

25



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN

EFEECTO DE LA HORMONA TRIYODOTIRONINA T3 SOBRE UN CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA.

P R E S E N T A :

CLAUDIA FACUNDO ARTEAGA

DIRECTORAS: SANDRA DIAZ-BARRIGA ARCEO MA. ESTHER REVUELTA MIRANDA

CUAUTITLAN IZCALLI EDO. DE MEX.

1999.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

275062



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLÁN
ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS



DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Efecto de la hormona triyodotironina T₃ sobre
un cultivo de linfocitos humanos.

que presenta la pasante: Claudia Facundo Arteaga
con número de cuenta: 9156115-4 para obtener el TÍTULO de:
Química Farmacéutica Bióloga

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXÁMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 15 de Enero de 199 9

PRESIDENTE M. en C. Luisa Martínez Aguilar

VOCAL Q.B.P. Antonio Sánchez Ortega

SECRETARIO M. en C. Sandra Díaz Barriga Arceo

PRIMER SUPLENTE M. en C. Francisco López Mejía

SEGUNDO SUPLENTE Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez

**EL PRESENTE TRABAJO DE INVESTIGACION SE REALIZO
EN EL LABORATORIO DE CITOGENETICA (A CARGO DE
LA M en C. SANDRA DIAZ-BARRIGA ARCEO) DE LA
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN,
CON LA COLABORACION DEL LABORATORIO DE BIOLOGIA
MOLECULAR EN POSGRADO DE LA MISMA FACULTAD
(A CARGO DEL DR. ANDRES ROMERO ROJAS).**

A LA MEMORIA DE MI MADRE :

MARIA DEL SOCORRO ARTEAGA MARTINEZ

**NUNCA PUDISTE ELUDIR
EL AGOBIANTE PAPEL
QUE LA TRADICIÓN PATRIARCAL
RELIGIOSAMENTE ORDENÓ CUMPLIR.**

**YA LA MUERTE DECIDIÓ
ACABAR TU VIDA Y DESVELO
QUE EL BÍBLICO MODELO
COMO MUJER TE CONFIÓ**

**NUNCA PUDISTE VOLAR,
SOÑADORA DE MIS SUEÑOS :
UN ESOSO, UNOS HIJOS, UN HOGAR....
FUERON TUS ÚNICOS DUEÑOS.**

A MI PADRE Y HERMANA :

FEDERICO FACUNDO LEOS.

Y

ERIKA FACUNDO ARTEAGA.

A TI OSCAR :

**POR APOYARME HASTA EL FINAL DE UNA DE LAS
MUCHAS METAS QUE LOGRAREMOS JUNTOS. GRACIAS.**

TE AMO.

INDICE

PAGINAS

	ABREVIATURAS.....	I
	RESUMEN.....	II
I.	INTRODUCCION.....	1
II.	GENERALIDADES.....	4
	2.1. LA TIROIDES.....	4
	2.2. REGULACION DE LA GLANDULA TIROIDES.....	8
	2.3. BIOSINTESIS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS.....	13
	2.3.1. Ingesta y absorción de yodo.....	13
	2.3.2. Captación de yodo por la célula folicular.....	14
	2.3.3. Activación de yoduros.....	15
	2.3.4. Yodinación de tiroglobulina.....	16
	2.3.5. Acoplamiento de MIT, DIT para la síntesis de T3 y T4.....	18
	2.3.6. Liberación de T3 y T4.....	20
	2.4. EFECTOS DE LA HORMONA TIROIDEA EN LA CELULA BLANCO.....	24
	2.4.1. Efectos metabólicos de la triyodotironina.....	24
	2.4.2. Efectos intracelulares de T3.....	25
	2.5. MECANISMO DE ACCION DE LA TRIYODOTIRONINA.....	28
	2.6. EL LINFOCITO.....	32
	2.6.1. Ciclo celular.....	32
	2.6.2. Descripción general.....	36
	2.6.3. Respuesta de los linfocitos al estímulo.....	38
	2.6.4. Respuesta de los linfocitos al cultivo.....	39
	2.6.5. Control del ciclo celular en los linfocitos T.....	42
	2.6.5.1. Activación de los linfocitos T.....	42
	2.6.5.2. Procesamiento del antígeno.....	43
	2.6.5.3. Hidrólisis del PI_2P y activación de proteincinasa C (PKC).....	44
	2.6.5.4. Actividad transcripcional.....	45
	2.7. ESTUDIOS SOBRE EFECTOS DE T3 EN DIFERENTES TEJIDOS....	49
	2.8. PARAMETROS DE ESTUDIO.....	51
V.	OBJETIVOS.....	56
	3.1. OBJETIVOS GENERALES.....	56
	3.2. OBJETIVOS PARTICULARES.....	56
IV.	MATERIAL Y METODOS.....	57
	4.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	57
	4.2. REACTIVOS.....	57

4.3. MATERIAL DE CRISTALERIA.....	58
4.4. EQUIPO.....	58
4.5. METODOLOGIA.....	59
4.5.1. Preparación y distribución de los cultivos.....	59
4.5.2. Cosecha.....	60
4.5.3. Tinción diferencial.....	61
4.5.4. Observación al microscopio.....	61
4.5.5. Análisis estadístico.....	62
V. RESULTADOS.....	63
5.1. DETERMINACION DE IM.....	64
5.2. DETERMINACION DE CPC.....	67
5.3. ENSAYO DE ICHs.....	69
VI. DISCUSION.....	72
VII. CONCLUSIONES.....	75
VIII. BIBLIOGRAFIA.....	76

ABREVIATURAS

T3 - Triyodotironina

T4 - Tetrayodotironina o Tiroxina

CPC - Cinética de Proliferación Celular

ICH - Intercambio de Cromátidas Hermanas

PHA - Fitohemaglutinina

GH - Hormona de Crecimiento

ACTH - Hormona Adrenocorticotropica

PRL - Hormona Prolactina

LSH - Hormona Luteinizante

FSH - Hormona Folículo Estimulante

MSH - Hormona Estimulante de Melanocitos

TSH - Hormona Estimulante de la Tiroides o Tirotropina

TRH - Hormona Liberadora de Tirotropina

MIT - Monoyodotironina

DIT - Diyodotironina

MHC I - Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase I o HLA

MHC II - Complejo Mayor de Hitoscompatibilidad clase II o HLA

TCR - Receptor Membranal del Linfocito T

TCR-CD3 - Complejo Receptor Membranal del Linfocito T

CD4 - Linfocito T Cooperador

CD8 - Linfocito T Citotóxico

IL-2 - Interleucina 2

IFN γ - Interferón gama

CPA - Célula Presentadora de Antígeno

PIP₂ - Fosfatidilinositol difosfato

IP₃ - Inositol 1,4,5-trifosfato

DGA - Diacilglicerol

PKC - Proteínas tirocinasas

V. RESUMEN

En la actualidad es comprendido más claramente que las hormonas tiroideas juegan un papel fundamental en el funcionamiento y metabolismo celular prácticamente en todos los niveles.

La 3, 5, 3'-Triyodotironina o T3 es la forma activa de la hormona tiroidea y deriva principalmente de un átomo de yodo del anillo externo; regula los procesos metabólicos en la mayoría de los órganos por lo que es una de las principales hormonas secretadas por la glándula tiroides, tiene efectos importantes sobre el aumento en la diferenciación y proliferación celular de la mayoría de los tejidos y posiblemente en el linfocito; es por ello que surge el interés de llevar a cabo un estudio para evaluar el efecto de este compuesto sobre la proliferación celular en cultivos de linfocitos humanos provenientes de un donador sano, a diferentes concentraciones (0.58, 3.5, 5.8, 8.2 μ mol/l) con las pruebas de Índice Mitótico (IM), la Cinética de Proliferación Celular (CPC) y el estudio del Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH).

I. INTRODUCCION

El sistema endócrino está formado por glándulas que producen hormonas (3), éstas son sustancias que se producen en pequeñas cantidades, secretadas por diversas glándulas y que actúan como mensajeros químicos, las cuales son llevadas por la sangre a distintos órganos blanco (prácticamente en todos los tejidos), donde regulan una enorme variedad de procesos fisiológicos y metabólicos, teniendo efectos en el crecimiento, desarrollo y metabolismo celular. (38, 41, 92)

La Glándula Tiroides es una de las glándulas más grandes del cuerpo que secreta hormonas importantes, por ejemplo : a) Tiroxina (T4), que es el principal producto de secreción de la glándula, consta de dos anillos fenilo con 4 átomos de yodo. b) 3,5,3' triyodotironina o T3 que es la forma activa y consta también de dos anillos fenilo y 3 átomos de yodo. Ambas están bajo control del hipotálamo y la hipófisis a través de la Hormona Estimulante de Tirotropina (TRH) y la Hormona Liberadora de la Tiroides o Tirotropina (TSH) respectivamente (38). T3 es la hormona activa reguladora del metabolismo basal.

Existen postulados *in vitro* e *in vivo*, en los cuales se propone que la hormona T3 actúa aumentando la proliferación celular en células de testículo de ratas, células óseas y células epidérmicas (1, 31, 44, 97).

En los últimos años se ha dado una nueva visión dentro de la acción de las hormonas tiroideas en células eucarióticas, proporcionando evidencia que los diversos efectos de las hormonas tiroideas son moduladas por un receptor asociado a la cromatina el cual ha sido caracterizado en diversos órganos blanco como hígado, hipófisis, riñón, corazón y posiblemente el linfocito (57, 68).

Las principales células de la inmunidad son los linfocitos que son los glóbulos blancos mayoritarios en la sangre derivados del tímo. La proliferación de los linfocitos comienza cuando son estimulados o activados por una serie de agentes, incluyendo antígenos, anticuerpos, lipopolisacáridos bacteriales y lectinas de plantas como por ejemplo Fitohemaglutinina (PHA) y Conavalina A. (17,31,59,89)

La mayoría de los linfocitos circulan en el organismo en un estado de reposo. Después de este proceso de activación las células que han reconocido específicamente el antígeno o lectina comienzan la expansión clonal. Esto implica que los linfocitos pasan del estado de reposo G_0 a G_1 a sintetizar DNA (fase S del ciclo celular), seguido de la división de dos células hijas (22,99).

En un estudio realizado por Marck y Sthephen con la triyodotironina (T3) han publicado a la hormona como potente mitógeno en células tumorales de pituitaria (GC); es por ello, que la T3 como parte del sistema endócrino y el linfocito dentro del sistema inmune juegan un papel central para este trabajo (4,24).

Finalmente el cultivo de linfocitos humanos ha sido ampliamente utilizado para evaluar los diversos efectos de sustancias químicas en el DNA. Este sistema puede ser utilizado para la determinación de la Cinética de Proliferación Celular (CPC) y los Intercambios de Cromátidas Hermanas (ICH) para evaluar el efecto que pudiera tener la T3 al administrarla a diferentes dosis en los cultivos de linfocitos humanos con Fitoheماغlutinina (96).

Por lo anterior, surge la inquietud de realizar el presente trabajo para evaluar los efectos de esta hormona sobre los linfocitos in vitro.

II. GENERALIDADES

2.1. TIROIDES

La tiroides es considerada una glándula de secreción interna o endócrina, carece de conducto excretor y vierte por ello sus productos específicos (hormonas) directamente a la sangre, todos los vertebrados la poseen (desde peces a mamíferos). (46)

La glándula tiroides está localizada delante de la tráquea, al nivel del segundo y tercer anillo cartilagosos. Tiene forma bilobular de mariposa y está unida en el centro por un istmo. Con frecuencia, el lóbulo derecho es ligeramente más grande que el izquierdo. En los adultos, la glándula tiroides pesa de 15 a 20 g, mide de 3 a 5 cm de largo y es de color café rojizo. Cada lóbulo está muy vascularizado y recibe un amplio aporte sanguíneo (que procede de la carótida) y la arteria tiroidea inferior (que procede de las ramificaciones de la arteria subclavicular). (38) Fig. 1

Su inervación es de tipo autónomo: contiene fibras nerviosas simpáticas posganglionares que se originan a partir de los ganglios cervicales y fibras nerviosas parasimpáticas posganglionares a partir del nervio vago. (2,38)

Histológicamente la tiroides contiene diminutas vesículas cerradas llamadas acini o folículos, considerados la unidad estructural fundamental. Consiste en una sola capa de células foliculares en torno a un lumen relleno de un coloide de proteínas. La glándula tiroides del adulto tiene aproximadamente tres millones de folículos que varían de 50 a 500 μm de diámetro. (2,26)

La célula folicular tiene formación plana o columnar ; el lado basal de la misma se proyecta hacia el exterior del lumen y está rodeado por un plexo capilar extenso. El vértice (lado apical) de la célula folicular se dirige hacia el interior del lumen, en donde se almacenan proteínas de tiroglobulina proteica. (2) Fig. 2

Alrededor de las células foliculares se encuentran las llamadas parafoliculares o células "C" que poseen tirocalcitonina (hormona que provoca el deposito de calcio). (38)

Las células tiroideas tienen tres funciones :

1. Captan y transportan yodo
2. Sintetizan y secretan del coloide la tiroglobulina
3. Separan las hormonas tiroideas de la tiroglobulina al secretarla hacia la circulación. (29)

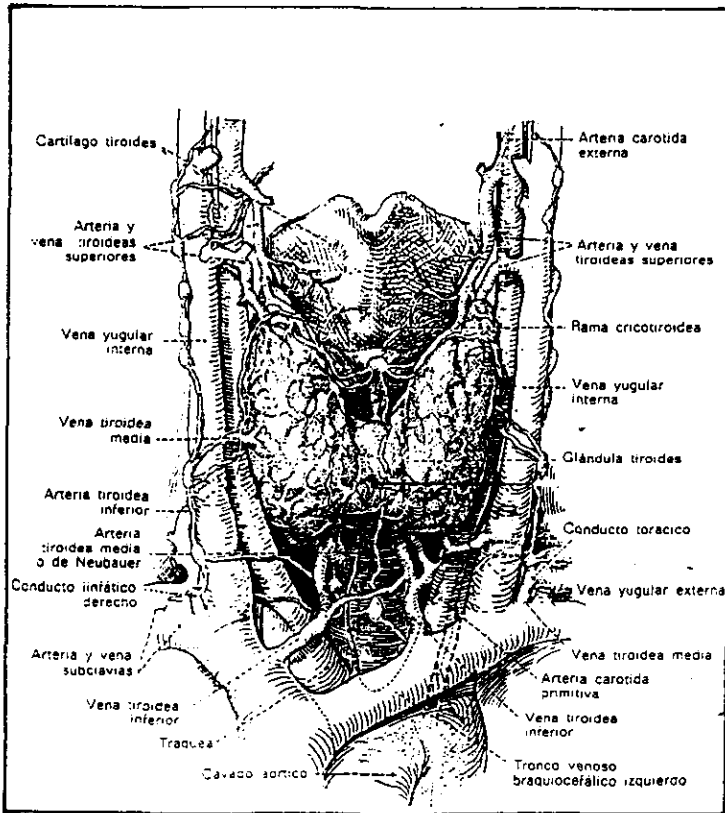


Fig. 1. Glándula Tiroides y su irrigación sanguínea. (58)

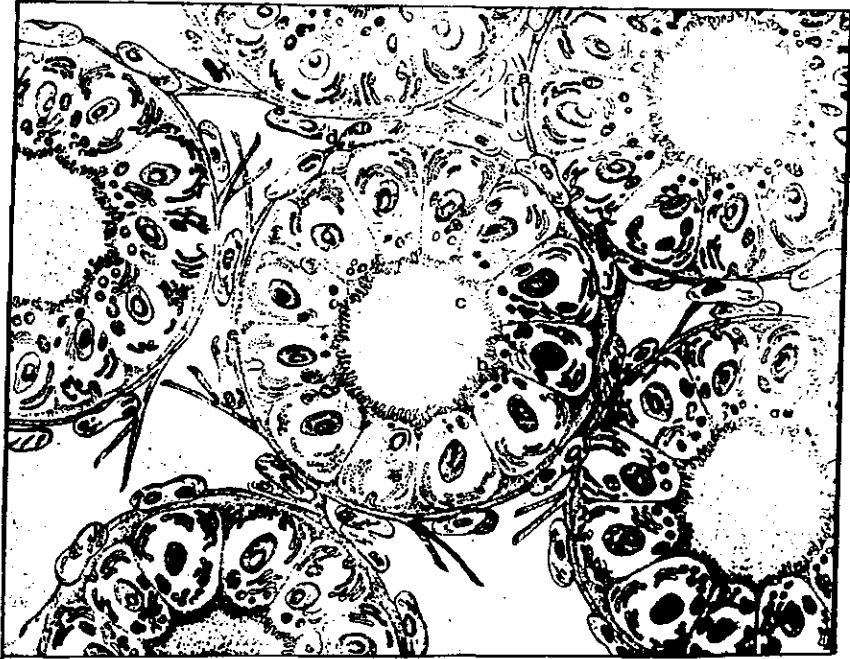


Fig. 2. Estructura celular de la Glándula Tiroides : a. Folículo tiroideo ; b. Célula folicular, lado apical ; c. Lumen lleno de coloide ; d. Célula folicular, lado basal ; e. Plexo capilar ; f. Espacios interfolliculares. (2)

2.2 REGULACION DE LA GLANDULA TIROIDES

La actividad tiroidea está bajo control de la adenohipófisis y ésta a su vez, por el hipotálamo. (18)

El hipotálamo es la parte del cerebro que está ubicada por debajo del tercer ventrículo y directamente por encima de la hipófisis. En el interior del hipotálamo hay neuronas especializadas que se denominan células neurosecretoras y producen neuropéptidos estimulantes e inhibidores (hormonas). La principal función de los neuropéptidos es modificar la secreción de las hormonas de la hipófisis anterior. (2, 36)

La glándula hipófisis está conectada con el hipotálamo por el infundíbulo o tallo de la hipófisis. A través de dicha estructura los neuropéptidos procedentes del hipotálamo migran hacia la hipófisis a través de la circulación portal hipotálamo-hipófisis. (18,36)

La hipófisis sobresale de la superficie inferior del cerebro y reside en una depresión del hueso esfenoides que se denomina silla turca, se dividen en dos lóbulos principales: hipófisis posterior o neurohipófisis que almacena dos hormonas importantes: Hormona antidiurética (también denominada Vasopresina) y Oxitocina.

La adenohipófisis o hipófisis anterior sintetiza seis hormonas: Hormona de Crecimiento (GH), Adrenocorticotropina (ACTH), Prolactina (PRL), Hormona Folículo Estimulante (FSH), Hormona Luteinizante (LH), Hormona Estimulante de Melanocitos (MSH) y por último la Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH) o

Tirotropina (Fig 4). Esta última es la principal reguladora de la función tiroidea ,que a su vez estimula su secreción por el factor hipotálmico TRH. (11,38 65,77,)

TRH es la principal hormona hipotalámica descubierta por Schall y Guillen en 1969. Es un tripéptido neutro, consta de ácido piroglutámico, histidina y prolamida (L-2 pirrolin, 5-L histidin, L-prolina) (70)

El mecanismo de control primario se inicia en el hipotálamo, que secreta la hormona liberadora de tirotropina (TRH), que también se conoce como factor liberador de la hormona estimuladora de la tiroides, la cual se une a receptores de membrana específicos sobre la hipófisis para estimular la síntesis y secreción de TSH.

TSH (hormona estimulante de la tiroides) es una glucoproteína que consta de dos subunidades alfa y beta, posee una vida media de 60 min. y es degradada en su mayor parte por el riñón y en menor proporción por el hígado, tiene un peso molecular de 28 300 D ; tiene 211 residuos de aminoácidos, más hexosas y ácido siálico.

TSH se enlaza con los receptores y activa adenilato ciclasa en las membranas de las células de la glándula tiroides, con el incremento resultante de AMPc intracelular produce los cambios en la función tiroidea, aumentando la producción de las hormonas tiroideas : tetrayodotironina o tiroxina (T4) y triyodotironina (T3). (9, 18, 29, 42, 62,70)

Un efecto inhibitorio de las hormonas tiroideas es la reducción de los receptores a la TRH en la adenohipófisis, lo que provoca una disminución de la efectividad biológica en una concentración dada de TRH, repercutiendo ésto en una reducción de la síntesis de TSH y está a su vez de T3 y T4 ; es decir, las hormonas ejercen

control negativo y positivo sobre la secreción de TSH (mecanismo de retroalimentación negativa de las hormonas), disminuyendo o aumentando la secreción de ésta, modulándose así la biosíntesis hormonal de Tiroxina y Triyodotironina en la glándula tiroides (Fig. 5). (7, 9, 18, 29)

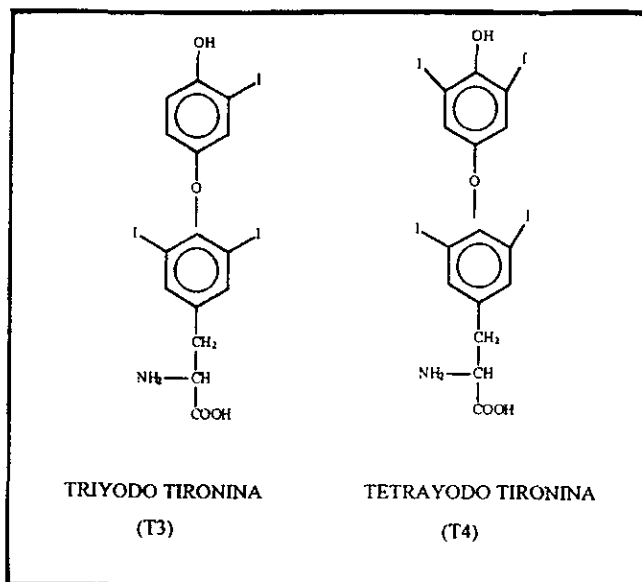


Fig. 3. Estructura molecular de las hormonas tiroideas T3 y T4. (2)

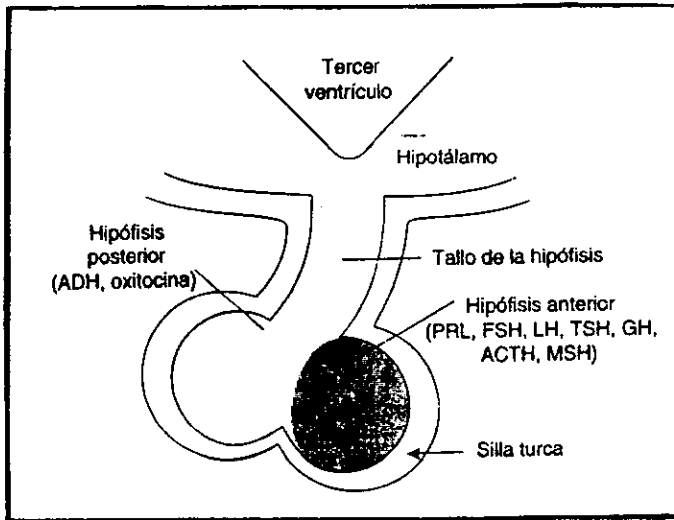


Fig. 4. Glándula hipófisis y secreción de las hormonas : Hipófisis posterior.- ADH (Vasopresina-Hormona Antidurética) y Oxitocina. Hipófisis anterior.- PRL(Hormona Estimulante de Prolactina), FSH(Hormona Foliculo Estimulante), LH(Hormona Luteinizante), TSH(Hormona Estimulante de Tiroides), GH(Hormona de Crecimiento o Somatotropina), ACTH(Hormona Adrenocorticotropica), MSH(Hormona Estimulante de Melanocitos). (2)

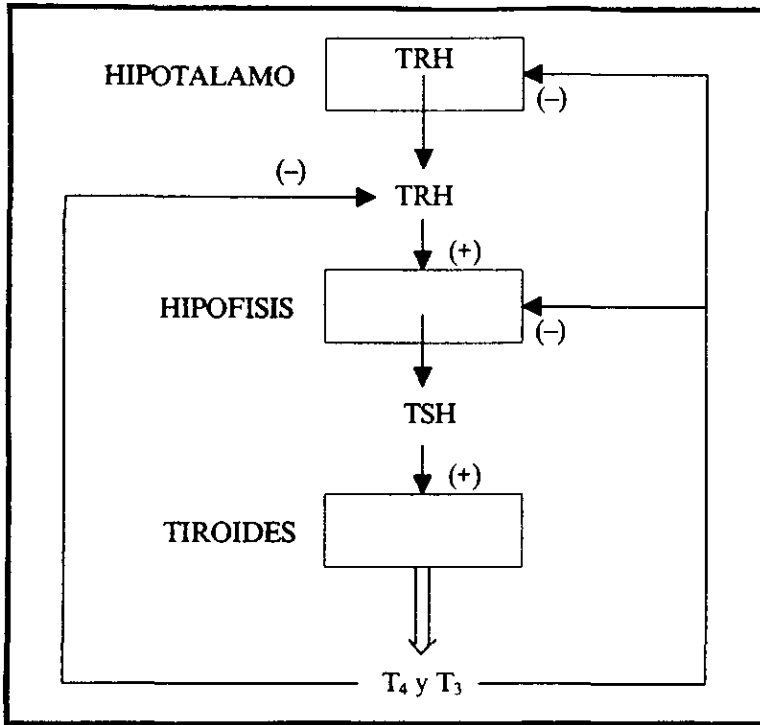


Fig. 5. Sistema de retroalimentación negativa de hormonas. [+ (estimulación)] [- (inhibición)]. El hipotálamo libera la hormona estimuladora de la secreción de la tiotropina (TRH), que actuando sobre la hipófisis libera el TSH a la circulación periférica, TSH llega al tiroides y promueve la síntesis y liberación de T₃ y T₄ por la glándula tiroides. Cuando se encuentran elevadas T₃ y T₄ éstas pueden actuar sobre hipófisis y el hipotálamo inhibiendo la secreción de TSH y TRH ó viceversa. (84)

2.3 BIOSINTESIS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS

Este proceso consiste en los siguientes eventos :

- a) Ingesta y absorción de yodo
- b) Captación de yodo por la célula folicular
- c) Activación de yoduros
- d) Yodinación de Tiroglobulina
- e) Acoplamiento de MIT y DIT para la síntesis de T3 y T4
- f) Liberación de T3 y T4

2.3.1. INGESTA Y ABSORCION DE YODO

La tiroides posee una gran capacidad para captar, concentrar y almacenar yodo del organismo, (29, 56) así se caracteriza químicamente por su elevado contenido en yodo, que asciende a 2mg de yodo/g de peso seco de tiroides. La concentración de yodo tiroideo se encuentra como I^- (yoduro). (12, 18, 77) El yoduro proviene de la dieta, diariamente se consumen aproximadamente 250 μ g, aunque el consumo puede ser mayor debido a la ingesta de pescados, mariscos, sal yodatada y yodatos de la fabricación del pan ; es absorbido por la mucosa intestinal hacia la circulación de la vena porta. Aproximadamente 50 μ g son utilizados para sintetizar hormonas tiroideas y los restantes 200 μ g son excretados por los riñones en la orina. Encontrándose previamente en otros tejidos como son : intestino, glándulas salivales, hígado y sangre. (Fig. 5) (12, 29, 56, 99)

Por lo tanto el yodo circula en el plasma en dos formas :

- a) Como constituyente de las hormonas tiroideas
- b) Como yoduro I^-

2.3.2. CAPTACION DE YODO

La relación proporción I^- en tejido y en sangre es respectivamente 20 : 1 (70) esto significa que un mecanismo de transporte activo debe bombear los iones de yoduro de sangre hacia la tiroides, el bombeo está ligado o acoplado a una $Na^+K^+ATPasa$. (7, 26, 70) Está es una enzima cuya síntesis se activa por TSH y que se encuentra en la membrana basal de la célula folicular de tiroides y la cual funciona como bomba de yoduro.

La bomba controla la excreción y retención del sodio, de tal manera que saca de la célula $3Na^+$ y mete $2K^+$ y el yoduro se introduce por un proceso de transporte activo. (9, 18, 70)

2.3.3. ACTIVACION DE YODUROS

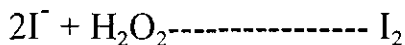
Una vez en el interior de la célula, el yoduro es oxidado mediante un proceso enzimático que requiere peroxidasa tiroidea y peróxido de hidrógeno.

La enzima implicada en la yodinación es la peroxidasa y se encuentra dentro de vesículas junto con la tiroglobulina que es el sustrato, (yodoproteína de la glándula tiroidea, glicoproteína que posee 2 subunidades proteicas de 330Kd y que posee un gran número de tirosinas y una constante de sedimentación de 19s y 150 residuos de tirosilo factibles de ser yodados).

No es activa hasta que es desplazada a la superficie apical de la célula folicular. La enzima oxida yoduro I^- a I_2 activo en presencia de peróxido de hidrógeno como aceptor de electrones.

Por lo tanto la primera etapa de la biosíntesis de las hormonas tiroideas es el transporte de yoduros del líquido extracelular a los folículos tiroideos por medio de un transporte activo a través de un mecanismo denominado "bomba o trampa de yoduros". Una vez dentro de la célula folicular, el yoduro debe ser oxidado, a esta se le conoce como activación de los yoduros. (70)

La reacción que ocurre es :



yodoperoxidasa

2.3.4. YODINACION DE TIROGLOBULINA

Esta etapa de la biosíntesis se caracteriza porque el I "activo" (yoduro oxidado) es incorporado espontáneamente dentro del anillo tirosilo de los residuos de tirosina que posee la tiroglobulina que se localiza en el coloide de la célula folicular. (7)

PASO 1 : Síntesis de Monoyodotirosina

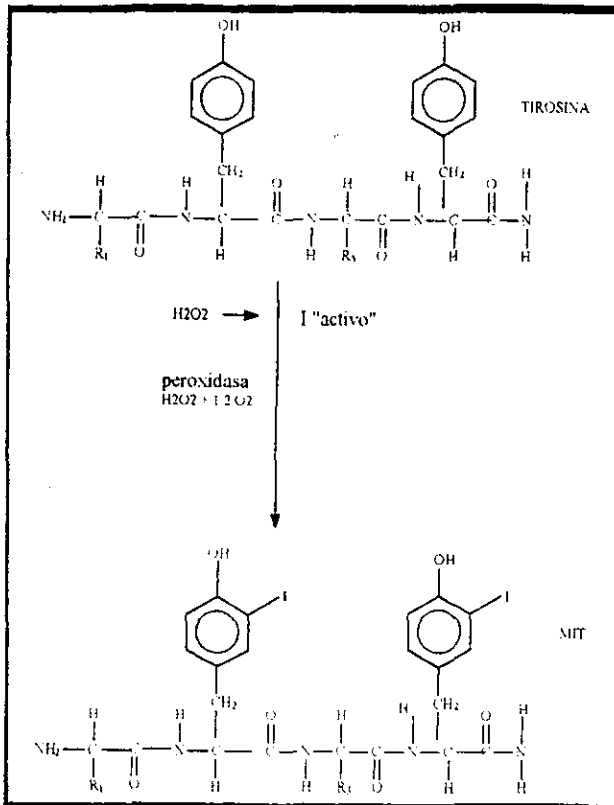


Fig. 6. Yodinación en la posición 3 del anillo fenólico del radical tirosilo, para formarse monoyodo tirosilo (MIT) : la peroxidasa se encuentra en la membrana apical de la célula folicular tiroidea, de manera que reacciona con la tiroglobulina (coloidal) y con I_2 y H_2O_2 que están en el citoplasma cercano a la membrana apical.

PASO 2 : Síntesis de DIT

Las monoyodotirosinas se yodian en la posición 5 del anillo fenólico, bajo las mismas condiciones para formar diyodo tirosina.

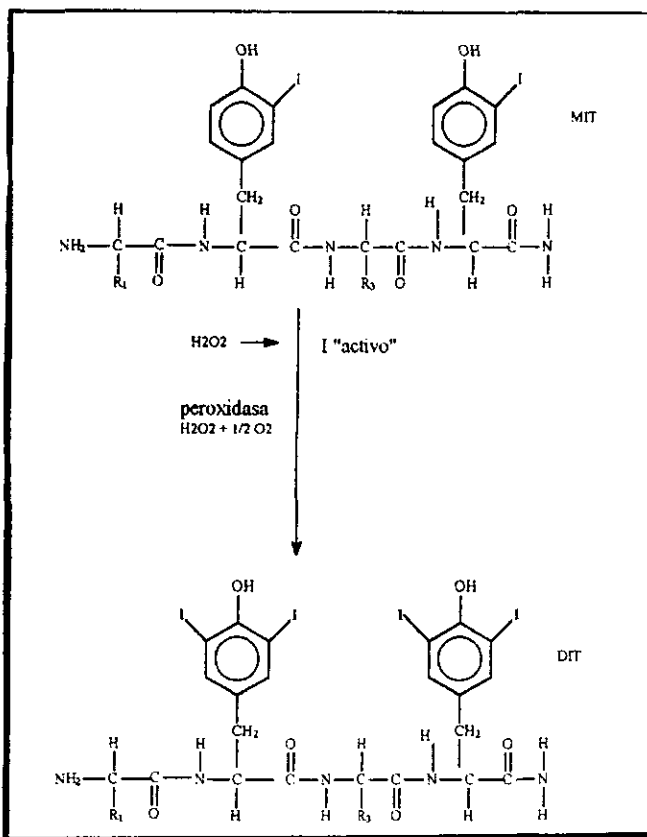


Fig. 7. La yodinación de los residuos de tirosilo en las posiciones 3 y 5 del radical da como producto la diyodotirosina (DIT), in vivo, existe la evidencia de que la organización es facilitada por la peroxidasa. (72)

2.3.5 ACOPLAMIENTO DE MIT Y DIT

PASO 3 : Reacción de acoplamiento.

Oxidación y condensación de MIT y DIT para formar las yodotironinas T3 y T4.

Esta reacción es catalizada por la misma enzima peroxidasa. Este paso representa un acoplamiento enzimático de dos moléculas de yodotirosina. (18, 29, 38, 49, 62, 72)

1. Síntesis de T4 (tiroxina). Si se acoplan dos moléculas de DIT, se forma T4.

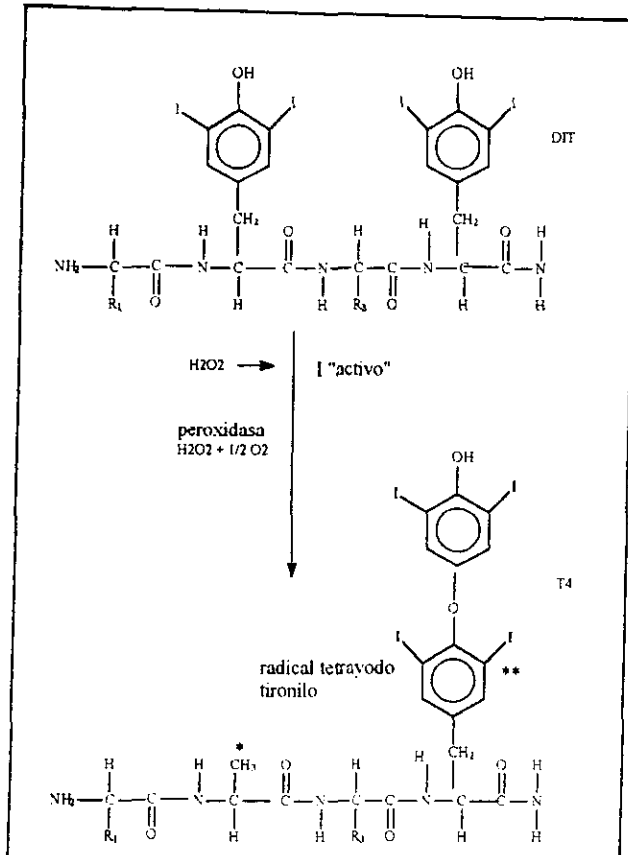


Fig. 8.* Apréciase que un radical tironilo es convertido a metilo (del tironilo el aminoácido se convierte en alanina) y el tironilo capta **el fenol del tironilo anterior.

2. Síntesis de T3 (triyodotironina). Si se acoplan dos moléculas, una de DIT y otra de MIT se forma T3. (72)

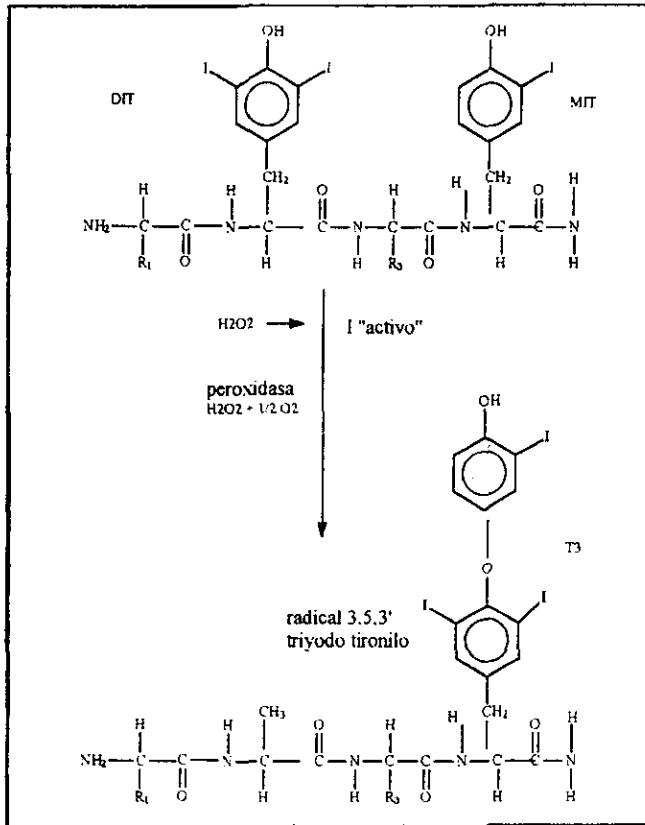


Fig. 9. Es conveniente señalar que uno de los residuos tirosilo (yodados), después del acoplamiento queda como alanina, y la posibilidad de síntesis de T3 o RT3 (triyodotironina inversa o 3,3',5' triyodotironina) es la misma aún cuando se señala que RT3 no es activa y que circulan en sangre ambas y T4. (7, 70)

2.3.6 LIBERACION DE LAS HORMONAS T3 Y T4

La tiroglobulina que tiene los residuos de T3, T4, MIT, DIT (entre otros residuos de aminoácidos), es removida del coloide folicular mediante el proceso de endocitosis e ingresan a la célula folicular. (9, 38, 70, 99)

Las vesículas endocíticas (que contienen tiroglobulina) se fusionan con los lisosomas para formar un endolisosoma ; de esta forma las proteasas lisosomales actúan sobre la tiroglobulina, degradándola hasta aminoácidos ; liberándose también T3, T4, MIT, DIT y RT3. (7, 9,18)

MIT, DIT son desyodinadas o desyodadas (por una desyodasa específica) y el I⁻ se reutiliza. Los aminoácidos son reciclados o metabolizados dependiendo de las necesidades de la célula, T3 y T4 libres difunden hacia la sangre enlazadas a 3 proteínas plasmáticas : Fig. 10 (7, 9, 29, 38, 45, 62, 99)

GLOBULINA FIJADORA DE TIROXINA.- Proteína que se enlaza un 70% de T4 y la que mantiene una unión lábil con T3.

PREALBUMINA FIJADORA DE TIROXINA (TBPA) o TRANSFERRINA.- Enlaza al 20% de la T4 liberada.

ALBUMINA FIJADORA DE TIROXINA (TBA).- Enlaza al 10% de T4 liberada mediante una unión lábil. (12)

Estas uniones con proteínas, ayudan a la dispersión de estas hormonas en el plasma para que sean distribuidas a varias células.

De estas dos hormonas se ha establecido :

	CUADRO No.1	
	T4	T3
Reserva extratiroidea	500µg	100µg
Actividad relativa	100	500-1000
Vida media	7-10 d	2-4 días
Recambio 24 hrs.	80µg	50µg
Entrada a la célula	lenta, difícil	rápida, fácil

Cuadro #1. Características generales de las hormonas tiroideas T3 y T4. (8)

A pesar de que se producen ambas hormonas T4 se convierte a T3. En el proceso degradativo de tiroxina varios datos apoyan la importancia de esta conversión, ya que :

- a) En todos los sistemas estudiados T3 es más potente que T4. (18, 29, 46)
- b) Los receptores nucleares para las hormonas tiroideas prefieren T3 a T4. (8, 16, 18, 46)

En general se asume que T3 es responsable de la actividad biológica de las hormonas tiroideas y que T4 es una prehormona. La conversión de T3 a T4 se lleva acabo en tejidos periféricos que disponen de una desyodinasa (desyodasa) de yodotironina. Por lo tanto T3 posee un mecanismo de acción en células blanco altamente específico.

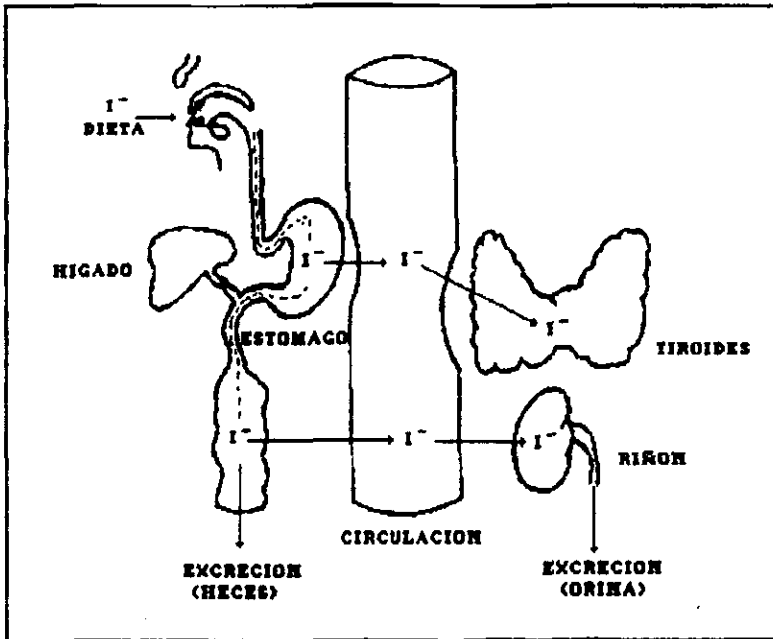


Fig. 10. Ingestión, Distribución y Excreción de yoduros. (47)

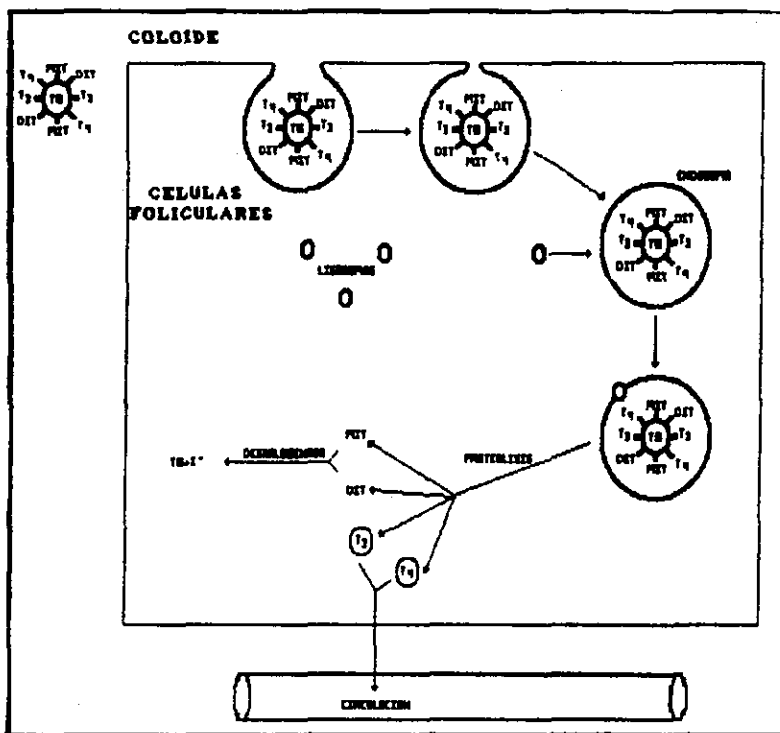


Fig. 11. Liberación de T₃ y T₄. La tiroglobulina (TG) que contiene T₃, T₄, MIT y DIT es removida del coloide folicular mediante endocitosis e ingresan a la célula folicular. Las vesículas endocíticas que contienen TG se fusionan en lisosomas de está forma las proteasas lisosomales actúan sobre la TG, donde es degradada. T₃ y T₄ libres difunden hacia la circulación. (38)

2.4. EFECTOS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS EN LA CELULA BLANCO

2.4.1. EFECTOS METABOLICOS DE TRIYODOTIRONINA

La triyodotironina aumenta las actividades metabólicas de todos o casi todos los tejidos corporales que a continuación se describen :

- a) En las mitocondrias, cuando se administra T3 (triyodotironina) a un animal de experimentación en la mayor parte de las células del organismo aumentan tanto en tamaño como en número, esto es incrementando la fase de fosforilación de trifosfato de adenosina (ATP) y proporcionar energía a la función celular. (38, 46)
- b) Las hormonas tiroideas por ser hidrofóbicas se difunden con facilidad através de la membrana celular para unirse con sus receptores intracelulares de alta afinidad. (1) En la membrana celular T3 favorece el transporte activo de iones, una de las enzimas que aumentan en respuesta a la hormona tiroidea es la Na, K-ATPasa, a la cual hace aumentar a su vez la velocidad de transporte de Na⁺ y K⁺ através de las membranas celulares de algunos tejidos. También se ha registrado a nivel de membrana que T3 facilita el mecanismo de transporte de glucosa y aminoácidos por medio de un mecanismo de transporte activo independiente de los efectos nucleares de T3. (7)
- c) La hormona tiroidea también hace que en las membranas celulares permita el escape de iones Na⁺, lo que activa aún más la bomba Na, K-ATPasa y aumenta la producción de calor.

d) Dado que este proceso consume energía se aumenta la acción calorígenica en el organismo, se ha sugerido que este podría ser uno de los mecanismos por el que la hormona tiroidea aumenta el metabolismo basal corporal. (36, 38)

e) El consumo de oxígeno lo consiguen incrementando la actividad de ATPasa de Na-K (bomba de sodio) ; primeramente en tejidos a los cuales corresponde el consumo basal de O₂ (hígado, riñón corazón y músculo esquelético). La actividad aumentada de Na-K-ATPasa es secundaria al incremento de síntesis de esta enzima ; por lo tanto el aumento del consumo de O₂ probablemente guarde relación con la unión nuclear de la hormona tiroidea. (38)

2.4.2. EFECTOS INTRACELULARES DE T3

a) Existen proteínas citoplasmáticas que tienen poca afinidad y mucha capacidad de captación, fijan T3 en citosol. Estas proteínas fijadoras no son necesarias para transportar T3 al interior del núcleo, T3 penetra en el núcleo en forma libre. (7)

b) Ya en el interior de la célula T3 penetra al núcleo y se une a receptores nucleares (7). La tiroxina también puede unirse a este receptor, pero no lo hace tan ávidamente como T3 y en muchos órganos gran parte de T4 es convertida a T3 en el citoplasma por la enzima II-5-desyodasa, cuya afinidad puede influir en la saturación de los receptores nucleares de T3, al convertir a T4 en T3 (8). La triyodotironona se une a proteínas (no histonas) la cromatina, actuando sobre DNA para aumentar la síntesis de RNAr, RNAt y RNAm. El RNAm dicta la formación de las proteínas en los ribosomas y éstas actúan como enzimas que modifican la función celular. Debe de haber toda una serie de proteínas participando en las acciones, ya que parece imposible, que un grupo aislado de enzimas pudiera producir los múltiples y variados efectos de las hormonas tiroideas. Dentro de éstas proteínas se encuentran : (7,9,64,53)

Acido graso sintetasa
Glucosa-6-P-deshidrogenasa
6-P-glocinato deshidrogenasa
Málico deshidrogenasa
Acil fosfatasa (eritrocitica)
Na⁺K⁺ ATPasa
Ruta de biosíntesis del grupo hemo
Enzimas proteolíticas
Colágena
Hormona de crecimiento de pituitaria
Proteína fijadora a hormonas sexuales y esteroides
alfa-glicerolfosfato mitocondrial

Por lo tanto, T3 se sabe que actúa sobre sus células blanco, que al ser reconocida en diferentes organelos tales como : membrana celular, mitocondria, citoplasma y núcleo (Fig.12). Para esto consideramos pertinente señalar lo más importante sobre el mecanismo de acción que va acompañado de los receptores de esta molécula.

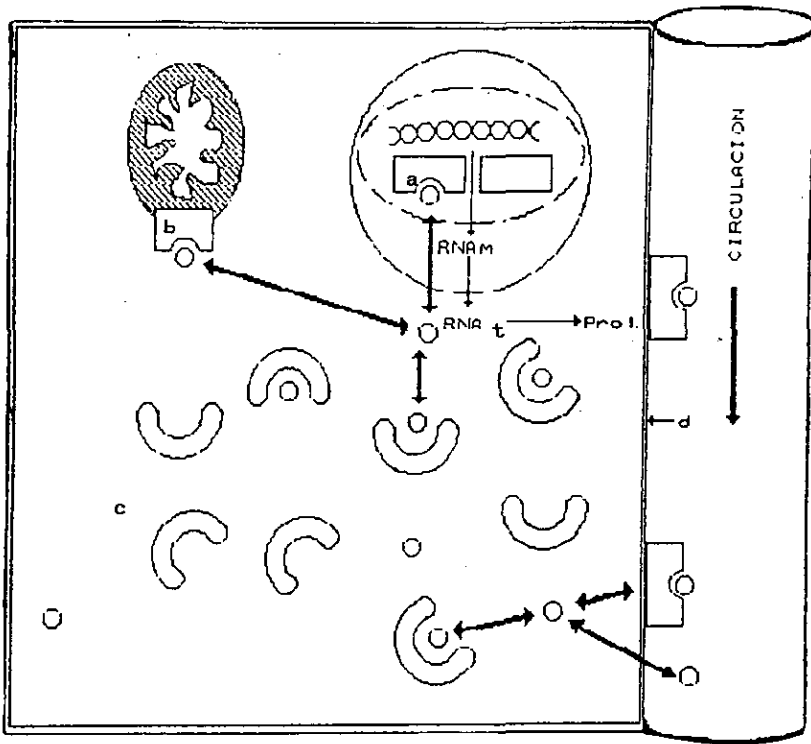



Fig. 12. Los organelos celulares en que es reconocida la triyodotironina (O) y sus receptores proteicos () a los que se les adhiere T3 : a. núcleo, b. mitocondria, c. citoplasma, d. membrana celular. (6)

2.5. MECANISMO DE ACCION

La membrana celular suele contener un sistema de transporte, T3 penetra probablemente por difusión (7); este sistema de transporte distingue entre enantiómeros de hormona tiroidea, y se registra una mayor afinidad por el isómero L-T3 que por el D-T3 ya que el primero tiene mayor actividad biológica (seis veces más que D-T3).

La hormona se une a proteínas intracelulares citoplasmáticas, siendo transportada hasta el núcleo (24), atravesando la membrana nuclear, probablemente por transporte activo (69), aquí interactúa con los receptores nucleares.

Se ha propuesto que T3 en su célula blanco actúa a nivel de receptores nucleares, es decir es fijada específicamente a una proteína receptora en el núcleo celular, originando alteraciones en la expresión de algunos genes. (30, 33, 53, 63, 69)

En 1972 fueron identificados los sitios de fijación de T3 en los núcleos de la hipófisis y posteriormente en el hígado y riñón. Estos sitios constituyen un sistema de capacidad limitada para fijar T3 con gran afinidad. (46)

Posteriormente se demostró que estos lugares nucleares de fijación existen también en el corazón y cerebro, en concentraciones bajas en bazo, testículos y probablemente en las células más importantes del sistema inmune como los linfocitos. En los receptores nucleares hepáticos en rata se ha estimado alrededor de 500 sitios por núcleo que fijan T3 con afinidad 10^{-10} M in vivo. (46)

En cuanto a los receptores hormonales se refiere, se conocen para estrógenos, progesterona, glucocorticoides, aldosterona, ácido retinoico, andrógenos y T3. Los receptores caen en tres familias :

- a) El grupo de glucocorticoides
- b) El grupo de estrógenos
- c) El grupo no esteroide aquí se encuentra el ácido retinoico y los receptores nucleares para T3 (incluye dos subtipos llamados alfa y beta). (13, 21, 32)

La caracterización bioquímica de los TRs revelan un peso molecular de aproximadamente 50 kdaltón con una finidad de T3 de 10^{-10} M. Esta característica física es idéntica en diversos órganos de una misma especie como en rata y diferentes especies como lamprea, trucha, renacuajo, pollos y hombres. (45)

Por ello se ha comprobado que los receptores de la hormona tiroidea están unidos a la cadenas genéticas (concepto aceptado en los años 80's) (67, 86) de ADN.

Al unirse con la hormona tiroidea, los receptores se activan e inician el proceso de transcripción, entonces se forma un gran número de tipos diferentes de ARN mensajero, seguido en otros cuantos minutos y horas, por la traducción de ARN sobre los ribosomas citoplasmáticos para formar cientos de nuevos tipos de proteínas. (39) Se ha comprobado que el receptor pertenece a una familia de proteínas no histonas firmemente unidas a la cromátina que se unen con gran afinidad al ADN de doble hebra.

Estudios de la inducción de gen de transcripción GH de rata por T3 sugieren que los receptores tiroideos (TRs) reconocen secuencias específicas de DNA (elementos de respuesta T3 o TREs) en la región promotora del gen (14). Esta característica de los TRs es importante en los receptores de glucocorticoides, estrógenos, mineralocorticoides, progesterona, (13) (Fig.13) por lo que los dominios de enlace hormonal D-E-F (HBD) tienen la misma similaridad.

Sin embargo, la región más altamente conservada de las proteínas es el dominio C, el dominio de enlace del DNA (DBD) conteniendo aminoácidos básicos organizados dentro de estructuras como dos dedos por dos grupos de cuatro residuos de cisteína, coordinados por un átomo de zinc. (20, 75) región denominada “dedos de zinc” que es el sitio que interactúa con el DNA nuclear.(2, 7, 9)

El acoplamiento de hormona tiroidea con el receptor es necesario para que éste atado al DNA, por lo que se va a unir a diferentes segmentos del DNA o genes, por ello se inducen o reprimen la producción de diferentes productos génicos (enzimas). Lo que se sabe es que T3 actuará estimulando y activando la función transcripcional del receptor mejor que por estimulación del DNA per se (26, 69) aunque esto no está totalmente dilucidado.

En conclusión, los TRs tienen 3 propiedades :

- a) Sitio de acción nuclear
- b) Secuencia específica de reconocimiento
- c) Habilidad para regular la transcripción (32, 21)

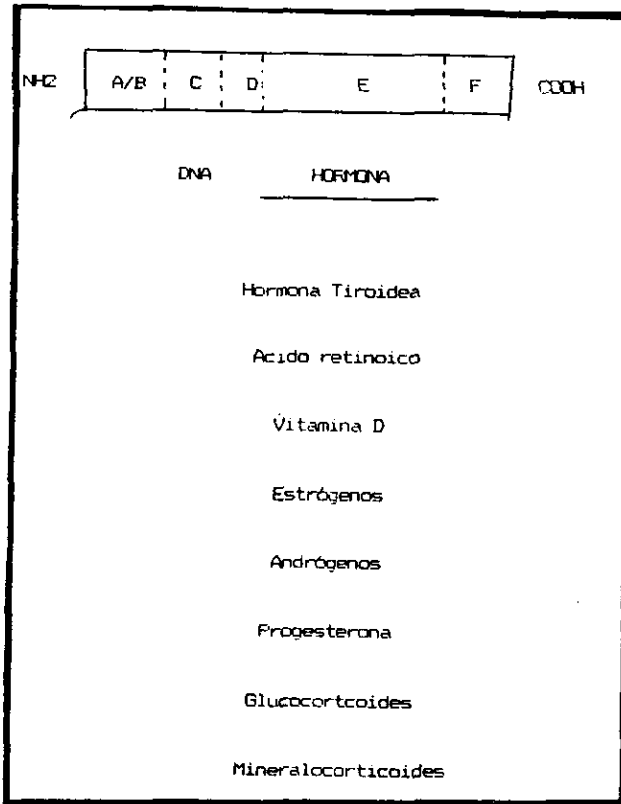


Fig. 13 Superfamilia de receptores hormonales esteroides/tiroides. Prototipo del receptor hormonal nuclear. Los dominios están marcados de la A-F, el dominio C es el DBD. Los receptores indicados tienen estructuras similares. (32)

2.6. LINFOCITO

2.6.1. CICLO CELULAR

Antes de que una célula pueda dividirse, por lo general debe duplicar su masa y todos los elementos que contienen, sólo de esta forma es posible que las nuevas células hijas contengan todos los componentes que necesitan para iniciar su propio crecimiento después de la división ; es por ello que el ciclo celular es la parte principal para el estudio de la división celular. (100, 74)

Las fases del ciclo celular fueron propuestas originalmente por Howard y Pelc en 1953 quienes tomaron en cuenta los dos procesos más fácilmente reconocibles en las células cíclicas : la mitosis y la duplicación del DNA.

La mitosis es evidentemente crucial para el crecimiento y la diferenciación celular, corresponde a la fase M, donde cada una de las dos células hermanas ha recibido un conjunto completo de información genética. Esto se logra mediante la distribución de una cromátida de cada cromosoma en cada célula hija, pero sólo significa una pequeña parte del ciclo vital, por lo que más del 95% del ciclo corresponde al intervalo entre dos mitosis denominado INTERFASE (Fig.14) donde se lleva acabo la mayor parte del trabajo necesario para la preparación del ciclo celular que consta de tres etapas : (38, 95)

a) Un periodo muy limitado y concreto, donde el ADN del núcleo celular y las proteínas cromosómicas (duplicación de histonas) se duplican, recibe el nombre de fase S (s= síntesis) del ciclo celular. Líneas de evidencia sugieren que las histonas son realmente sintetizadas de novo al mismo tiempo como el DNA. Gall en 1959 encontró que la duplicación de histonas va acompañada se la síntesis de DNA. (54)

b) La etapa comprendida entre la fase M y el comienzo de la síntesis de ADN, recibe el nombre de G1 (del inglés GAP = intervalo), es el periodo más variable del ciclo, donde las condiciones determinarán si las células en un momento tardío de la etapa, la célula rebasa o no esta fase. La principal diferencia entre las células que se dividen constantemente y las que se dividen poco reside en el tiempo en que pasan en la fase G1 ya sea días o incluso años.

c) El periodo entre el final de la síntesis de ADN y la mitosis siguiente, recibe el nombre de G2 que dura algunas horas donde se completa la duplicación cromosómica y las células se preparan para la siguiente etapa. (23, 73, 74, 83,100)

Por consiguiente, la interfase está compuesta por sucesivas fases G1, S y G2, que normalmente abarcan más del tiempo total del ciclo celular, además se ha reportado la existencia de una fase dentro del ciclo en el cual se dice que las células se encuentran en un estado estable de reposo (células no ciclicas) y al que se le denominó G0, es por ello que a las células se les ha considerado como una mezcla heterogénea de cuando menos tres poblaciones celulares :

A. Células en constante división (denominadas células ciclicas) como las células proliferativas de la médula ósea o células de la piel donde sólo se dividen para reparar un lesión o compensar la muerte de otras células.

B. Células que completan cierto número de ciclos celulares suficientes para su diferenciación terminal, por ejemplo fibras de musculo esquelético, eritrocitos y células nerviosas.

C. Células en reposo G0, pero que pueden ser estimuladas para entrar a G1, por ejemplo linfocitos y posteriormente terminar la división celular (llamadas células no cíclicas) Fig.14. (23,35,37)

En poblaciones de células que continuamente se están dividiendo, las células progenitoras inmediatamente entran a G1 para iniciar el ciclo. Sin embargo, muchas células en el cuerpo entran en un periodo de reposo G0 el cual comúnmente representa para la célula una diferenciación terminal, y un especial ejemplo es el propio LINFOCITO (se va a dividir sólo en la medida que resulte óptimo para el organismo en conjunto) con aproximadamente 18 h de duración en su ciclo celular, evaluándose un rango de 10-30 h. dependiendo de la técnica y los métodos para analizar los datos. (71)

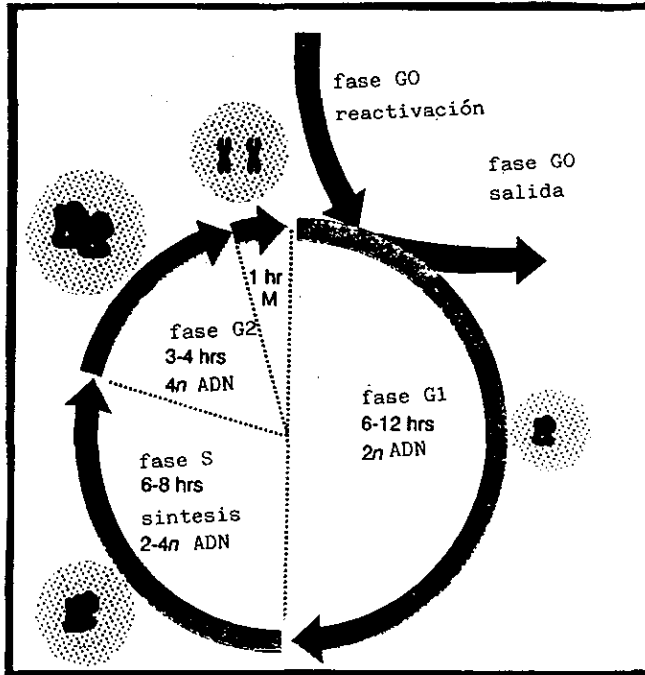


Fig. 14 Interfase dividida en tres periodos : G1, S y G2 la división entre un ciclo celular y el próximo es dada por la mitosis M. Las células pueden retirarse del ciclo dentro de G0 para reentrar a éste. (55)

2.6.2. DESCRIPCION GENERAL

Los linfocitos son componentes esenciales del sistema de defensa inmunitario y constituyen por su número el segundo grupo en importancia de los leucocitos en la circulación periférica. Fig. 15

La mayor parte de ellos se localizan en el bazo, ganglios linfáticos, y otros tejidos linfáticos organizados (amígdalas y placas de Peyer).

Tomando como base su actividad inmunológica predominante se pueden definir dos clases principales de linfocitos : los linfocitos T (timodependientes), que son las principales responsables de las reacciones inmunitarias y los linfocitos B (derivados de la médula ósea), que tienen la capacidad de sintetizar inmunoglobulinas. (10)

La población de células es heterogénea en relación con las propiedades funcionales. En general, las células T se dividen en : células T cooperadoras (células TH) y en células T citotóxicas (células Tc que originan lisis de las células que tienen el antígeno blanco).

Las células T cooperadoras (CD4) se llaman así debido a que proporcionan señales que aumentan las respuestas de la inmunidad mediada por células. Cuando se activan las células T cooperadoras producen linfocinas solubles que pueden regular las actividades de las células T citotóxicas (CD8) y B, así como de monocitos y otras células del sistema inmunitario.

Las células T cooperadoras suelen expresar CD4 y por tanto responden a las CPA, que son las células que expresan moléculas de MHC II (Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II) como parte de la activación.

A su vez los linfocitos cooperadores CD4 se subdividen en TH1 y TH2 , los primeros producen interleucina -2 (IL-2), IFN γ (interferón gama), pero no interleucina 4, interleucina 5. Por otra parte el tipo TH2 produce interleucina 4, interleucina 5, pero no IL-2, ni IFN γ .

En términos generales, las citocinas producidas por TH1 promueven respuestas inmunitarias mediadas por células. (81,82, 91,95,101)



Fig. 15. Estructura celular del linfocito T. Son los glóbulos blancos mayoritarios en la sangre, donde regulan muchas de las respuestas del sistema inmune. (22)

2.6.3. RESPUESTA DE LOS LINFOCITOS AL ESTIMULO

Antes de que se establezca el contacto con el estímulo, estas células ya existen como linfocitos intermitóticos pequeños o de reposo para facilitar su movilización y por ende tener la capacidad de entrar y salir de la circulación con facilidad. es por esta razón que existe un movimiento continuo de células de un área a un compartimiento hacia otro, a este proceso se le denomina RECIRCULACIÓN, donde el número de linfocitos en sangre y tejidos permanece en equilibrio y en condiciones normales. (10,99)

Los linfocitos maduros sufren una serie coordinada de cambios bioquímicos o morfológicos cuando reaccionan ante el estímulo de antígenos o mitógenos específicos, ésto es dependiendo de los receptores de la membrana celular principalmente CD3-TCR. (10)

Una vez estimulado el linfocito pasa a ser célula de proliferación activa y vuelve de nuevo como célula madre, la célula se agranda, sintetiza ácidos nucleicos, proteínas nuevas y experimenta un proceso mitótico. Esta expansión proliferativa aumenta el número de células con capacidad de reaccionar ante los antígenos y dar inicio a una función inmunitaria. Fig.16 (10)

2.6.4. RESPUESTA DE LOS LINFOCITOS EN CULTIVO

Muchas de las actividades funcionales inmunitarias de los linfocitos maduros pueden simularse *in vitro*, donde un tipo especial de respuesta celular es la proliferación de los linfocitos inmunológicos, ésto depende de la presencia de un estímulo exógeno. Los agentes más utilizados son los denominados mitógenos inespecíficos, debido a que éstos tienen la capacidad de provocar que un gran número de células se conviertan en linfocitos proliferantes. Son glucoproteínas llamadas lectinas, derivadas de semillas de plantas, que tienen actividad mitogénica. Estas moléculas tienen especificidad para azúcares y se unen a la superficie celular activando todas las células que responden. Ciertas lectinas actúan específicamente en células del sistema inmunológico ; por tanto, la respuesta a mitogénos será policlonal ya que se activan linfocitos de muchas especificidades diferentes. Cuadro # 2 (10, 22, 98)

CUADRO No. 2

	MITOGENOS LINFOCITARIOS	
MITOGENO	AZUCAR ESPECÍFICO	*TIPO CELULAR ACTIVADO
Fitohemaglutinina	Oligosacárido	Linfocito T
Concavalina A	Alfa-metil-D-manosa	Linfocito T
Mitógeno de fitolaca	N-acetilglucosamina	Linfocito T y B
Lipopolisacárido	-----	Linfocito B

Cuadro # 2. Mitógenos linfocitarios. *La capacidad para estimular varía selectivamente con las especies y el origen celular, lo que sugiere que sólo una subpoblación es capaz de responder al mitógeno. (98)

En base a la respuesta de los linfocitos T en los cultivos se ha propuesto un modelo de estimulación en dos fases : Brevemente, un linfocito G0 necesita primero una señal activadora o de crecimiento la cual causa que entre a G1, esto es normalmente aportado por el antígeno.

La célula podrá iniciar la síntesis de ADN sólo si recibe una segunda señal de proliferación totalmente distinta, la cual puede ser aportada por factores de crecimiento no específicos como por ejemplo IL-2 (interleucina-2) permitiendo así el crecimiento continuo del cultivo in vitro de está células a largo plazo.

Aunque este modelo general puede ser utilizado para expresar a grandes rasgos el proceso de estimulación en linfocitos T, sería conveniente por sus múltiples implicaciones tanto teóricas como prácticas, entender con más detalle los fenómenos que controlan la proliferación celular. (48)

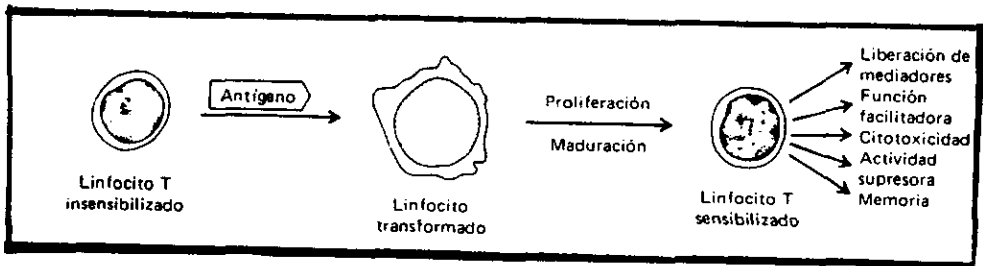


Fig. 16. Respuesta de los linfocitos T maduros ante el estímulo. (10)

2.6.5. CONTROL DEL CICLO CELULAR EN LOS LINFOCITOS T

Los linfocitos del timo pueden ser activados in vitro por exposición a :

- a) Antígenos
- b) Directo contacto con anticuerpos monoclonales en la superficie celular
- c) Lectinas mitogénicas (17)

2.6.5.1. ACTIVACION DE LINFOCITOS

La activación de los linfocitos requiere de por lo menos dos eventos :

1. La primera fase consiste en el procesamiento del antígeno para que pueda ser presentado a un linfocito T CD4 o linfocito CD8 por el macrófago (CPA=célula presentadora de antígeno).
2. Una vez que el linfocito T ha reconocido a su antígeno específico presentado por la CPA, se generan señales en la membrana celular (hidrólisis de PIP2 (fosfatidilinositol difosfato) y aumento del calcio intracelular) que inician el proceso de activación del linfocito ; las mismas señales pueden ser generadas cuando ciertas lectinas o anticuerpos se unen al complejo CD3-TCR. Esta segunda fase incluye el paso de un linfocito T de un estado de reposo a otro de activación.

Esta activación conduce a la división celular y a la expansión del clon activado, esta expansión clonal es seguida de la respuesta inmune, que consiste en la diferenciación de células efectoras que serán las responsables de la eliminación del agente invasor. (17, 27, 80, 88, 91) Las dos señales inducen la expresión de un receptor de alta afinidad, producción de IL-2 y la activación de genes específicos del linfocito. Fig. 17

2.6.5.2. PROCESAMIENTO DEL ANTIGENO

Un 65% de los linfocitos T periféricos expresan las moléculas CD4 y un 25-35% los CD8, ambas glucoproteínas cumplen el papel de moléculas accesorias en la activación de los linfocitos T por antígenos presentados por las moléculas HLA. Al interactuar con las moléculas HLA de clase II, CD4 estabiliza la interacción entre la célula T y la CPA que presenta el péptido, la glucoproteína CD8 estabiliza la unión de las células T CD8 (fundamentalmente citotóxicas) con las moléculas de clase I de las células diana. Se ha demostrado experimentalmente mediante el uso de mutantes que la capacidad de una célula T citotóxica de destruir a una célula diana depende de que TCR y la molécula CD4 reconozca a la misma molécula clase I. (22, 91) Fig. 17

Una vez que el receptor de la célula linfocítica (TCR) ha recibido el complejo peptídico-molécula HLA y se han generado las interacciones celulares adecuadas que generaron las señales coestimuladoras, se inician rápidamente cambios en la membrana y el citoplasma que proceden a eventos más tardíos de la activación T (producción de citocinas y división celular) (22)

En este punto es útil recordar que en ausencia del complejo molécula HLA, el TCR puede ser activado por ciertas lectinas como la Fitohemaglutinina (PHA phaseolus vulgaris frijol-rojo). (79)

2.6.5.3. HIDROLISIS DEL PIP2 Y AUMENTO DEL CALCIO INTRACELULAR

- a) Pocos segundos después de que un ligando se une al TCR, el PIP2 (fosfatidilinositol difosfato) que se encuentra unido a la membrana es hidrolizado por la fosfolipasa C.
- b) Proteínas que unen GTP (proteína G) y proteínas tirocinasas (PTC) parecen intervenir en la transducción de señales del complejo CD3-TCR a la fosfolipasa C.
- c) De la hidrólisis del PIP2, inducido por la fosfolipasa C, se genera (IP3) inositol 1,4,5-trifosfato y diacilglicerol (DAG).
- d) El IP3 es responsable del aumento transitorio del calcio, probablemente estimulando la liberación de depósitos intracelulares.
- e) La producción del DGA y el aumento del calcio, activa la proteincinasa C (PKC), involucrada en procesos reguladores y proliferativos. (22, 39, 87)

La mayoría de los linfocitos circulan en el organismo en un estado de reposo. Después del proceso de activación, las células clones que han reconocido específicamente el antígeno o lectina comienzan un proceso de expansión clonal. Este proceso implica que los linfocitos T pasan del estado de reposo de G₀ a G₁ a sintetizar ADN (estadio S del ciclo celular), seguido de la división en dos células hijas. (23)

Después de cerca de dos días, se detiene la síntesis de interleucina-2 mientras que los receptores para esta interleucina permanecen hasta una semana si las células no se reactivan. Por consiguiente, existe una limitación interna al crecimiento de la célula T y su expansión clonal. Cuando se estimulan las células T secretan interleucina-2 que interactúa con receptores para dicha interleucina, y determinar el crecimiento. Esto puede ser una manera "autocrina" si es estimulada la misma célula que liberó la interleucina-2. Si la célula que responde en la vecindad de la productora, entonces la reproducción es de tipo "parácrino". (98)

La interleucina-2 no está presente en valores detectables en sangre, por tanto, no hay actividad "endócrina", es decir, acción a distancia.

Para lograr la proliferación clonal, las señales que se han generado en la membrana y que se acaba de describir debe acompañarse con la transcripción de los genes que aseguran la producción de las proteínas que intervienen en la expansión clonal. Es por ello que la actividad transcripcional de los linfocitos T activados está asociada a la proliferación.

2.6.5.4. ACTIVIDAD TRANSCRIPCIONAL DE LINFOCITOS T ACTIVADOS

En los últimos diez años se ha dirigido la atención hacia los genes que producen cáncer (oncogenes) y los proto-oncogenes (u oncogenes celulares) ya que aparecen a varios niveles del control normal del ciclo y tienen importancia decisiva en la regulación del crecimiento y diferencias normales en fase G1 del ciclo celular.(3,22, 85)

Se conocen más de 20 proto-oncogenes. Sus productos son proteínas que se encuentran en el núcleo, el citoplasma y la membrana citoplásmica de las células. Los más comunes son : c-erb, c-myc,c-src,c-ras,c-fos,c-jun, y el nur/77 (el cual está relacionado con el receptor tiroideo nuclear).

Un ejemplo importante, es el proto-oncogen c-myc cuya expresión está aumentada después de la activación de los linfocitos T, se incrementa 1hr después de la estimulación del complejo TCR-CD3 llegando al pico de expresión de sus RNAm de la IL-2 a las 6hrs, lo que representa un claro evento de activación linfocítica controlando la transición de G0-G1 en linfocitos B y T no neoplásicos. (78, 15)

Otro ejemplo interesante relacionado con la hormona tiroidea, es el gen *nur/77* teniendo una característica particular, ya que sintetiza una proteína similar al receptor tiroideo nuclear que fue identificado por clonación del DNA con una secuencia de 601 aa que está expresado durante la transición de G0-G1 en fibroblastos de ratón.

La aparición de los niveles de RNAm de *nur/77* no está restringido a fibroblastos, sino también en hígado de ratón y posiblemente en otras células eucarióticas. (40)

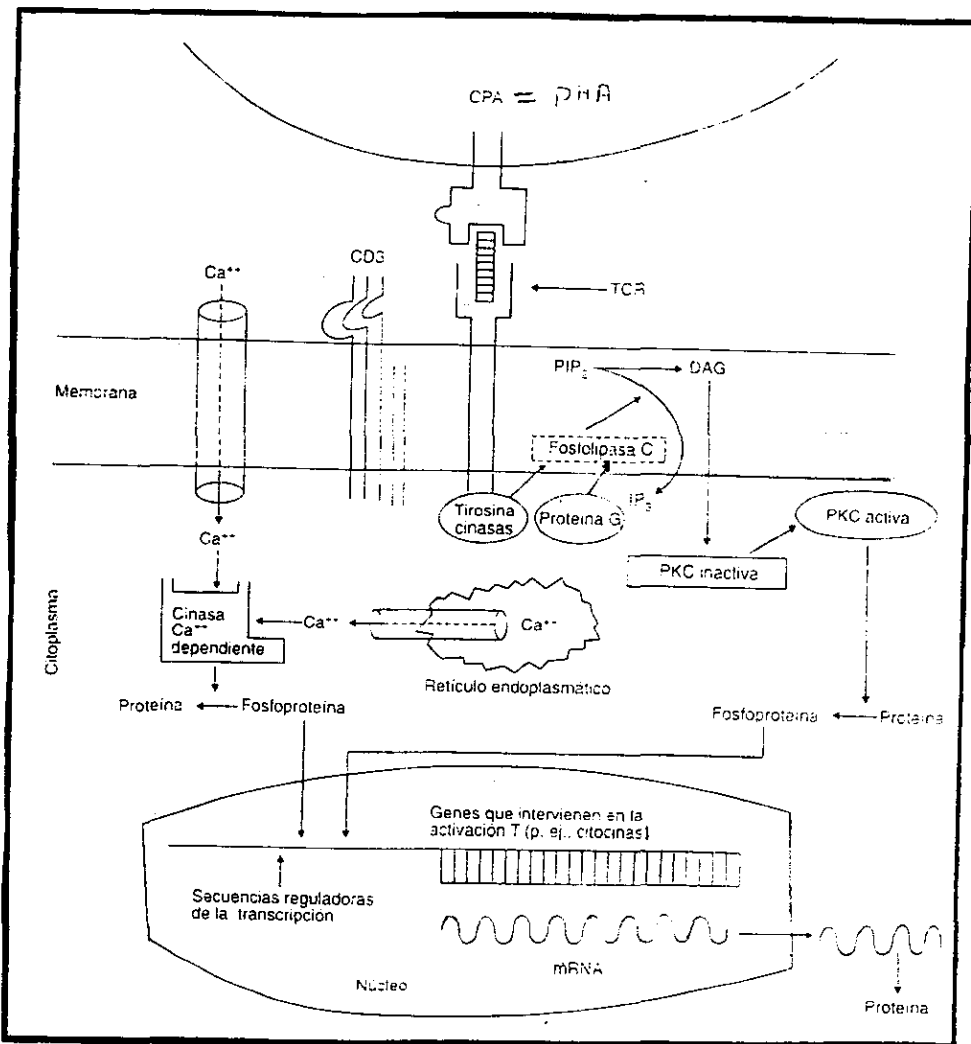


Fig. 17. Eventos bioquímicos tempranos en la activación linfocitaria. El linfocito T reconoce la Fitohemaglutinina (PHA) por medio del receptor de la célula linfocítica (TCR), donde intervienen señales a nivel membranaral como por ejemplo : hidrólisis de fosfatidilinositol difosfato (PIP₂) y de calcio intracelular. Una vez activado el linfocito se secreta interleucina-2 (IL-2), de está manera la célula entra al ciclo celular después de salir de G₀. (22)

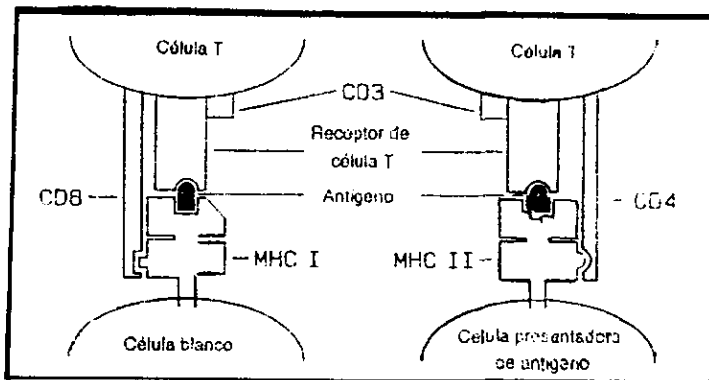


Fig. 18. Moléculas comprometidas en el reconocimiento de la célula T. Las células T sólo reconocen el antígeno en relación con productos del Complejo Principal de Histocompatibilidad MHC. (99)

2.7. EFECTOS DE T3 EN DIFERENTES TEJIDOS

Ahora es comprendido que las hormonas tiroideas juegan un papel fundamental en el funcionamiento y metabolismo celular de prácticamente todos los tejidos.

En estudios con ratas recién nacidas a las que se les provoca un cuadro de hipotiroidismo y a las que se les dosifica T3, se estudian células de glándulas salivales y se aprecia el efecto de inductor de diferenciación celular, sin embargo queda dudoso el papel de esta hormona como un inductor de proliferación celular. (25)

Otro trabajo, realizado in vivo con ratas, trabajando con células de testículo, se observa que este órgano responde a la hormona tiroidea creciendo, e incrementando el número de células de Leydig (productoras de testosterona, hormona masculina), aumentando el número de células de Sertolli mismas que realizan la espermatogénesis, entre otros efectos detectados. En este caso la triyodotironina es un agente molecular inductor de diferenciación celular y también de proliferación. (44)

Existen estudios al respecto realizados con células neuronales donde el tratamiento con T3 de las células que expresan TRB1 bloquea la proliferación por la captura de células en G0/G1 e induce morfología y diferenciación funcional de células Neuro-2a y esto es inducido por el marcado incremento de acetilcolinesterasa. Así como también se incrementa la expresión de RNAm de glutamin sintetasa en células epidermales como respuesta a triyodotironina T3, actuando a nivel nuclear con los receptores para la hormona (NT3R). (31, 52)

Otra enzima donde se ve incrementada la actividad de los RNAm por la acción de la triyodotironina es la triacilglicerol lipasa en células hepáticas, esto ocurre durante la incubación de las células por 24 y 48 hrs donde aumenta un 33% y 90% respectivamente comparado con el control. (60)

Otros estudios probados en otras células a las cuales se les ha probado la acción de T3 son los osteoblastos, donde la hormona estimula la expresión de IGF-I (factor de crecimiento de insulina) en la línea celular MC3T3-E1, las células fueron creciendo de 5 a 7 días con concentraciones de triyodotironina de 10^{-11} - 10^{-6} . Concluyendo que la expresión de IGF-I tiene que ver con las características fenotípicas de maduración de los osteoblastos. (97)

Otro efecto importante en hueso específicamente en osteoclasto por la acción de la T3, (1pmol/l - 1 μ mol/l) y es que se ve incrementado la resorción tanto in vivo como in vitro. Estas células son aisladas de ratas de neonatos las cuales fueron incubadas en medio UMR106. (1)

Todas estas evidencias y el papel que desempeña esta hormona en la diferenciación y proliferación celular, nos lleva a considerar que ella puede actuar como un agente que interviene en el ciclo celular tanto in vivo como in vitro en diversas células eucarióticas. Donde el cultivo de linfocitos humanos podría tener estos efectos, considerando que estudios de este tipo de células no han sido realizados.

2.8. PARAMETROS DE ESTUDIOS

Son tres los parámetros que se evalúan en este trabajo, primeramente el Índice Mitótico (IM), Cinética de Proliferación Celular (CPC), e Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICHs).

Los dos primeros van relacionados con la proliferación celular del linfocito ya que el IM , es indicativo de la capacidad de división celular, en la cual una célula madre origina a dos células hijas. La CPC es una prueba que se utiliza para evaluar el comportamiento de las poblaciones celulares que están en división. Finalmente el ensayo de ICHs permite detectar la capacidad genotóxica de diversas sustancias., para nuestro caso nos permite conocer la respuesta de la hormona Triyodotironina (T3) al tener o no efecto sobre el ácido desoxirribonucleico (ADN), es por ello que se incluye una breve explicación de este parámetro.

2.8.1. INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS

El estudio de los Intercambios entre cromátidas hermanas permite conocer la repuesta celular ante agentes que tienen efecto sobre el ácido desoxirribonucleico.

Estos cambios como su nombre lo indica, son intercambios de segmentos simétricos y equivalentes entre cromátidas de un mismo cromosoma. (5, 19 60)

En 1958 los pioneros J. Herbert Taylor y col. demostraron y publicaron la existencia de los ICH detectados citológicamente en las células de la raíz de *Crepis capularis* (87). Mediante el análisis autorradiográfico de dichas células, cultivadas en presencia de timidina tritiada, ellos observaron intercambios de segmentos entre una cromátida marcada y otra no marcada (93).

Más tarde los intentos para detectar la síntesis de ADN, se basaron en la incorporación de un átomo pesado y polarizable como el bromo en forma de un análogo de base en el ADN, llamado bromodesoxiuridina (BrdU) y que, por tanto, mostrara las propiedades luminiscentes de él o los colorantes apropiados, unidos al ácido desoxirribonucleico (ADN).

Los primeros experimentos a mediados de 1972 por Latt y Sugivama (34), se centraron en el uso de la quinacrina y sus derivados. Sin embargo, debido a que no había un marcado efecto en la sustitución de la BrdU y la fluorescencia de la quinacrina no se dio el seguimiento para continuar con este procedimiento hasta que Grapp y Hilwigo encontraron nuevos tipos de colorantes como los bis-bencimidazoles que al unirse al ADN podría servir para la detección citológica de la incorporación y por tanto de la síntesis de ADN.

Poco después se observó que la emisión de fluorescencia del Hoescht 33258 era inestable a la iluminación y donde las células sustituidas con BrdU y expuestas al colorante eran claramente sensibles a la luz.

Debido a que la fluorescencia se extingue rápidamente durante su observación, Latt requería entonces un microscopio de fluorescencia (50, 51). Perry y Wolf en 1974 propusieron un nuevo método utilizando además de la BrdU, el colorante Giemsa y la exposición de las preparaciones a un buffer caliente (2xSSC a 60°C), la observación de dicha técnica puede ser explicada en términos de una fotólisis y una elución por el buffer caliente (34). Así esta técnica de tinción con Giemsa facilitó el análisis de los ICH y por tanto su utilización en un laboratorio sin necesidad de un microscopio de fluorescencia.

El ICH es visualizado al microscopio al permitir a las células tratadas pasar a través de dos ciclos de replicación del ADN, en la presencia de 5-Bromodesoxiuridina (5-Brdu), la cual es incorporada en el ADN replicado. Las células son teñidas con un colorante fluorescente, el cual permite la diferenciación entre cromátidas que contienen 5-Brdu de las que no lo contienen.

El ensayo de ICHs se puede llevar a cabo a partir de un gran número de tejidos que van desde la sangre periférica, aspirados de médula ósea, piel, líquido amniótico, vellosidades coriónicas y sangre periférica en este último caso usando un sistema de cultivo de corta duración *in vitro*, como los linfocitos humanos, los cuales son de fácil acceso para estudiar el daño biológico inducido por una gran variedad de compuestos. La base para usar el sistema de linfocitos sanguíneos es que estas células usualmente permanecen en etapa G0/G1 en la circulación periférica y normalmente no se dividen *in vivo*. (85)

Es conveniente evaluar los ICH mediante los cultivos celulares a partir de un gran número de tejidos que van desde la sangre periférica (Linfocitos), aspirados de médula ósea, piel, líquido amniótico y vellosidades coriónicas (85). El fundamento de los cultivos celulares es estimular la división celular adicionando a los cultivos agentes mitógenicos por ejemplo, en los cultivos de linfocitos se adiciona Fitohemaglutinina, la cual estimula la proliferación de los linfocitos T, posteriormente las células se detienen en la metafase de la mitosis al adicionar un agente que impida la migración de los cromosomas como es la colchicina, pudiendo de esta manera ser visualizados los intercambios entre cromátidas hermanas mediante la tinción diferencial ya mencionada. (43) (Fig. 18)

El significado biológico y el mecanismo por el cual se producen los ICH'S aún no se conoce, pero algunas líneas de evidencia indican que :

- (a) Se sugiere que los ICH'S son un fenómeno a la expresión fundamental para la célula.
- (b) Estos son producidos ya sea por daño o por inhibición de la síntesis del ADN.
- (c) Las lesiones involucradas en la inducción de ICH no son conocidas.
- (d) Es posible que los ICH sea la consecuencia de un proceso que permite a la célula dividirse, aún en presencia de lesiones en su ADN.
- (e) Ocurren espontáneamente durante el proceso de replicación del ADN (fase S), donde es posible evaluar el efecto de compuestos a nivel del material genético. (61, 61, 95).

El efecto que dichos agentes puede tener sobre las moléculas de ácido desoxirribonucleico (portadora de la información genética, es quizás el más relevante, por el papel biológico fundamental que estas desempeñan. (60)

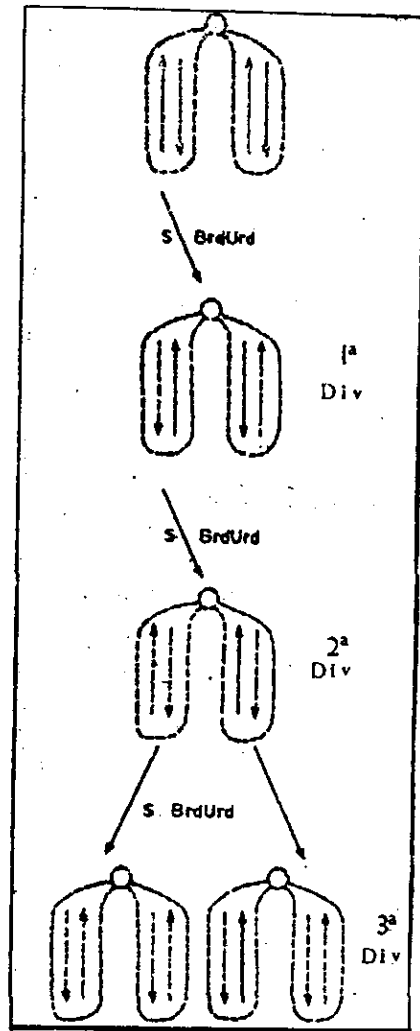


Fig. 19. Diferenciación de Cromátidas Hermanas. Las dobles bandas del ADN se representan como flechas, y las cadenas sustituidas con BrdU durante la síntesis de ADN con una línea quebrada. (60)

OBJETIVOS

III. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GENERAL

Determinar *in vitro* si la hormona triyodotironina produce algún efecto en la proliferación celular al administrarla en cultivos de linfocitos humanos sola y con fitohemaglutinina.

3.2. OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Realizar cultivos celulares de linfocitos humanos, con fitohemaglutinina, la hormona Triyodotironina y ambas moléculas, con la finalidad de establecer si la hormona tiroidea tiene efecto mitógeno.
- b) Evaluar la cinética de proliferación celular de los diferentes cultivos con el fin de detectar un posible efecto de la Triyodotironina.
- c) Determinar la frecuencia de Intercambios de cromátidas hermanas inducidos por la hormona Triyodotironina para establecer una posible interacción con el ácido desoxirribonucleico (ADN).
- d) Evaluar si la hormona triyodotironina en cultivos de linfocitos humanos produce efectos citogenéticos sobre la proliferación celular.

METODOLOGIA

IV. MATERIAL Y METODOS

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Se obtuvieron 10 ml de sangre venosa en condiciones de esterilidad y asepsia de un individuo del sexo femenino con 26 años de edad sin haber consumido medicamentos, tabaco, drogas y clínicamente normal.

4.2. REACTIVOS

Triyodotironina (liotironina) MERCK

Fitoheماغlutinina

Medio McCoy 5A modificado con L-glutamina-bicarbonato de sodio (in vitro)

5-bromo-2'-desoxiuridina (5-BrdU) SIGMA [$1.8 \times 10^{-3} M$]

Colchicina (0.04%)

Hidróxido de sodio NaOH (0.01N)

Cloruro de potasio KCL (0.075M)

Solución fijadora [ácido acético glacial.metanol (1 : 3)]

Colorante bisbenzimidida de Hoeschst 33258

Buffer diferencial fosfato-citrato (pH=7.0)

Solución salina citratos (SSC)

Heparina

Giemsa (2% con buffer pH=6.4) SIGMA

4.3. MATERIAL DE CRISTALERIA

Frascos de cultivo celular estériles

Pipetas estériles

Tubos de centrifuga punta "V"

Pipetas pasteur estériles

Puntillas para micropipeta

Vasos de coppling

4.4. EQUIPO

Microscopio óptico (ZEISS)

Campana de flujo laminar horizontal (EN VIRCO EACI)

Estufa (BLUE M)

Centrífuga (INTERNATIONAL EQUIPMENT CO)

Vórtex

Bomba de vacío

Micropipetas de 10-50 l

50-100 l

4.5. METODOLOGIA

4.5.1. PREPARACION Y DISTRIBUCION DE LOS CULTIVOS

a) En frascos de cultivo celular estériles adicionar :

1ml de medio de cultivo McCoy 5A modificado

0.3 ml de Fitohemaglutinina

0.5 ml de sangre entera

b) Mezclar

c) Incubar en estufa a 37°C, 24 h.

d) Tratar a los cultivos en condiciones estériles con las diferentes concentraciones de T3 como se indica en el siguiente cuadro :

LOTE	TRATAMIENTO	CONC. DE T3 EN CADA FRASCO DE CULTIVO $\times 10^{-3} \mu\text{mol/l}$
CONTROL 1	CON PHA	0.0
CONTROL 2	T3 SIN PHA	5.88
PROBLEMA 1	T3 CON PHA	0.588
PROBLEMA 2	T3 CON PHA	3.52
PROBLEMA 3	T3 CON PHA	5.88
PROBLEMA 4	T3 CON PHA	8.23

(Aclarando que T3 se adiciona a las 24 hrs. de incubación del medio de cultivo)

PHA=Fitohemaglutinina ; T3=Triyodotironina.

- e) Adicionar 45µl de 5BrdU como marcador de las cromátidas.
- f) Mezclar ligeramente e incubar a 70 h.
- g) Adicionar posteriormente dos gotas de colchicina 0.04%. Incubar hasta completar 72 h.

4.5.2 COSECHA DE LINFOCITOS

- a) Sacar los cultivos de la estufa y transferir su contenido a tubos punta cónica y centrifugar a 3000 r.p.m., 10 min.
- b) Retirar el sobrenadante con pipeta Pasteur y adicionar 8 ml de KCl 0.075M a 37°C.
- c) Incubar 30 min.
- d) Centrifugar los tubos 5 min. a 3000 r.p.m.
- e) Desechar el sobrenadante.
- f) Resuspender constantemente el paquete celular con ayuda de un vórtex, durante este proceso.
- g) Adicionar 8 ml de solución fijadora ác. acético-metanol (con agitación constante para evitar la formación de grumos que podrían interferir con los resultados).
- h) Dejar incubar a temperatura ambiente 30 min.
- i) Repetir el proceso de fijación dos veces de 15 min. cada uno (del inciso d en adelante).
- j) Centrifugar después de la última fijación y dejar un poco de solución fijadora para hacer una suspensión celular adecuada.
- k) Resuspender el paquete celular.

- l) Tomar una alicuota con pipeta Pasteur y dejar caer a un portaobjetos limpio y desengrasado 3 gotas de esta suspensión.
- m) Secar las laminillas al aire.

4.5.3. TINCION DIFERENCIAL

- a) Dejar madurar (una vez secas las laminillas) durante dos días es decir guardarlas protegiéndolas del aire, polvo, etc.).
- b) Adicionar 6 gotas de bisbenzimidida de Hoescht 33258 (concentración de 1 g/ml) y montar sobre las preparaciones los cubreobjetos, y mantener en oscuridad durante 20 min.
- c) Incorporar solución buffer diferencial a los portaobjetos montados a manera de crear un cámara húmeda.
- d) Colocar las preparaciones a la luz negra (luz ultravioleta longitud de onda cercana a 10^{-7} cm) durante aproximadamente 1hr a una distancia de 1 cm.
- e) Sumergir las preparaciones en solución salina de citratos (SSC) durante 15 min./60°C y teñir con Giemsa pH=6.4 durante 7 min.
- f) Enjuagar con agua corriente para retirar exceso de colorante.

4.5.4. OBSERVACION DE LAMINILLAS AL MICROSCOPIO.

- a) Observar las laminillas al microscopio óptico, enfocadas a 10X y buscar células tipo (en división celular con cromosomas expuestos).
- b) Realizar observaciones a 40X y 100X.

- c) Utilizar el objetivo de 100X (con aceite de inmersión) hasta contar 100 células, distinguiendo el número de ellas en metafase, para determinar el índice mitótico.
- d) Hacer la búsqueda por cultivo de 100 metafases.
- e) Clasificar considerando cuántas metafases se encuentran en : primera, segunda y tercera división, tomando en cuenta la captación del marcador 5-BrdU en las cromátidas para el estudio de la CPC.
- f) Buscar y contar además 25 metafases de segunda división por cultivo para el estudio de ICH, tomando en cuenta la captación del marcador 5-BrdU.

4.5.5. Análisis Estadístico

- a) IM e ICH . La prueba de Kruskal-Wallis $\alpha= 0.05$ y la Prueba de Comparaciones Múltiples de Dunn $\alpha= 0.05$
- b) La Cinética de Proliferación Celular fue evaluada con la prueba de ANOVA $\alpha= 0.05$.

RESULTADOS

VI. RESULTADOS

Los resultados de los parámetros evaluados se muestran en las tablas 1,2,3 con su correspondiente gráfica A, B, C.

Los cultivos de linfocitos humanos tratados solo con Triyodotironina (T3) no fueron estimulados por la hormona ; de tal forma que se expusieron a la Fitohemaglutinina como un agente mitogénico, además de la T3 a diferentes concentraciones obteniendo en este caso la respuesta a la división celular, como se observa en la tabla 1.

En relación al Índice Mitótico (IM) se observa que los promedios van en aumento, como lo comprueba el análisis de regresión lineal (ecuación $y=mx+b$), mostrando una relación dosis-respuesta con un coeficiente de correlación de 0.84 (gráfica B'), aunque no todas las concentraciones presentan diferencias estadísticamente significativas así lo indica la prueba de Kruskal-Wallis (ANOVA) y la Prueba de Comparaciones Múltiples de Dunn con $\alpha= 0.05$, excepto la más alta concentración de T3 $8 \times 10^{-3} \mu\text{mol/l}$, que indican un valor de 39.75 ± 5.909 con respecto al control 14.75 ± 1.893 como se muestra en la tabla 1 y gráfica A.

Los resultados de la Cinética de Proliferación Celular CPC con las diferentes concentraciones de Triyodotironina se muestran en la tabla 2 y gráfica B. e indican que no hay variación estadísticamente significativa (como lo indica la prueba de ANOVA $\alpha= 0.05$) al igual que el Índice de Replicación (IR) y el Tiempo Promedio de Generación (TPG) que aparecen en la misma tabla. El control que contiene solo T3 ya no se presenta puesto que no hubo crecimiento celular.

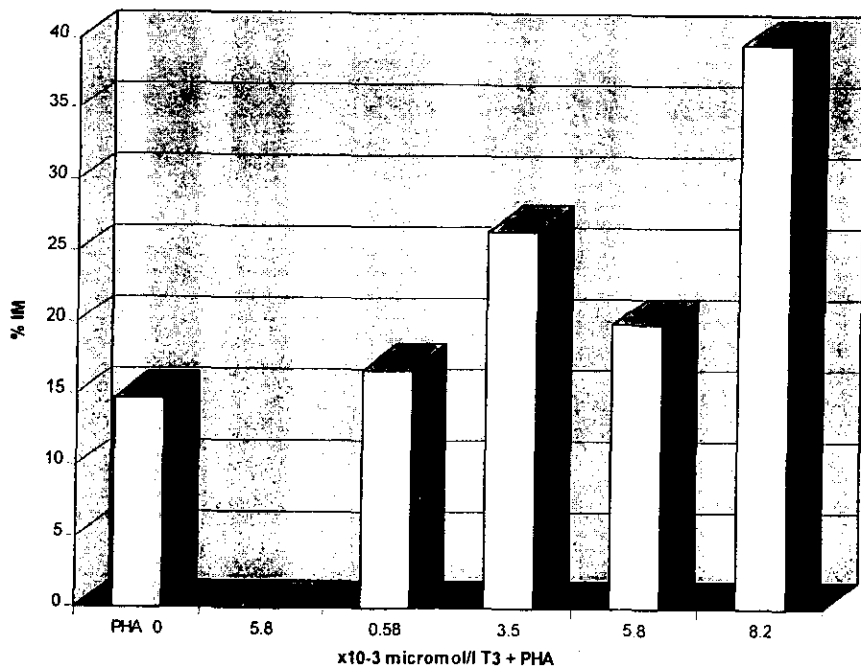
La tabla 3 y gráfica C muestran los resultados de los Intercambios entre Cromátidas Hermanas (ICHs) con las diferentes concentraciones de Triyodotironina, en ellos se puede observar en forma general un ligero aumento de los ICHs como lo indica el análisis de regresión lineal (ecuación $y=mx+b$), mostrando una relación dosis-respuesta con un coeficiente de correlación de 0.77 (gráfica C'); aunque sólo la última concentración $8.2 \times 10^{-3} \mu\text{mol/l}$ de T3 logra aumentar significativamente los ICHs a un valor promedio de 5.16 ± 0.48 con respecto al control de 3.58 ± 0.14 así lo indica la prueba de Kruskal-Wallis ANOVA y la Prueba de Comparaciones Múltiples de Dunn $\alpha= 0.05$

Tabla # 1. Índice Mitótico (IM) en cultivo de linfocitos humanos con PHA, T3 y la combinación de ambas moléculas

AGENTE	[T3] $\times 10^{-3}$ $\mu\text{mol/l}$	x I.M \pm d.e
T3	0.58	0
PHA	0	14.7 \pm 1.8
PHA+T3	0.58	16.7 \pm 4.5
PHA+T3	3.5	26.5 \pm 5.6
PHA+T3	5.8	20.0 \pm 1.5
PHA+T3	8.2	39.7 \pm 5.9*

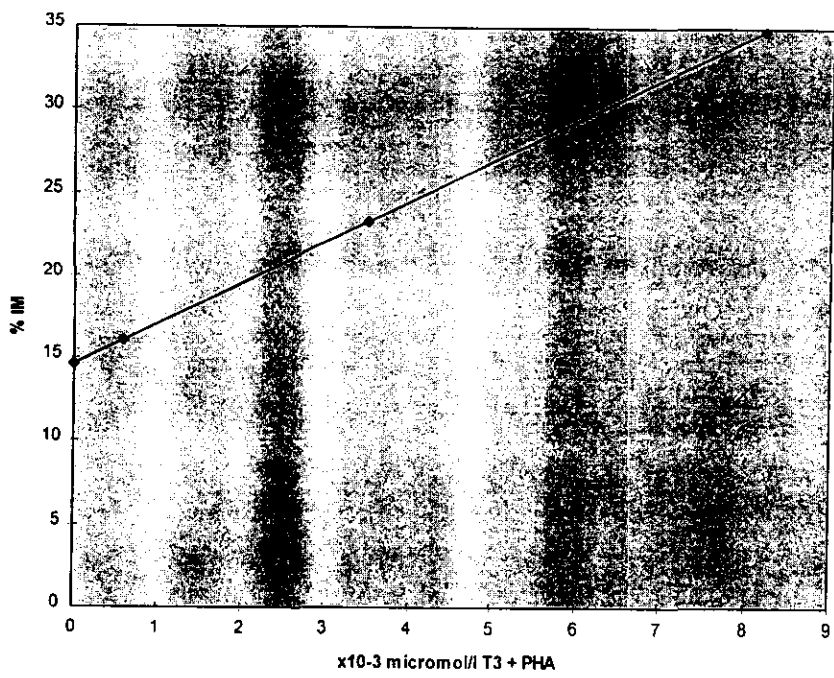
PHA. Fitoheماغlutinina; T3. Triyodotironina
d.e desviación estándar

*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control con la prueba de Kruskal-Wallis ANOVA y prueba de comparaciones múltiples de Dunn. $\alpha = 0.05$



Gráfica A.

Indice Mitótico en cultivos de linfocitos humanos con PHA, T3 y la combinación de ambos agentes.



Gráfica A'.

Regresión lineal del Índice Mitótico de linfocitos humanos con PHA, T3 y la combinación de ambos agentes. ($Y = 2.4668X + 14.62$ $r = 0.84$)

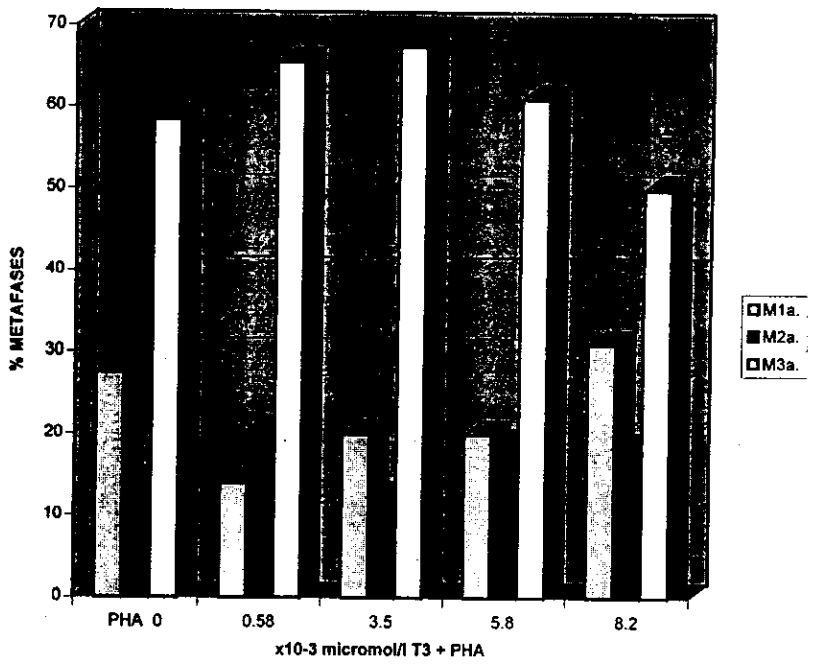
TABLA # 2 . Cinética de Proliferación Celular (CPC) e Índice Replicativo (I.R) en cultivos de linfocitos humanos con PHA y la combinación de está con T3.

AGENTE	[T3]x10 ⁻³ μmol/l	M1a	M2a	M3a	I.R ± d.e	TPG
PHA	0	27.5	14	58.5	2.3 ± 0.31	20.9
PHA + T3	0.58	14	20.5	65.5	2.5 ± 0.007	19.0
PHA + T3	3.5	20	12.5	67.5	2.4 ± 0.19	19.4
PHA + T3	5.8	20	19	61	2.4 ± 0.32	20.0
PHA + T3	8.2	31	18.5	50	2.1 ± 0.035	21.8

d.e desviación estándar

No hubo diferencias estadísticamente significativas con la prueba de ANOVA $\alpha = 0.05$

IR $\bar{x} = 2.3$ TPG $\bar{x} = 20.1$



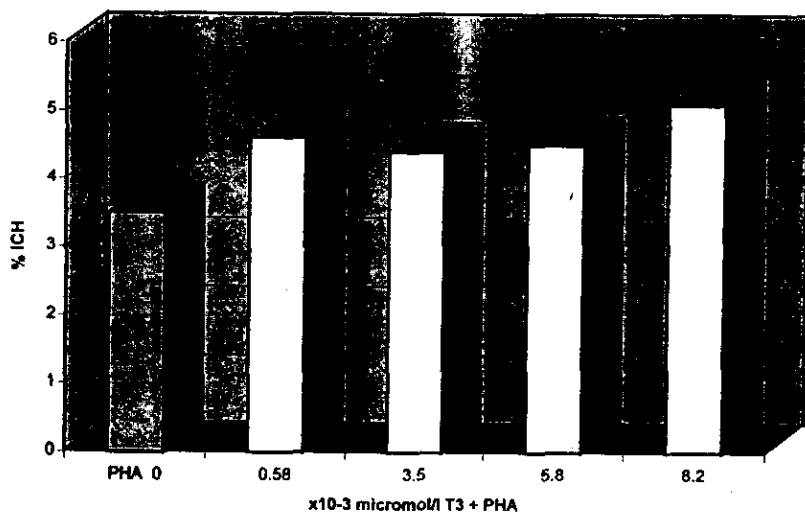
Gráfica B.
 Cinética de Proliferación Celular en cultivos de linfocitos humanos con PHA y la combinación de está con T3.

TABLA # 3 . Frecuencia de Cromátidas Hermanas (ICH) en cultivo de linfocitos humanos tratados con PHA y la combinación de está con T3.

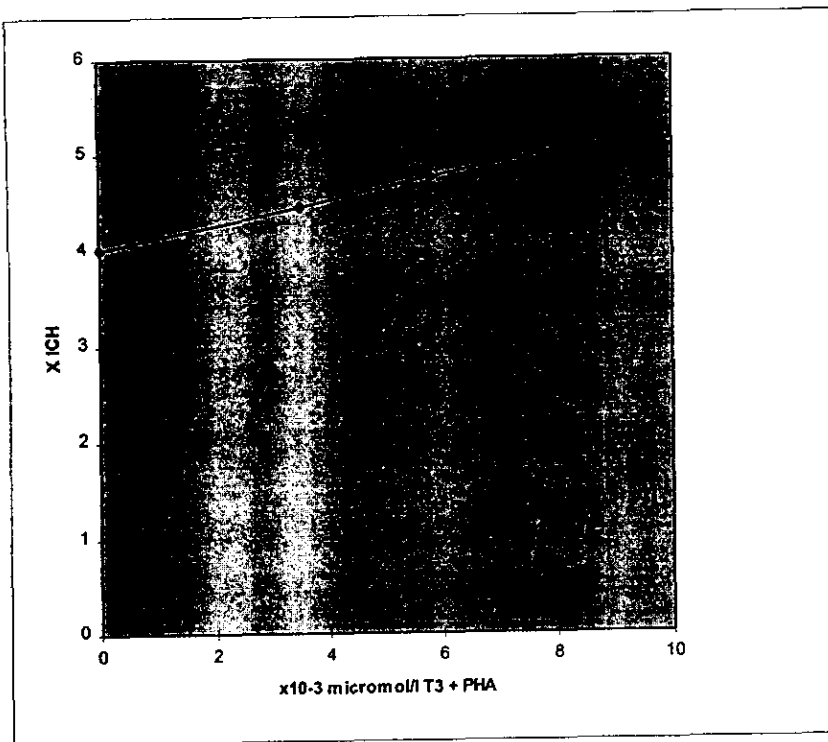
AGENTE	[T3]x 10 ⁻³ μmol/l	x ICH ± d.e
PHA	0	3.5 ± 0.14
PHA + T3	0.58	4.6 ± 0.02
PHA + T3	3.5	4.4 ± 0.34
PHA + T3	5.8	4.5 ± 0.26
PHA+ T3	8.2	5.1 ± 0.48*

d.e desviación estándar

*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control con la prueba de Kruskal-Wallis ANOVA y prueba de comparaciones múltiples de Dunn $\alpha= 0.05$



Gráfica C.
Frecuencia de Intercambios de Cromátidas Hermanas ICH en cultivos de linfocitos con PHA y la combinación de está con T3.



Gráfica C'.
Regresión lineal de Intercambios de Cromátidas Hermanas con PHA y la combinación de
está con T3. ($Y = 0.128X + 4.01$ $r = 0.77$)

DISCUSSION

VII. DISCUSION

Los cultivos de linfocitos humanos expuestos solo a T3, mostraron que la hormona no fue capaz de estimular la división celular por si sola, incluso se observó que en estos cultivos los linfocitos niquiera habían sufrido la transformación blástica que precede a la entrada a una cinética de proliferación franca. Esto no quiere decir que la hormona tiroidea no produce efecto proliferante sobre los linfocitos, ya que cuando los cultivos celulares se expusieron previamente a un agente mitogénico, como lo es la PHA y después la hormona, se observó una clara tendencia al aumento del índice mitótico.

Aún cuando solamente con la dosis más alta de la hormona $8.2 \times 10^{-3} \mu\text{mol/l}$, la diferencia con respecto al control de PHA fue estadísticamente significativa (tabla 1, gráfica A), el análisis de regresión lineal comprueba la relación dosis-respuesta con un aceptable coeficiente de correlación de 0.84 (gráfica A'). Esto indica que para sacar al linfocito de la etapa G0 en que se encuentra en sangre periférica, donde no existe un ciclo proliferativo hacia la etapa G1, se requiere del agente mitogénico forzosamente.

Sin embargo ; para pasar de la etapa G1 a S que es el periodo donde se sintetiza el ADN, y que corresponde a haber pasado o superado el Punto de Restricción o START, podría pensarse que es el momento donde la hormona T3 estaría facilitando la entrada al ciclo de división celular , porque como se sabe la T3 tiene receptores nucleares.

La Tabla 3 y Gráfica C indican que conforme aumenta la concentración de T3, incrementan los Intercambios de Cromátidas Hermanas ICHs, mostrando una relación dosis-respuesta como lo comprueba el análisis de regresión lineal donde se obtuvo el coeficiente de correlación de 0.77 (gráfica C'); la concentración más alta de la hormona $8.2 \times 10^{-3} \mu\text{mol/l}$ resultó estadísticamente significativa con 5.6 ICHs respecto al control de PHA con 3.58 ICHs, sin embargo, este incremento es discreto al que producen los agentes mutagénicos de reconocida acción, ya que se ha visto que estos son capaces de inducir un aumento en la frecuencia de ICHs teniéndose incrementos importantes de hasta 21 intercambios en el caso de Mitomicina C.

Este ensayo indica que la triyodotironina no es genotóxica y que la unión de T3 a sus receptores sobre el ADN no interfiere con su replicación; posiblemente la interacción de la hormona este relacionada con la transcripción, participando con genes ya activados o expresados; es decir, como a los cultivos se les ha adicionado previamente PHA y posteriormente T3, la primer molécula o compuesto que activa a los linfocitos es fitohemaglutinina, ya que el linfocito posee el receptor membranal adecuado para la lectina; una vez activado el receptor se estimulan una serie de señales o mensajeros los cuales participan en la síntesis de IL-2 el cual es directamente responsable de sacar al linfocito de G0 a G1, pero probablemente no solo haya sido activado el gen de la IL-2 por la PHA, sino otros genes entre los que puede estar relacionado el receptor tiroideo (nur / 77) y una vez expresados, la hormona ya tiene la posibilidad de conectarse con su receptor nuclear, y de esta manera mejorar la proliferación celular.

CONCLUSIONES

VII. CONCLUSIONES

- a) T3 y Fitohemaglutinina adicionadas juntas, a cultivos de linfocitos humanos, mejoran la proliferación celular ; tomando en cuenta que el índice mitótico se incrementa, por lo que tiene efecto mitogénico.
- b) Ambas moléculas no tienen influencia aparentemente en la cinética de proliferación celular en cultivos de linfocitos humanos.
- c) Se establece que T3 no desencadena la proliferación celular en cultivo de linfocitos humanos.
- d) No hay efecto citogénético con la Triyodotironina ya que el incremento en los Intercambios de Cromátidas Hermanas es discreto, comparado con un agente mutagénico como lo es la Mitomicina C.

BIBLIOGRAFIA

VIII. BIBLIOGRAFIA

1. Allain T.J. ; Chambers T. ; Flanagan A. y cols. 1992. Tri-iodothyronine stimulates rat osteoclastic bone resorption by an indirect effect. *Journal of Endocrinology*. 133. 327-331.
2. Anderson Shauna Christine. 1995. *Química Clínica*. Ed. Interamericana Mc Graw Hill. México D.F.
3. Andreoli Thomas E. ; et. al. 1995. *Compendio de medicina interna* .3a. edición. Ed. Interamericana Mc. Graw Hill. Madrid España.
4. Balázs C. ; Leövey A. ; Szabó M. y cols . 1980. Stimulating effect of triiodothyronine on cell-mediated immunity. *Eur. Journal Clin Pharmacology*. 17. 19-23.
5. Ballantyne B. y Timothy T. 1993. *General and Applied Toxicology*. Vol.2. De. Stockton Press Great Britain by Bath Press Ltd.
6. Beet Jhon. 1991. Thyroxine and 3, 5, 3'-triiodothyronine are glucuronidated in rat liver by different uridine diphosphate-glucuronyl transferases. *Endocrinology*. 128:2. 741-746.
7. Bergman Donala A. 1990. Thyroid physiology and immunology. *Otolaryngologic Clinics of North Am*. 23 :2. 231-249.
8. Blanco C. 1987. Nuclear 3,5, 3'-triiodothyronine (T3) in brown adipose tissue : receptor occupancy and sources of T3 as determined by in vivo techniques. *Endocrinology*. 12 :1. 55-62
9. Bolander Franklin F. 1989. *Molecular Endocrinology*. Ed. Academic Press Inc. United States of Am.
10. Boggs Dane R. 1985. *El Leucocito*. Ed. El Manual Moderno. México D.F.
11. Bondy P.K. 1985. *Disorders of the adrenal cortex*. *Williams Textbook of Endocrinology*. Ed. In Goenall A.G. Philadelphia.

12. Buddercke E. 1983. Elementos de Bioquímica. Ed. Omega. Madrid España.
13. Carson-Jurica M.A. ; Schrader W. ; O'Malley B. 1990. Steroid receptor family: structure and funtion. *Endocr. Rev.* 11. 201-220.
14. Casanona J. ; Copp R. ; Janocko L. ; y cols. 1985. 5'-flanking DNA of the rat growth hormone gene mediates regulated expression by thyroid hormone. *Journal Biol. Chem.* 260. 11744-11748.
15. Cosgwell John P. 1993. Mechanism of c-myc regulation by c-myb in different cell lineages. *Molecular Cell Biology.* 13:51. 2858-2869.
16. Daucey M. 1990. Short term influence of 3,5,3'-triiodothyronine infusion restin metabolic rate of the young pig. *Horm. Meta. Res.* 22. 374-377.
17. Dupuis Gilles. ; Aoudjit Fawzi. ; Ricard Isabelle y cols. 1993. Effects of modulators of cytosolic Ca²⁺ on phytohemagglutinin dependent Ca²⁺ response and interleukin-2 production in Jurkat cell. *Journal Leukocyte Biolgy.* 53. 66-71.
18. Ekholm Ragnar. 1990. Biosynthesis of thyroid hormone. *International Review of Citology.* 120. 243-281.
19. *Encyclopedia of Human Biolgy.* 1991. Vol.5 Ed. Academic Press Inc. USA
20. Evans R.M. 1988. Zinc Fingers: gilt by association. *Cell.* 52. 1-3
21. Evans R.M. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science.* 240. 889-895.
22. Fainboim Leonardo. 1994. *Introducción a la Inmunología Humana.* Ed. Mosby/Doyma. Madrid España.
23. Félix Marie-Anne. 1995. La división Celular. *Mundo Científico.* 154 :15. 132-140
24. Fradelizi Didier. 1986. Los Mensajeros de la Inmunidad. *Mundo Científico.* 6 :60. 806-814.

25. Fujieda Miyuky. ; Murata Yoshiharu. ; Hoyashi Hiroyuky y cols. 1993. Effect of thyroid hormone on eoidermal growth factor gene expression in mouse submandibular gland. *Endocrinology*. 132 :1, 121-124.
26. Fujita Hisao. 1988. Funtional Morphology of the Thyroid. *International Review of Citology*. 113, 145-148.
27. G. Damiano. ; Arun S.. 1987. Triodothyronine binding in adult rat brain. *Endocrinology*. 12:1, 325-331.
28. García-Sainz Adolfo. 1987. Hormonas mensajeros químicos y comunicación celular. Ed. Fondo de cultura económica. México D.F.
29. Ganong F.W. 1988. Fisiología médica. Ed. El Manual Moderno. México D.F.
30. Geary B. ; Privalsky M. 1990. Sequence specific DNA binding by the v-erb a oncogene protein of avian erythroblastosis virus. *Journal Virol*. 64:3. 1314-1320.
31. Graff M.N. ; Baas D. ; Puymirat J. y cols.. 1993. The α and β thyroid receptors are expressed by culture pendymal cell. Correlation with the efect of L-3,5,3'-triiodothyronine on glutamine synthetase mRNAs. *Neuroscience Letters*. 150. 174-178.
32. Green S. ; y Chambon P. 1986. A superfamily of potentially oncogene hormone receptors. *Nature*. 324, 615-617.
33. Graupner Ger Hat. 1989. Dual regulatory role for thyroid hormone receptors allows control of retinoc acid receptor activity. *Nature*. 340. 653-65.
34. Goto K. 1975. Simple differential giemsa staining of sister cromatid after treatment with photosensitive dyes and exposure to light and the mechanism of staining. *Chromosome*. 53, 223-230.
35. González B. 1989. Fundamentos de Oncología Médica Ed. Interamericana Mc Graw Hill. Madrid España.
36. Guillemin R. 1972. The hormones of the hypothalamus. *Sci. Am*. 227. 24-33.
37. Guízar-Vazquez J. 1994. Genética Clínica. 2a. edición. Ed Interamericana Mc Graw Hill. Madrid España.
38. Guyton Arthur C. 1996. Tratado de Fisiología Humana. 9a.edición. Ed. Interamericana Mc Graw Hill. México D.F.

39. Harnett Margaret and Rigley Kevin. 1992. The role of G-proteins versus protein tyrosine kinases in the regulation of lymphocyte activation. *Immunology Today*. 13 :12. 482-486.
40. Hazel Thomas G. ; Nathans Daniel ; Lau Lester. 1988. A gene inducible by serum growth factors encodes a member of the steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 85. 8444-8448.
41. Helmer Elizabeth B. 1996. Hormone-dependent and independent transcriptional activation by thyroid hormone receptors are mediated by different mechanisms. *Endocrinology*. 137 :2. 390-399.
42. Hossay. 1986. *Fisiología Médica*. Ed. El Ateneo. México D.F.
43. Ikushima-Tokaji. 1989. Sister Chromatid Exchange SCE enigma : methodology, mechanism and meaning of SCE. *Anv. Rep. Res. Reactor Inst. Kyoto Univ. Vol. 22*. 57-77.
44. Jannini Emmanuele A. ; Ulisse Salvatore ; Piersanti D. Amaria y cols. 1993. Early thyroid hormone treatment in rats increases testis size and germ cell number. *Endocrinology*. 132 :6. 2726-2728.
45. Khorle J. ; Fasmussen U. 1990. Affinity kindey type I 5'- deiodinasse. *The Journal of Biological Chemistry*. 265 :11. 6155-6163.
46. Killman W.H. 1986. Mecanismo de acción de las hormonas tiroides. *Clínicas Medicas de Norteamérica*. Ed. Emalsa, S.A. Madrid España. 120 : 243-281.
47. Kimber. 1986. *Manual de anatomía y fisiología*. 2a. edición Ed. La Prensa Médica Mexicana . México D.F.
48. Klaus C.G. 1984. Cell-cycle control in lymphocyte stimulation. *Immunology Today*. 5 :1. 15-19.
49. Labato M. 1985. Cyto chemical localization of hydrogen peroxide generating sites in the rat thyroid glands. *Tissue I Cell*. 17 :6. 889-900.
50. Latt S.A. 1973. Microfluremetric detection of DNA replication in human metaphase chromosomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 70. 3395-3399.
51. Latt S.A. 1974. Sister chromatid exchange indices of human chromosome damage and repair detection by fluorescence and induction by Mitomycin C . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 71. 3162-3166.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

52. Lebel Jean- Marc. ; Dussault Jean ; Puymirat Jack. 1994. Overexpression of the $\beta 1$ thyroid receptors induces differentiation in Neuro-2a cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91. 2644-2648.
53. Leger J. Forrest M. 1990. Thyroid action in receptors Journal of Clinical and Metabolism. 71:5. 1147-1149.
54. Lewin Benjamin. 1974. Gen expression. Vol.2. Eucaryotic Chromosomes. Ed. John Wiley and Sons.
55. Lewin Benjamin. 199 Gen espresion. Vol. 2. Eucaryotic Chromosomes. De. John Wiley and Sons.
56. Maisterieno Jorge. 1988. Padecimientos por deficiencia de iodo. Realidades "Nutrición". 11 :1. 33-43.
57. Mark D. Crew. 1986. Thyroid hormone regulation of the transfected rat growth hormone promoter. *The Journal of Biological Chemistry*. 261 :11. 5018-5022.
58. Mayo Goss. 1976. Anatomia. Ed. Salvat S.A. México D.F.
59. Mishell Barbara B. ; et.al. 1980. Selected metodos in cellular inmunology. Ed. N.H. Freeman and Company. New York.
60. Morales R.P. 1988. El daño a la información genética y los intercambios de cromatidas hermanas. *Ciencia y Desarrollo*. 14(XIV) : 65-72.
61. Morales R.P. ; Rodríguez R. ; Vallarino Kelly. 1990. Fate of DNA lesiones that sister cromatid exchanges. *Mutation Reserch*. 232. 77-88.
61. Murray Robert K. 1994. Bioquímica de Harper. 13a. edición. Ed. El Manual Moderno. México D.F.
63. Nassi P. Liguri G. 1990. Thyroid action in receptors. *Journal of Clinica Endocrinology and Metabolism*. 71:5. 1147-1149.
64. Nassi P, Liguri G. 1990. Increased acyl-phosphatasa levels in erythrocytes, muscle and liver of triiodothyronine treated rabbits. *Horm. Metabol. Res*. 22. 33-37.
65. Nicoll C.S. ; et.al. 1986. Structural features of prolactins and growth hormones that be related to their biological activity. *Endocrinology Rewiev*. 7. 169-203.

66. Nozaki Shuichi ; Shimomura Iichiro ; Funahashi Tohra y cols. 1992. Stimulation of the activity and mRNA level of hepatic triacylglycerol lipasa by triiodothyronine in HepG2 cells. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1127. 298-302.
67. Oppenheimer J.H. ; Koerner K. ; Schwartz H. 1972. Specific nuclear triiodothyronine binding sites in rat liver and kidney. *Journal Clinic Endocrinology Metabolism*.35. 330-333.
68. Oppenheimer Jack H. ; et.al. 1983. Molecular basis of thyroid hormone action. Ed. Academic Press. New York
69. Oppenheimer Jack H. 1985. Thyroid action at the nuclear level. *Ann. Inter. Med.* 102. 374
70. Orten M. 1984. *Bioquímica Humana*. Ed. Médica Panamericana. Buenos Aires Argentina.
71. Palma V.; et. al. 1993. Methods for the analysis of cell kinetics in PHA-stimulated blood lymphocytes using BrdU incorporation. A comparative study. *Mutation Research*. 286. 267-273.
72. Palumbo G y Gentile F. 1990. The earliest site of iodination on thyroglobulin is residue number 5. *Journal Biol. Chem.* 265 :15. 8887-8892.
73. Pardee A.B. 1978. Animal cell cycle. *Ann. Rev. Biochem.* 47.,715-750.
74. Pardee A.B. 1974. A retraction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA.* 71 :1286-1290.
75. Pfahl Magnus. 1993. Nuclear receptor/AP-1 interaction. *Endocrine Reviews*. 14:5. 651-658.
76. Phillips D.I y Lazarus J. 1988. Iodine metabolism and thyroid *Journal of Endocrinology* 119 , 361-363.
77. Pierce J.G. 1981. Glycoprotein hormones : structure and function. *Ann. Rev. Biochem.* 50. 465-495.
78. Reed John C. ; Nowell Peter ; Hoover Richard. 1985. Regulation of c-myc mRNA levels in normal human lymphocytes by modulators of cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82 . 4221- 4224.

79. Rigas D.A. 1965. Purification and properties of the phytohemagglutinin of *Phaseolus vulgaris*. *Journal Biology Chemical*. 212. 607.
80. Robinson Peter J. 1991. Phosphatidylinositol membrane anchors and T-cell activation. *Immunology Today*. 12 :1. 35-41.
81. Romagnani Sergio. 1991. Human TH1 and TH2 subsets :doubt no more. *Immunology Today*. 13 :10. 379-380.
82. Romagnani Sergio. 1992. Induction of TH1 and TH2 responses :a key role for the "natural" immune reponse. *Immunology Today*. 17 :10.481-486
83. Rossow P.W. 1979. Synthesis of labile, serum-dependent protein in early G1 controls animal growth. *Proc.Natl.Acad. Sci. USA* 76. 4446-4450.
84. Ruiz Amil Manuel. 1992. *Bioquímica Metabólica*. Ed. Tebar Flores. Madrid.
85. Salamanca Gómez Fabio. 1990. *Citogenética Humana : Fundamentos y Aplicaciones Clínicas*. Ed. Médica Panamericana. México D.F.
86. Samuels H.H. ; Tsai J. ; Casanova J. 1974. Thyroid hormone action: in vitro characterization of solubilized nuclear receptors from rat liver and cultured GH1 cells. *Journal Clinic Invest*. 54. 853-865.
87. Schwartz R.H. 1990. A cell culture model for T lymphocyte clonal anergy. *Science*. 248. 1342-1347.
88. Serfling Edgar ; Avots Andris ; Neumann Manfred. 1995. The architecture of the interleukin-2 promoter : a reflection of T lymphocyte activation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1263. 181-200.
89. Shalchli Laure. 1997. El Sistema Inmunitario. *Mundo Científico*. 189. 980-983.
90. Shaw Margery y Crang-Holmes Ann . 1977. Effects of six carcinogens on SCE frequency and cell kinetics in cultured human lymphocytes. *Mutation Research*. 46. 375-384.
91. Sites Daniel P. y Terr Abba. 1996. *Inmunología Básica*. 8a. edición. Ed. El Manual Moderno. México D. F.
92. Takashi Nagaya. 1992. *Thyroid hormone receptor mutants that cause resistance to thyroid hormone*. *The Journal of Biological Chemistry*. 267 :18. 13014-13019.
93. Taylor J.H. 1958. Sister chromatid exchange in tritium-labeled chromosomes. *Genetics*. 43. 515-529.

94. Theze Jacques. 1996. Interleukina 2 and its receptors : recent advances and new immunological functions. *Immunology Today*. 17 : 10. 481-486.
95. Thompson Margaret W. 1996. *Genética en Medicina*. 4a. edición. Ed. Interamericana Mc Graw Hill. México D.F.
96. Tice R. 1979. Analysis of the phytohaemagglutinin-induced proliferation of human peripheral lymphocytes. *Cell. Tissue Kinet*. 12. 1-9.
97. Varga Franz ; Rumpler Monika ; Klaushofer Klaus. 1994. Thyroid hormone increase insulin-like growth factor mRNA levels in the clonal osteoblastic cell line MC3T3-E1. *FEBS Letters*. 345 :67-70. 2644-2648.
98. Weir and John Stewart. 1995. *Inmunología*. Ed. El Manual Moderno. México D.F.
99. West J. 1990. *Bases fisiológicas de la práctica médica*. Ed. Médica Panamericana.
100. Yanishersky R.M. 1981. Regulation of the cell cycle in eukaryotic cell. *Int. Rev Cytol*. 69. 223-259.
101. Zambrano Sergio. *Inmunología*. 1994. Ed. Interamericana. Mc Graw Hill. México.