamiento *in vivo* con TP-1 + Zn.

Ratones	Células de Timo		CPM (media ± DS)
	Tratamiento		
	TP-1 + Zn (-)	TP-1 + Zn (+)	
Sanos (n = 5)	60,789 ± 11,397	84,729 ± 18,756	(P<0.05)
Desgastados (n = 5)	105,677 ± 30,980	42,969 ± 23,016	(P<0.05)
	(P<0.05)	(P<0.05)	

### RESPUESTA PROLIFERATIVA A LA CON-A DE LINFOCITOS DE TIMO DE RATONES

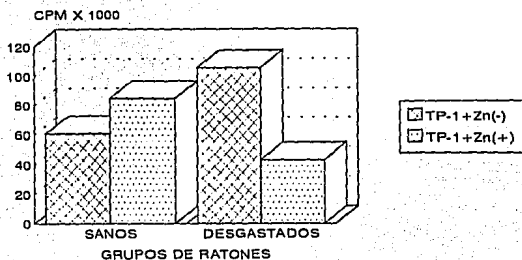


Figura 6.

Por otra parte, los resultados obtenidos con las células de bazo en los ratones desgastados tratados con TP-1 + Zn, también fueron similares a los obtenidos en los ratones desgastados tratados únicamente con zinc. Se observa que el tratamiento con TP-1 + Zn aumenta significativamente la respuesta proliferativa de los linfocitos de bazo en los ratones desgastados sin causar un efecto significativo en la del grupo control que recibió el mismo tratamiento. Se observa también que no hay diferencia significativa entre estas dos respuestas. Los resultados aparecen en la Tabla 9 y se expresan gráficamente en la Figura 7.

Tabla 9. Respuesta proliferativa *in vitro*, de los linfocitos del bazo de ratones desgastados y de sus controles sanos, antes y después de administrar el tratamiento *in vivo* con con TP-1 + Zn.

Ratones	Células de Bazo		
	Tratamiento		
	TP-1 + Zn (-)	TP-1 + Zn (+)	
	CPM (media ± DS)		
Sanos (n = 5)	194,887 ± 47,738	148,011 ± 22,932	(P>0.05)
Desgastados (n = 5)	95,162 ± 21,480	193,083 ± 51,388	(P<0.05)
	(P<0.05)	(P>0.05)	

## RESPUESTA PROLIFERATIVA A LA CON-A DE LINFOCITOS DE BAZO DE RATONES

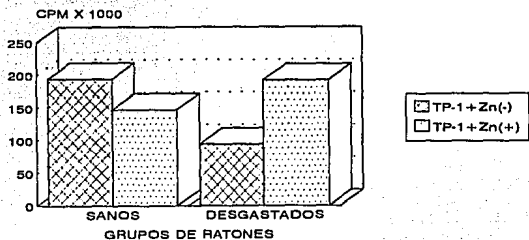


Figura 7.

6.6. Estudio del efecto de los tres diferentes tratamientos sobre la proliferación de los timocitos y linfocitos del bazo de ratones desgastados.

En los animales desgastados, los efectos favorables del tratamiento con la hormona TP-1, que normalizó la respuesta proliferativa de los linfocitos del bazo y del timo (Figura 8), fueron similares a los observados después de un tratamiento con sales de zinc o con una combinación de los dos tratamientos. No se observó que la administración simultánea de zinc y la hormona TP-1 tuviera un efecto sinérgico. Los ratones desgastados de los tres grupos de animales que recibieron tratamiento, elevaron la respuesta disminuida de las células esplénicas y deprimieron la respuesta elevada de los timocitos. Figura 9.



## RESPUESTA PROLIFERATIVA A LA CON-A DE LINFOCITOS DE RATONES DESGASTADOS

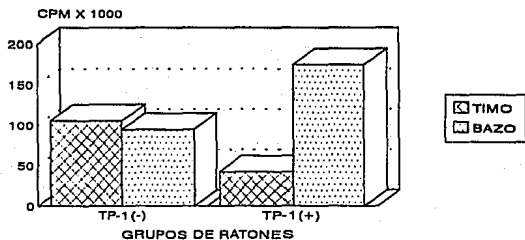


Figura 8. Representación gráfica de los resultados de la respuesta proliferativa a la Con-A, utilizando linfocitos del timo y del bazo de ratones desgastados, con y sin tratamiento *in vivo* con TP-1.

## RESPUESTA PROLIFERATIVA A LA CON-A DE LINFOCITOS DE RATONES DESGASTADOS

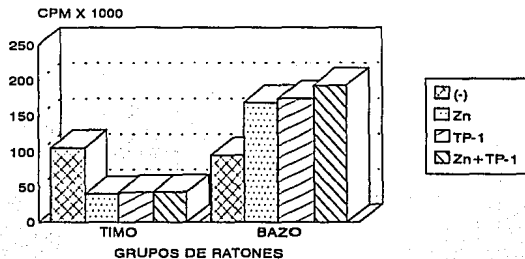


Figura 9. Representación gráfica de los resultados de la respuesta proliferativa a la Con-A, utilizando linfocitos del timo y del bazo de ratones desgastados, con y sin tratamiento *in vivo* con zinc, TP-1 y Zn + TP-1.

## CAPITULO 7. DISCUSION

---

Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman que la inoculación de bacterias inactivadas a ratones recién nacidos provoca la aparición de un síndrome desgastante. Estos animales presentan menor peso y tamaño que sus correspondientes controles sanos, tienen episodios frecuentes de diarrea, anorexia, irritabilidad, infecciones en la piel y la conjuntiva de los ojos, pelo ralo y encorvamiento de la columna. Por otro lado, los datos obtenidos con los experimentos de linfoproliferación demuestran que los animales desgastados tienen alterada la respuesta de los linfocitos del timo y el bazo. Sin embargo, esas alteraciones fueron corregidas al administrar intraperitonealmente un tratamiento con TP-1 (1 mg/kg), zinc (50 µg/ratón) o una mezcla de ambos.

La mayor respuesta registrada en los timocitos de animales desgastados fue un hallazgo original interesante. En la literatura consultada no encontramos resultados iguales o similares en animales estresados o sometidos a una estimulación prolongada con inyecciones de bacterias muertas. De acuerdo a nuestras hipótesis, se esperaba que la involución tímica del animal sometido al estrés de la inyecciones intraperitoneales de estafilococos, diera lugar a una respuesta

proliferativa celular deprimida. Los resultados del presente trabajo demuestran que sucede lo contrario. Este fenómeno podría ser consecuencia de una disminución del flujo de linfocitos T maduros fuera del timo del animal desgastado, en respuesta al estrés. Es probable que entonces, a diferencia de los animales normales, el animal desgastado tenga una mayor proporción de linfocitos maduros en el timo observándose por lo tanto una mayor respuesta proliferativa. De la misma manera, y también como una respuesta al estrés que implica un aumento en la producción de glucocorticoides por parte de los ratones desgastados, es probable que en el timo de este grupo de animales aumente la lisis de los linfocitos pre-T más inmaduros. Trabajos anteriores de Ekstedt han revelado que el animal desgastado tiene un timo pequeño y una linfopenia grave.

En el timo normal existen varias poblaciones de linfocitos pre-T que exhiben diferentes etapas de maduración. La eficiencia de las células T maduras es conferida a los pretimocitos por el microambiente tímico mediante uno o diversos mecanismos. En el caso de los timocitos de los ratones desgastados, la mayor eficiencia de la respuesta proliferativa también podría depender de la expresión y activación mitogénica en la superficie celular, de un número mayor de receptores TCR, y/o de la baja expresión o ausencia de receptores para neuropéptidos supresores, que al activarse por el mitógeno, pudieran tener un efecto negativo sobre la proliferación. Todo lo anterior provocaría que estos timocitos tuvieran la capacidad de proliferar más. No obstante, se necesita continuar este trabajo con un estudio sobre el fenotipo de los timocitos del ratón desgastado para confirmar si la presencia de linfocitos T maduros intratímicos se encuentra realmente aumentada y si éstos tienen elevada y/o disminuida la densidad de sus diferentes marcadores de membrana.

Algunos autores han demostrado que en los ratones timectomizados, la falta de esta glándula aumenta la producción de hormona del crecimiento y de prolactina a nivel de la glándula pituitaria (62). También se ha demostrado que ambas hormonas, así como la IL-1 e incluso la hidrocortisona, influyen en el crecimiento de las células epiteliales tímicas y en la secreción de hormonas de timo que, como se sabe, son importantes en la maduración de los linfocitos T (63, 64). Por otra parte la IL-1, que también es producida por las células epiteliales de timo, promueve además la producción de IL-2, incrementa el número de receptores para IL-2 en los linfocitos y favorece la captación de zinc en timo, hígado y médula ósea (65).

En nuestro experimento, el animal desgastado tiene un timo de tamaño pequeño. Es probable que esto dependa de la apoptosis de los timocitos inmaduros. Sin embargo, la producción de timocitos maduros en el animal desgastado debe estar estimulada por las hormonas hipofisarias mencionadas, cuya producción puede estar aumentada por el estrés causado por las inyecciones de estafilococos. Se puede sugerir que el sistema neuroendócrino-inmunológico de los ratones desgastados responde ante el estrés mediante la liberación de diversos neuropéptidos (prolactina por ejemplo) y citocinas (IL-1, IL-6 y TNF- $\alpha$ ), que al estimular respectivamente al timo, y a la hipófisis y los adrenales, pueden promover la producción de hormonas. Mediante un periodo de estrés prolongado, las alteraciones inmunológicas del animal desgastado pueden estar relacionadas, al menos parcialmente, con la sobreproducción de glucocorticoides por las glándulas adrenales. Los cambios observados en la condición física del animal pueden ser un resultado de las actividades fisiológicas de IL-6 y TNF- $\alpha$ . Los

cambios observados en la respuesta proliferativa de los timocitos también pueden depender de la presencia de IL-6 y de una alteración en la síntesis de hormonas tímicas, que incrementen la captación y la acumulación de zinc en la glándula timo.

En los ratones timectomizados, el síndrome del desgaste se manifiesta por una baja respuesta proliferativa de los esplenocitos, la cual está ocasionada por la ausencia de linfocitos T maduros y funcionales en los órganos linfoides periféricos, debido a la pérdida del timo (4). En el modelo experimental de desgaste estudiado en el presente trabajo, también se observó un decremento significativo de la respuesta proliferativa de linfocitos T de bazo estimulados con el mitógeno Con-A. Esta disminución, sin embargo, debe tener un origen diferente al descrito para los animales timectomizados.

En el animal desgastado por las inyecciones de estafilococos no se pierde la glándula timo. Sin embargo, la inducción de una situación de estrés prolongado da lugar a una alteración del timo y de su microambiente. A pesar de que, en el animal desgastado, este órgano aparentemente contiene linfocitos maduros más eficientes, el transporte de éstos hacia los órganos linfoides podría dificultarse o verse obstaculizado por el constante reto antigénico al que han sido sometidos los animales. Incluso es probable que otros factores neuroendócrinos, como el péptido vasoactivo intestinal (VIP) (59), contribuyan a reducir más aún el flujo de linfocitos T maduros desde el timo hacia los órganos linfoides periféricos. De esta forma, se puede intentar explicar que el bazo contenga una menor población de linfocitos T funcionales y que se obtenga una respuesta proliferativa disminuida cuando se lleva a cabo la estimulación con el mitógeno Con-A.

Aunque no se estudió el fenotipo de los linfocitos T y B al momento de su extracción de timo y bazo del animal desgastado, también se puede proponer que la disminución de la respuesta proliferativa de los esplenocitos no fue una consecuencia directa del desgaste inducido, sino resultado de la pequeña cantidad de linfocitos T en el cultivo de los esplenocitos. Sin embargo podría resultar que, aunque la mayoría de las células del cultivo de esplenocitos sean linfocitos B, tampoco la respuesta de éstos (síntesis de anticuerpos) sea eficiente por la falta de las células T colaboradoras funcionales. Así parecen confirmarlo los resultados de otros trabajos (21) sobre la producción de IgM anti-eritrocitos, *in vitro*, utilizando las células del bazo de ratones desgastados que habían sido inmunizados con glóbulos rojos de carnero.

Todo lo anterior sugiere que la baja respuesta proliferativa de los linfocitos del bazo de los ratones desgastados, puede ser atribuida a dos causas principales: a la disminución del número de linfocitos T maduros en este órgano y/o a una disminución en la capacidad proliferativa de las células T maduras presentes. Lo primero se explicaría por la dificultad del timo del animal desgastado para repoblar el bazo con linfocitos T maduros lo cual también se ha reportado en otros estudios (59). Lo segundo por la probabilidad de que las células T maduras presentes en el bazo en condiciones previas al desgaste, al estar en continuo contacto con el microambiente esplénico característico del animal estresado, hayan perdido la capacidad de responder adecuadamente al mitógeno después de ser extraídas. Esta segunda posibilidad colocaría a los linfocitos T del bazo en condiciones completamente diferentes a las que tendrían los linfocitos T del timo, los cuales sí tienen aumentada su respuesta proliferativa.

Cabe mencionar que la disminución de la respuesta proliferativa de esplenocitos podría también ser resultado de la producción por subpoblaciones activadas  $CD4^+$ -Th2, de citocinas como la IL-10 que tiene capacidad inhibitoria sobre la producción de IL-2 e IFN- $\gamma$ , las cuales son citocinas producidas por linfocitos  $CD4^+$ -Th1 que promueven la respuesta celular inmune (66). Asimismo, otra población celular involucrada en este fenómeno podrían ser los macrófagos, los cuales al ser hiperactivados, secretan algunas sustancias inmunosupresoras como las prostaglandinas de la serie E (67) cuya acción principal es inhibir la producción de IL-2. Los niveles elevados de glucocorticoides circulantes, son otro factor que, al inhibir la producción de timulina u otras hormonas tímicas, pueden contribuir a reducir la respuesta proliferativa de los linfocitos T del bazo de los ratones desgastados. Lo anterior se apoya en el hecho de que la administración de TP-1 normalizó la respuesta proliferativa de los linfocitos del bazo de los animales desgastados.

Los animales desgastados recuperaron su inmunocompetencia después de ser tratados con el extracto tímico TP-1, zinc o una mezcla de ambos. A pesar de que no se comprobó un efecto sinérgico entre la hormona y el elemento traza, la administración de ambos por separado logró la "normalización" de la respuesta inmune de los linfocitos T de ratones desgastados tanto en bazo como en timo.

Al respecto se sugiere que la hormona y el zinc administrados en ratones desgastados equilibran los niveles normales de ambos componentes en el microambiente tímico alterado por el estrés. Esto evitaría que en el timo se dieran alteraciones que causan la sobreproducción de IL-1,

prolactina y hormona del crecimiento, impidiéndose así el incremento del número de receptores en la superficie de los linfocitos T.

Lo anterior podría explicar por qué los timocitos T de ratones desgastados tratados con zinc y timoestimulina responden menos al estímulo mitogénico que los de animales desgastados no tratados. Asimismo, la administración de TP-1 facilitaría la migración de las células T del timo hacia el bazo, las cuales podrían repoblar los órganos linfoides sin necesidad de activarse en el trayecto, tal vez a causa de los niveles elevados de corticosteroides en la sangre circulante del animal desgastado. Esto explicaría el aumento en la proliferación de los linfocitos de bazo en ratones desgastados tratados. Sin embargo, con los resultados del presente trabajo no se tiene la evidencia necesaria para explicar los mecanismos por los cuales el tratamiento aplicado también evitaría la sobreproducción de otras citocinas, entre ellas el TNF- $\alpha$ , que son las responsables de la caquexia del ratón (58). Resultados por publicar, obtenidos en otros experimentos (27), sugieren que los macrófagos peritoneales del animal desgastado que recibe un tratamiento con sales de zinc, tienen aumentada su capacidad para producir TNF, tanto en condiciones basales como después de su estimulación *in vitro* con bacterias muertas.

Es posible que la TP-1 posea otros mecanismos de acción a través de otras poblaciones de células inmunocompetentes. Sin embargo, hasta ahora no se conoce si la hormona TP-1 actúa también sobre macrófagos o linfocitos B.



## CAPITULO 8. CONCLUSIONES.

---

1. La respuesta de los linfocitos T al mitógeno Con-A se encuentra alterada en animales desgastados: en tino la respuesta es significativamente mayor y en bazo significativamente menor que la obtenida en ratones sanos.

2. Esta alteración en la respuesta linfoproliferativa de los ratones desgastados se "normaliza" al administrar, como tratamiento, la hormona TP-1 o zinc, en forma independiente o combinada.

3. El incremento de la respuesta al mitógeno presentada por los linfocitos de tino de animales desgastados, puede deberse a las siguientes causas:

a) Producción de factores tímicos que, como una respuesta al estrés, aceleran la maduración de los timocitos.

b) Muerte por apoptosis de los linfocitos pre-T más inmaduros y más sensibles a los glucocorticoides y la IL-6.

c) Acumulación en el tino de linfocitos T maduros que, por la condición metabólica del animal desgastado, tienen interferida su migración hacia los órganos linfoides secundarios.

4. La inhibición de la respuesta proliferativa al mitógeno Con-A observada en los linfocitos de bazo de animales desgastados, puede deberse a las siguientes causas:

a) Deficiencias en el proceso de repoblación del bazo, con linfocitos T provenientes del timo.

b) Agotamiento metabólico de los linfocitos T del bazo del animal que recibe inyecciones sucesivas de estafilococos.

c) Interacción de diversas poblaciones celulares a nivel del bazo, que pudiera generar una menor producción de algunas citocinas o un aumento en la síntesis de PGE<sub>2</sub>.

5. El mecanismo por el cual actúan la hormona TP-1 y el zinc en ambos órganos linfoides es desconocida. La literatura apoya el concepto de una posible acción de TP-1 sobre la producción de IL-2 y la expresión de su receptor, a nivel de linfocitos. En cuanto al elemento traza, es probable que los resultados satisfactorios obtenidos después de su sola administración, dependan de que el animal desgastado tiene una deficiencia de zinc. Si este fuera el caso, faltaría explicar por qué el tratamiento con sólo TP-1, también "normaliza" la inmunocompetencia del ratón desgastado.

6. Es necesario profundizar en el estudio de las interacciones celulares que deben ocurrir en este modelo de enfermedad experimental. Asimismo, se debe llevar a cabo el análisis de los fenotipos que expresan las células

inmunocomprometidas, estudiar las funciones que desempeñan las distintas citocinas en la inducción y en la evolución del desgaste y, además, investigar el efecto que tiene la administración de la hormona TP-1 sobre la captación tisular de zinc y sobre las actividades del sistema neuroendócrino.

CAPITULO 9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

---

- 1) García-Tamayo F., Fierro L., Lastra M.D. (1991). Inducción y recuperación del desgaste inmunológico. Bol. Med. Hosp. Inf. Mex. 48: 559.
- 2) González-Macouzet, E. (1991). Efecto de la administración de zinc sobre la inmunocompetencia de ratones con el síndrome del desgaste. Tesis de licenciatura (Q.F.B.) Fac. Química, UNAM.
- 3) Billingham, R.E.; Brent, L. and Medawar, B. (1953). Actively Acquired Tolerance of Foreign Cells. Nature, 172:603
- 4) Miller, J.F.A.P.; Howard, J.G. (1964). Some Similarities between Neonatal Thymectomy Syndrome and GVH Disease. J. Reticuloend. Soc. 1:369.
- 5) Simonsen, M. (1962). The mechanism of runt disease. En: Mechanism of cell and tissue damage produced by immune reactions, editado por Grabar, P. y Miescher, P. Benno Schwabe & Co., Publishers, Basilea, Suiza. p 233.
- 6) Ekstedt, R.D. and Hayes L.L. (1967). Runt Disease Induced by Non-living Bacterial Antigens. J. Immunol., 1967, 98:110.

- 7) Schlesinger M. et al. (1964). Wasting disease induced in young mice by administration of cortisol acetate. Science 143: 965.
- 8) Fogh J., Giovanella B.C. (1978). The nude mice in experimental and clinical research. Academic Press Inc. New York p 457.
- 9) Pantelouris E.M. (1968) Nature 217: 370
- 10) Paterson, P.Y. (1962). Discussion on Mechanisms of the Tissue Damage in Runting and Homograft Rejection. En: Mechanism of Cell and Tissue Damage Produced by Immune Reactions, editado por Grabar, P. y Miescher, P. Benno Schwabe & Co., Publishers, Basilea, Suiza. pag.241.
- 11) Jutila, J.W. (1973). Etiology of the Wasting Disease. J. Infect. Dis., 128 (supl.): s99.
- 12) Pierpaoli, W.; Sorkin, E. (1972). Hormones, thymus, and lymphocyte functions. Experientia, 1972, 28: 1385.
- 13) Chesters J.K., Will M. (1981). Measurement of zinc flux through plasma in normal and endotoxin-stressed pigs and the effects of Zn supplementation during stress. Brit. J. Nutr. 46:119.
- 14) Asanuma Y., Goldstein A.L., White A. (1970). Reduction in the incidence of wasting disease in neonatally thymectomized CBA/W mice by the injection of thymosin. Endocrinology 86: 601-610.

- 15) Keast D., Walters M.N. (1968). The pathology of murine runting and its modification by neomicin sulphate gavages. *Immunology* 15: 247.
- 16) Wilson R., Sjodin K., Bealmar M. (1964). The absence of wasting in thymectomized germfree (axenic) mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 117: 237.
- 17) Beutler B. et al. (1985). Passive immunization against cachectin/ tumor necrosis factor protects mice from lethal effect of endotoxin. *Science* 229: 869.
- 18) Tracey K.J. et al. (1987). Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Science* 330: 662.
- 19) Kevin, J. et. al. (1986). Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 234: 470.
- 20) Fraker, P.J. et. al. (1978). Regeneration of T cell helper function in zinc deficient adult mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75: 5660-5664.
- 21) García-Tamayo F., Aguilar A.E., Gracia R., Fierro L., Lastra M.D. (1990). La inmunodeficiencia experimental del animal desgastado y/o desnutrido. *Acta Ped. Mex.* 11: 75.
- 22) García-Tamayo F., Aguilar A.E., Rivera R., de León S., Pastelín R., Lastra M.D. (1990). Consecuencia de la interacción de productos bacterianos en el sistema inmunitario de ratones recién nacidos. *Bol. Med. Hosp. Inf.* 47: 173.

- 23) Fierro Gaxiola L. (1990). Estudio de la tolerancia inmunológica oral en ratones recién nacidos tratados con *Staphylococcus aureus*. Tesis de licenciatura (Q.F.B.). Fac. Química, UNAM.
- 24) Aguirre, M. (1992). Efecto del zinc sobre la hipersensibilidad tardía. Tesis de licenciatura (Q.F.B.) Fac. Química, UNAM.
- 25) Bonifaz, L. (1991). Utilidad de las sales de tetrazolium para estudiar la proliferación de linfocitos en ratones desgastados. Tesis de licenciatura (Q.F.B.) Fac. Química, UNAM.
- 26) Esturau N. (1993). Permeabilidad intestinal en ratones con el síndrome de desgaste. Tesis de licenciatura (Q.F.B.) Fac. Química, UNAM.
- 27) Bruciaga G., Terrazas L.I., García-Tamayo F. (1992). Producción de TNF  $\alpha$  por macrófagos peritoneales estimulados con una cepa de *Staphylococcus aureus* inactivados. XXXV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Veracruz, Ver. México.
- 28) Nabarra B., and Andrianarison I. (1991). Ultrastructural studies of mouse thymic reticulum: II. Non epithelial component. *Thymus* 17: 39-61.
- 29) Nabarra B., and Andrianarison I. (1987). Ultrastructural studies of thymic reticulum: I. Epithelial component. *Thymus* 9:95-121.
- 30) Boyd, R. L. et. al. (1993). The thymic microenvironment. *Immunology Today* 14: 445-453.

- 31) van Ewijk W. (1991). T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments. *Annu. Rev. Immunol.* 9:591-615. 91-615.
- 32) Maximow, A. (1909). Untersuchungen über blut und bindegewebe. Über die histogenese der thymus. evl. zügertieren. *Arch. Mikroskop. Anat.* 74: 525-621.
- 33) Comsa, J. (1956). Influence d'un extrait hautement purifié de thymus sur les conséquences de l' irradiation aux rayons X sur le glandes endocrines du cobaye. *Ann. Endocrinol.* 17: 777-784.
- 34) Skotnicki Aleksander B. (1989). Hormonas timicas y linfocinas. *Drugs of Today* 25: 337-362.
- 35) Kouttab, N.M. (1989). Thymomodulin: Biological properties and clinical applications. *Med. Oncol. Tumor Pharmacother.* 6:5-9.
- 36) Milenkovic L., McCann S.M. (1992). Effects of thymosin alpha-1 on pituitary hormone release. *Neuroendocrinology* 55 (1): 14-19.
- 37) Good, R.A. (1983). The thymus and its hormones. *Clin. Immunol. Allergy* 3: 3-7.
- 38) Jankovic, B.D. and Maric D. (1987). Restoration of *in vivo* humoral and cell-mediated immune responses in neonatally thymectomized and aged rats by means of lipid and protein fractions from the calf thymus. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 228-244.



- 39) Bordigoni, P. et al. (1982). Improvement of cellular immunity and IgA production in immunodeficient children after treatment with synthetic serum thymic factor (FTS). *Lancet* 11: 293-297.
- 40) Pleau J.M., et al. (1980). Specific receptor for the serum thymic factor (FTS) in lymphoblastoid cultured cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 2861-2865.
- 41) Savino, W. et al. (1988). Thymic hormone containing cells. IX. Steroids *in vitro* modulate thymulin secretion by human and murine thymic epithelial cells. *J. Steroid Biochem.* 30: 479.
- 42) Small M. et al. (1989). Influence of a thymic hormone on cultured epithelial cells of the thymus. *Thymus* 13: 227-235.
- 43) Eymard B. et al. (1992). Combined effects of a thymic peptide, thymopoietin and myasthenic patient sera in rat myotube culture. *Journal of the Neurological Sciences* 112: 216-222.
- 44) Milani S. et al. (1990). Effetto protettivo della timostimolina (TS) nel trattamento con HDFA + 5-FU del carcinoma avanzato del colon retto. *Folia Oncol.* 13: 159-162.
- 45) Tas. M. et al. (1990). Beneficial effects of the thymic hormone preparation thymoximulin in patients with defects in cell-mediated immunity and chronic purulent rhinosinusitis. A double-blind cross-over trial on improvements in monocyte polarization and clinical effects. *Clin. Exp. Immunol.* 80: 304-313.

46) Meeting Report (1980). International Serono Symposium on thymus, thymic hormones and T lymphocytes. Thymus 2: 123-126.

47) Moulder K. et al. (1989). Experimental zinc deficiency: effects on cellular responses and the affinity of humoral antibody. Clin. Exp. Immunol. 77: 269-274.

48) DePasquale-Jardieu, P. et al. (1979). The role of corticosterone in the loss of immune function in the zinc-deficient A/J mouse. J. Nutr. 109: 1847-1855.

49) Cunningham-Rundles S. et al. (1979). Increased T lymphocyte function and thymopoietin following zinc repletion in man. Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol. 38: 1222.

50) Fraker P.J. et al. (1986). Interrelationships between zinc and immune function. Federation Proc. 45: 1474-1479.

51) Fosmire, G.J. (1990). Zinc toxicity. Am. J. Clin. Nutr. 51: 225-227.

52) Kirchner H., Salas M. (1987). Stimulation of lymphocytes with zinc ions. Methods in Enzymology 150: 112-117.

53) Dowd, P.S. et al. (1986). T lymphocyte subsets and interleukin 2 production in zinc deficient rats. Br. J. Nutr. 55: 59.

- 54) Scuderì, P. et. al. (1990). Differential effects of copper and zinc on human peripheral blood monocyte cytokine secretion. *Cell Immunol.* 126: 391-405.
- 55) Chvapil M. (1976) Effect of zinc on cells and biomembranes. *Med. Clin. North. Am.* 60: 799.
- 56) Terrazas L. I., Martínez T., García-Tamayo F. (1993). Administration of TP-1 thymic hormone reduces the uptake of  $^{65}\text{Zn}$  by brain of Balb/c healthy mice. Abstracts of the 2nd International Congress of the International Society for Neuroimmunomodulation. Salerno, Italy. p. 191.
- 57) Fabris N., Mocchegiani E., Muzzioli M., and Provinciali M. (1988). Neuroendocrine-thymus interactions: Perspectives for intervention in aging. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 521: 72-87.
- 58) Kelley, K.W. (1990). The role of growth hormone in modulation of the immune response. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 95-101.
- 59) Bialock J.E. (1990). A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiological Reviews.* 69:1-29.
- 60) Scarborough, D.E. (1990). Cytokine modulation of pituitary hormone secretion. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 69: 169-179.
- 61) Geenen V., Legros, J.J. and Franchimont P. (1987). The thymus as a neuroendocrine organ. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 56-66.

- 62) Kelley, K.W., et al. (1990). A pituitary-thymus connection during aging. Ann. N.Y. Acad. Sci. p. 88.
- 63) Coto J.A., Hadden E.M. (1992). Interleukin 1 regulates secretion of zinc-thymulin by human epithelial cells and its action on T-lymphocyte proliferation and nuclear protein kinase C. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 7752-7756.
- 64) Savino, W. et. al. (1988). Hydrocortisone increases the numbers of KL1<sup>+</sup> cells, a discrete thymic epithelial cell subset characterized by high molecular weight cytokeratin expression. Endocrinology 123: 2557.
- 65) Cousins, R.J. and Leinart, A.S. (1988). Tissue-specific regulation of zinc metabolism and metallothionein genes by interleukin 1. FASEB J. 2: 2884-2890.
- 66) Pearce E. et al. (1991). Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. The Journal of Experimental Medicine 173: 159-166.
- 67) Rappaport, R. S. et al. (1982). Prostaglandin E inhibits the production of human interleukin 2. J. Exp. Med. 155: 943-948.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA