

73
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ENVEJECIMIENTO INMUNOLOGICO: INTERACCION
MACROFAGOS-LINFOCITOS T CD 4+

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

CLAUDIA ALICIA SANCHEZ SANDOVAL



MEXICO, D. F.



1999

EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

278564

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado Asignado

Presidente: Prof. Saturnino de León Chapa
Vocal: Prof. Luis Ignacio Terrazas Valdés
Secretario: Prof. Jorge Fernando Paniagua Solís
1er. Suplente: Profa. Elena Zambrano González
2do. Suplente: Prof. Miguel Castrejón Sosa

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 202 del Edificio B, Facultad de Química, UNAM



Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés

Asesor del tema



Claudia Alicia Sánchez Sandoval

Sustentante

"...sólo puede darnos dignidad una profesión
en la que no nos convertimos en instrumentos serviles,
en la que actuamos por nuestros medios.....
esta profesión es siempre, si no la mas remunerada,
sí la mejor".

KARL MARX

El presente cúmulo de esfuerzos compartidos, va dedicado a todos aquéllos que creen en la Química como ciencia de explicación de la Vida.

Especial dedicatoria para los seres que sembraron desde siempre con mucho amor la semilla de la pasión por el conocimiento y el estudio, y el valor de las cosas: mis padres.

A Andrea, Manuel y Magda, hermanos, compañeros y amigos inigualables en ánimos y desánimos de toda la vida.

Para Millo y "Tía", por ese toque de sabiduría, sencillez, coraje y valor.

A Daniela por haber llegado hasta aquí para aprender la vida. A Marcel, con el cariño de una amiga.

Al gran cómplice de aprendizajes del mundo y del amor, de lo que los compone y los rodea, que ha marcado mi vida para siempre: Ale.

Con todo mi cariño, a la maestra Dany, Rosalba, Maribel, Verónica, "la bombocha", "el chorizo", Oscar, Sámano, "la pingüica" y su hermana, Chava y Vale, "el chipis", Mario y sus hermanos, Benjas, Karime, Claudia (Montoyita), Polo, Pazos, Samuel, Marcela, Morayda, Martín, Hugo, Osvaldo, Verito, Yadis, la Coco, Lucha, Vicky, Belém, "los lobos", la maestra Bety, "los vagos" "la güera", "la mica", Egar, Carlos, "la hormiga atómica", Bertha, "los gordos", Caro, Magda, Mary, Paty, Adriana, Magnolia, los Toños, Gilberto, "la vaca morada", Chavela, Ulises, Yesenia, Naxieli, Deya, Yola y compañía, Julio, Pedro, Paco, Ivette, Marce, Javier, Jasán, Cynthia, Alma, "la Xochitla", "Bertiniano", "la Chayo", Lalo, Letyy todos los que me faltaron y que me han compartido conmigo tantos momentos, alegrías, angustias y tristezas.

Vá, en nombre de todos los que quieren estudiar la Química y no les es posible.

Agradezco infinitamente a la Universidad Nacional Autónoma de México, que me ha permitido un desarrollo tan privilegiado y me ha formado como profesionista en aras del bien de México.

Agradezco así mismo a mis profesoras y profesores de niveles anteriores que dieron la base para mi desempeño académico y personal.

Agradezco enormemente la confianza y ánimo del Dr. Luis Ignacio Terrazas Valdés para el desarrollo y conclusión de este trabajo.

Agradezco especialmente el apoyo incondicional del Dr. Fernando García Tamayo y de Guadalupe Reyes para la realización del presente trabajo.

A los profesores Satunino de León Chapa, Jorge F. Paniagua Solís, que me brindaron una valiosísima guía para la conclusión del mismo.

“....tengo tantas piedras juntas, que podría construir un palacio....”

ÍNDICE

	PÁGINA
CAPÍTULO 1	
Introducción	1
CAPÍTULO 2	
Objetivos	4
CAPÍTULO 3	
Hipótesis	5
CAPÍTULO 4	
Antecedentes	6
-Linfocitos CD4+, macrófagos y presentación de antígenos	6
CAPÍTULO 5	
Material y Método	21
- Inmunógeno e inducción de macrófagos y de linfocitos T CD 4+	22
-Extracción y cultivo de células	22
-Identidad de la células cultivadas Citometría de flujo	25
-Purificación de células CD4+ Separación magnética	26
-Metodología de evaluación indirecta de la actividad de la células ELISA tipo "sandwich"	27
- Proliferación de linfocitos T CD4+ Incorporación de Timidina	28
-Medición de producción de NO	28
CAPÍTULO 6	
Resultados	30

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El desarrollo en el campo de las ciencias ha llevado a que actualmente exista una tendencia a elevar la vida media de la población a nivel mundial; esto lleva a pensar que en el futuro existirá una gran cantidad de ancianos y a considerar vieja o anciana a una persona a una edad más avanzada que lo que se podía considerar hace una década. En específico, en nuestro país, resulta de suma importancia el hecho de que la gran mayoría de la población la integren jóvenes y niños, mismos en que este proceso se hará más vidente.

Existen diversas opiniones acerca de lo que significa el proceso del envejecimiento; desde las acepciones más rigurosas que lo definen como el "hacer vieja a una persona o cosa", considerando a los viejos como "personas de mucha edad" hasta el entender al envejecimiento como un proceso que se desata gracias al desgaste de los sistemas y órganos de un individuo (sea éste un animal o un humano), esto es, a su deterioro funcional. Por el contrario, hay quienes se refieren a él como la causa del desgaste.

En el envejecimiento o ancianidad se presentan procesos fisiológicos característicos, de pérdida de capacidad celular en sus funciones vitales, llevando con esto a la disfunción en los órganos, tejidos y sistemas de los individuos.

Se han encontrado también reportes de estudios que demuestran que el estrés acumulado tanto físico como emocional durante la vida de los individuos los lleva a un estado de depresión mental que origina la depresión metabólica involucrada en una supresión de la mayoría de los sistemas incluido el sistema inmune.

Esto trae como consecuencia la frecuencia aumentada de enfermedades autoinmunes, cáncer, amiloidosis y susceptibilidad para contraer enfermedades infecto-contagiosas, a pesar de haber estado en contacto con ellas anteriormente.

Resulta, por tanto importante el estudio de las alteraciones metabólicas acontecidas en la ancianidad, con el fin de entenderlas y ver la posibilidad de influir en estos aspectos para mejorar el nivel de desarrollo inmunológico de las personas de edad avanzada.

Hasta el momento, en la literatura se encuentran referencias sobre el impacto del proceso del envejecimiento en la actividad de los linfocitos CD4+ y de los macrófagos como sistemas aislados, y se han reportado disminuciones en la producción de interleucinas de ambos tipos celulares, sin embargo existen pocos reportes de estudios con cultivos simultáneos de macrófagos y linfocitos T CD4+ (específicamente, en la actividad de los macrófagos como células presentadoras de antígenos).

Con la finalidad de profundizar en el estudio de esta interacción, se realizaron co-cultivos de macrófagos y linfocitos T CD4+ provenientes de ratones jóvenes y viejos.

A través de la medición de la producción de citocinas características de cada una de las células mencionadas, se hizo el análisis del nivel de actividad desarrollada por cada una, interaccionando entre sí bajo diferentes condiciones de edad del animal del que provinieran. Además, se estudió el grado de proliferación de linfocitos T CD4+ de animales jóvenes y viejos en presencia de macrófagos en las condiciones mencionadas, con el mismo fin.

Los resultados que se presentan están dados gráficamente tratando de resaltar las diferencias existentes en las actividades de los tipos de células estudiados, en función de la edad de los animales utilizados.

De esta forma, los resultados muestran una disminución en la actividad de la inmunidad celular de individuos ancianos atribuible en mayor proporción a deficiencias en la actividad de los macrófagos como células presentadoras de antígenos, y no tanto a la capacidad de reconocimiento y respuesta por parte de los linfocitos T CD4+.

Por otro lado, las metodologías desarrolladas en el campo de la Inmunología han dado pie a técnicas confiables (en lo que se refiere a su precisión y exactitud) y accesibles (en lo referente a su facilidad de aplicación), (no tanto desde el punto de vista económico) para la evaluación ya sea directa o indirecta de actividades metabólicas de los animales y los humanos. En este trabajo se laboró con procedimientos probados y validados (ELISA, cuantificación de incorporación de ³[H]-timidina, estimación espectrofotométrica de óxido nítrico, separación magnética de células, citometría de flujo), que combinados permiten presentar los resultados que aquí se muestran.

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

- Evaluar el efecto del envejecimiento sobre la actividad de los macrófagos como células presentadoras de antígenos y como una fuente muy importante de citocinas en un modelo murino a través de:
 - a) la comparación de la proliferación de linfocitos T CD4+ en presencia de macrófagos de animales jóvenes y de animales ancianos (según se definen por sus edades en el Capítulo 5) .
 - b) la comparación de producción de IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α y NO por macrófagos de animales viejos y de animales jóvenes.
 - c) la comparación de la producción de IL-2, IL-4 e IFN- γ por linfocitos T CD4+ de animales jóvenes y viejos, en co-cultivos de éstas células con macrófagos provenientes de los mismos animales.
- Establecer los posibles mecanismos inmunológicos menos afectados, o bien favorecidos, en el envejecimiento, en relación con la respuesta celular.

CAPÍTULO 3

HIPÓTESIS

En los diferentes estudios sobre la respuesta inmune en la vejez se ha encontrado que los linfocitos T de sujetos ancianos presentan una respuesta inmunológica disminuida en relación con aquella de sujetos jóvenes; no obstante, el número total de linfocitos T se mantiene engañosamente invariable, aumentando la proporción de linfocitos T de memoria CD45RO y disminuyendo la de células T vírgenes CD45RA.(1,3,4,13)

Los macrófagos de individuos ancianos, por otro lado, presentan pérdida o aumento en su capacidad para producir algunos factores estimuladores de la respuesta inmune celular (1,7,8. 22)

Por lo tanto, se espera que al monitorear la actividad de linfocitos T CD4+ y macrófagos procedentes de ratones jóvenes y viejos en co-cultivos *in vitro*, alternados, se obtengan resultados que sugieran un defecto en los macrófagos al presentar antígenos a los linfocitos T CD4+ más que un defecto en estos últimos para responder al estímulo antigénico.

CAPÍTULO 4

ANTECEDENTES

Es conocido que durante el envejecimiento muchas funciones metabólicas disminuyen. De hecho, varios sistemas del organismo dejan de funcionar adecuadamente, conllevando con esto consecuencias, por ejemplo, el caso de cáncer, donde en los pacientes muy ancianos se hace un círculo vicioso, pues a causa de la terapia recibida contra la enfermedad tienen una actividad inmunológica disminuida (6).

Dentro de los sistemas más afectados por el envejecimiento, se encuentra el sistema inmune. En tal sistema se dan importantes alteraciones, como la ampliamente reconocida involución tímica, a la cual se ha atribuido la depresión en la respuesta de los linfocitos T que se da en personas o animales viejos. Se ha observado también que el pool de zinc disminuye con la edad. Principalmente, el zinc confiere actividad biológica al péptido tímico timulina. Suplementando ratones ancianos con zinc, se ve que éstos alcanzan la recuperación de las funciones tímicas, restauración parcial de la eficiencia en la respuesta inmune periférica, así como elevación en la actividad de las células NK (16). También se reportan otras alteraciones asociadas, como el caso de infecciones por *Mycobacterium tuberculosis*, donde los animales ancianos controlan la infección casi igual que los jóvenes, pero hay ligera deficiencia en la respuesta de tipo Th1, principalmente por una baja producción de IL-12 (7); por otra parte, en ratones ancianos se ha observado el desarrollo espontáneo de linfomas de células B (10).

LINFOCITOS T CD4+, MACRÓFAGOS Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS

Tenemos que para la importante tarea del reconocimiento de antígenos proteicos que se lleva a cabo por los linfocitos T (a comparación de los linfocitos B, que pueden reconocer péptidos, proteínas, ácidos nucleicos,

polisacáridos, lípidos y sustancias químicas pequeñas), es de suma importancia el papel de las células que van a presentar tal antígeno.

La activación de las células T cooperadoras CD4+ por el antígeno precisa de la participación de otras células diferentes de los Linfocitos (células accesorias), que sirven como APC (Células Presentadoras de Antígenos, por sus siglas en inglés) convirtiendo antígenos proteicos en péptidos y presentándolos en complejos péptido-MHC de forma que se puedan reconocer por los Linfocitos T CD4+ (es decir, haciendo el procesamiento del antígeno, siguiendo la definición de la denominada "restricción por el MHC)). Las moléculas del MHC son proteínas de la membrana de las APC

Los péptidos unidos a las moléculas de clase I del MHC derivan de proteínas sintetizadas en la célula que las muestra (antígenos endógenos), y son reconocidos por células T CD8+, que se conocen por su actividad citolítica (aunque recientemente se ha aclarado que las células CD8 nativas también se pueden dirigir para ser efectores polarizados por IL-4 y por IL-12/Interferón- γ) (18).

Por el contrario, los linfocitos que reconocen antígenos exógenos asociados a las moléculas de clase II del MHC son aquéllos diferenciados como T CD4+, que suelen ser linfocitos T cooperadores (aunque también existen linfocitos T citolíticos CD4+, restringidos por la clase II del MHC) y son los que aquí se estudian dado el tipo de presentación de antígenos por parte de los macrófagos.

Una vez que la célula CD4+ se ha estimulado, tiene una sorprendente capacidad proliferativa y se polariza fácilmente para producir patrones particulares de citocinas (células T cooperadoras Th1 o Th2).

La asociación de los péptidos antigénicos a las moléculas del MHC es una interacción saturable de baja afinidad con una tasa de formación lenta y una tasa de separación muy lenta, de ahí probablemente que la frecuencia de células T en animales normales específicos para un antígeno particular es muy

baja (para KLH, es de alrededor de 1/50,000), por lo que hay que hacer uso de mitógenos tales como la concanavalina A (11). Se ha encontrado que las células T nativas responden bien a péptidos presentados por APC en un rango de concentración de 0.5-5 μ M; sólo las células dendríticas han mostrado ser efectivas a bajas cantidades de las mismas. Además, cada clase de molécula de clase I o II del MHC se une a un solo péptido dentro de una hendidura especializada en la superficie de la molécula del MHC (la mayoría de los péptidos tienen de 10 a 30 aminoácidos de longitud). Puede suceder, por otro lado, que se unan múltiples tipos de péptidos a una misma molécula del MHC para el reconocimiento, aunque cabe mencionar que existen diferencias claras en la naturaleza de los péptidos que se unen a las moléculas de clase I o II del MHC, que se deben a las diferencias en las hendiduras de unión al péptido de ambas moléculas, así como a las estructuras primaria y secundarias de las moléculas participantes (27).

Además del hecho mismo de "presentar", las células accesorias tienen la tarea de participar como co-estimuladores para la activación fisiológica completa de las células T(19).

Dentro de las APC mejor definidas para los linfocitos T cooperadores están los fagocitos mononucleares, los linfocitos B, las células dendríticas, las células de Langerhans de la piel y, en los seres humanos, las células endoteliales.

Los macrófagos y otras células del sistema fagocítico mononuclear fagocitan (valga la redundancia) activamente partículas grandes por lo que son de suma importancia en la presentación de antígenos derivados de microorganismos infecciosos como bacterias y parásitos.

El procesamiento de un antígeno (y por tanto su posible presentación) por parte de los macrófagos depende de ciertas condiciones del medio, siendo algunas, y muy importantes, las siguientes:

- Del pH; los endosomas y los lisosomas en los que tiene lugar el

procesamiento del antígeno, tienen un pH ácido, necesario para el procesamiento.

- Del tiempo transcurrido y el metabolismo que tiene lugar después de la interacción del antígeno con los macrófagos.
- Del "status" de proteasas celulares.
- Del nivel de proteínas y moléculas de membrana necesarias para la presentación (como es el caso de B7, que interacciona con el CD28 de los linfocitos T) y, por supuesto, el de moléculas del MHC(19,26).

Después del procesamiento de los antígenos dentro del macrófago, éstos permanecen aislados en vesículas rodeadas de membrana y se unen a las moléculas de clase II del MHC, sin salir de la APC. Se desconoce el lugar exacto de la asociación aunque se ha sugerido que sea dentro de un organelo de la vía endocítica(19).

Las moléculas de clase II del MHC se sabe que se sintetizan y ensamblan en el retículo endoplásmico. Aquí, se sintetizan tanto la cadena invariante, como los heterodímeros α y β . La cadena invariante se une de manera no covalente a dichos heterodímeros hasta el momento de entrar en contacto con los endosomas que contienen péptidos provenientes de proteínas procesadas listos para ser presentados(25).

Con la unión de la cadena invariante a los heterodímeros (que juntos forman la hendidura de unión de los péptidos procesados) se logra por una parte que se bloquee tal hendidura y no haya "ocupación" de la misma por péptidos propios del organelo y por otro lado, se sabe que ciertas secuencias de aminoácidos de la cola citoplasmática amino terminal de la cadena invariante dirigen consigo a las moléculas de clase II del MHC a través del complejo de Golgi hacia los organelos rodeados de membrana de la vía endocítica(25,20).

Mientras las moléculas de clase II del MHC se mueven a través de una vía exocítica llevadas por las cadenas invariantes, llegan a un punto de encuentro con las vesículas endocíticas que contienen péptidos (o proteínas exógenas procesadas), donde el pH bajo y las enzimas proteolíticas provocan la separación de las cadenas invariantes de los heterodímeros α y β , con lo que las hendiduras quedan expuestas y con posibilidad de unirse a los péptidos contenidos en las vesículas endosomales. Los complejos péptido- moléculas de clase II del MHC se transportan entonces a la superficie de las APC donde se expresan.

Se calcula que sólo 100 a 200 complejos de un péptido particular con una molécula de clase II del MHC específica en la superficie de una APC pueden activar a una célula T específica para este complejo. Esto representa menos del 0.1 por 100 del número total de moléculas de clase II que probablemente estén presentes en la superficie de la APC, la mayor parte de las cuales está ocupada por péptidos propios.

Sin embargo, en cuanto al procesamiento de proteínas aún existen aspectos sin resolver. Por ejemplo, no se sabe cómo es que un antígeno extraño incorporado por endocitosis a una APC evita una degradación proteolítica completa a aminoácidos, como es probable que ocurra en el comportamiento lisosomal de la célula. Se especula que la unión del péptido a moléculas del MHC frena la carrera hidrolítica de las enzimas (proteasas) de la misma célula.

Todavía no se comprenden del todo, por otro lado, las complejas interacciones de la cadena invariante, el péptido y las moléculas de clase II del MHC, pero se sabe que aunque no es vital la presencia del péptido para el ensamblaje de los heterodímeros, se ha demostrado que éstos cambian su conformación y se estabilizan más cuando aquél está presente. Además, aún no se comprende muy bien el papel de las llamadas proteínas acompañantes, que regulan el transporte y unión de algunos péptidos a las moléculas de clase II del MHC(19,25,26).

Por otra parte, se ha mencionado antes el modelo mas aceptado para la generación de casi todos los complejos clase II del MHC-péptido, que mejor se acopla con la teoría de "un solo receptor" de la célula T, pero existen importantes vías intracelulares alternativas potenciales para la generación de estos complejos que pueden tener significado inmunológico. Una es, que las moléculas de clase II del MHC presentes en la superficie de la célula se reciclen por internación en los endosomas, conllevando así a la unión en este momento de fragmentos peptídicos presentes en ellos, y a un intercambio de péptidos asociados.

Es muy probable que el procesamiento de proteínas de membrana (propias de la APC) juegue un papel crucial en el reconocimiento de péptidos exógenos asociados a moléculas del MHC por parte de la célula T, pero no se sabe a ciencia cierta el mecanismo de procesamiento de las proteínas de membrana.

Además del procesamiento de péptidos para la presentación a células T CD4+, dentro del macrófago ocurren procesos de apoyo a la eliminación del agente extraño que ha causado su activación, como la producción de óxido nítrico. Los macrófagos de ratón, pero no probablemente los de humanos, presentan una característica perceptible *in vitro*: después de tratar a los macrófagos murinos con IFN- γ junto a LPS, TNF o IL-1, estas células expresan una sintetasa del óxido nítrico de producción elevada que, al contrario que la enzima de la célula endotelial, se activa de forma espontánea (independiente del calcio). El óxido nítrico sintetizado en grandes cantidades por esta enzima puede contribuir a la muerte de las bacterias y puede también inhibir la replicación viral. Existen reportes de que su producción aumenta en cultivos de células murinas provenientes de animales ancianos (en relación con animales jóvenes), a la par que la apoptosis aumenta en células endoteliales (10, 14), y otros que marcan, por el contrario, una disminución de sus niveles por parte de macrófagos de animales viejos (12)

Por otro lado, se sabe que los macrófagos de individuos ancianos no presentan pérdida en su capacidad para fagocitar; aumentan la síntesis de

TGF β_2 y de IL-6 (esta Interleucina hace que los hepatocitos sinteticen varias proteínas plasmáticas, como el fibrinógeno, contribuyendo así a la respuesta de fase aguda, además de que sirve como factor de proliferación para las células B activadas en fases avanzadas de su diferenciación) (1, 3, 12); tienen además disminuidas la producción de IL-1, la translocación de proteína-quinasa, y la respuesta inmune celular, particularmente la del tipo Th₁ mediada por la IL-12; sin embargo, el proceso inflamatorio en la ancianidad no se ha estudiado sistemáticamente (12).

Los fagocitos mononucleares activado por el LPS son, por otra parte, los productores principales de TNF- α , no obstante que las células T activadas por el antígeno, las células NK activadas y los mastocitos activados también pueden producirlo. En ausencia de LPS, no se detecta, pero en presencia de LPS aumenta en los individuos viejos (3, 9). Junto con la IL-1 es responsable de la capacidad del macrófago para producir IL-6 .

Por su lado, la IL-12 es un heterodímero que consta de dos cadenas polipeptídicas unidas de forma covalente, una de 35 KD (p35) y otra de 40 KD (p40). La subunidad p35 la producen muchos tipos de células, incluidos los linfocitos T y B, las células NK y los mastocitos. La cadena p40 es producida principalmente por monocitos activados y células B, por lo que éstas se consideran las fuentes principales de la citocina completa.

A la IL-12 se le atribuye también la característica de ser el activador mas potente conocido de la célula NK, pero también estimula la diferenciación de las células T CD4⁺ nativas al subgrupo Th₁, además de estimular la diferenciación de las células T CD8⁺ a LTC activos y maduros.

Retomando el tema de los linfocitos T CD4⁺, cabe decir que los receptores de la célula T responsables del reconocimiento específico y de la respuesta a un antígeno mas el MHC, es un complejo de varias proteínas de la membrana plasmática. Además, se necesita de otras proteínas de superficie conocidas como moléculas accesorias. El receptor de los complejos péptido-MHC de la mayor parte de las células T (TCR, Receptor de Células T por sus

siglas en inglés) es un heterodímero que se compone de dos cadenas polipeptídicas denominadas α y β , unidas covalentemente entre sí por enlaces disulfuro. La cadena α es una glucoproteína ácida de 40 a 50 kD, y la cadena β es una glucoproteína neutra o básica de 40 a 50 kD.

Las cadenas α y β tienen regiones diferenciales, conocidas como:

V – Variable, la parte más externa del receptor, y que deriva en regiones hipervariables, que más adelante se mencionan dada su importancia en el reconocimiento de antígenos

C – Constante, la región del receptor más cercana al interior de la célula(24).

Entre estas regiones se encuentra la región J (del inglés *join*, unión), y sólo en el caso de la cadena β está presente un segmento de diversidad, D.

Las similitudes en las secuencias de aminoácidos y en la conformación entre las regiones V del TCR y las de las Ig refleja probablemente el hecho de que ambos tipos de moléculas tengan la función similar de unirse a antígenos extraños extremadamente diversos.

Dado que no se ha resuelto aún la estructura cristalográfica de rayos X del TCR, la estructura tridimensional del lugar de unión de los complejos péptido-MHC puede deducirse sólo a partir de homologías en la secuencia con las moléculas de anticuerpos, y de la estructura tridimensional conocida de las moléculas de Ig y del MHC. Hay al menos 3 regiones muy diversas en las dos cadenas α y β del TCR que corresponden a las regiones determinantes de la complementariedad de la unión al antígeno (CDR, del inglés Complementarity-Determining Regions) de las Ig. Se cree que estas regiones hipervariables forman los puntos de contacto con los complejos péptido-molécula del MHC. Dos de estas regiones hipervariables del TCR son codificadas por los segmentos genéticos V y J (en la cadena α) o los segmentos V, D y J (en la cadena β).

En base a la estructura terciaria predicha del TCR y de la secuenciación de genes del TCR a partir de un número elevado de células T monoclonales, se han establecido características con respecto a su especificidad:

- Por lo general, tanto la cadena α como la cadena β están implicadas en la unión con el péptido extraño y el MHC, propio; esto es, ninguna es específica de forma independiente para el antígeno o el MHC.
- Diferentes porciones de las regiones hipervariables de las cadenas α y β del TCR, es decir, las regiones V, D y J, pueden interactuar con los lados helicoidales de la hendidura de unión al péptido de las moléculas del MHC, o con los aminoácidos del péptido extraño que se proyectan al exterior de esta hendidura. Estos detalles estructurales sólo podrían esclarecerse mediante el análisis cristalográfico de moléculas de TCR unidas a complejos péptido-MHC, que, como ya se ha mencionado, aún no se realizan.
- El hecho de que un subtipo de células T reconozca antígenos unidos a moléculas del MHC de clase I o de clase II no depende del TCR, sino del marcador CD4 o CD8 que expresen en su superficie.

Tanto la expresión de las moléculas del TCR en la superficie celular como sus funciones en la activación de las células T dependen de otras cuatro o cinco proteínas asociadas al heterodimero $\alpha\beta$. Juntas, estas proteínas forman el llamado Complejo del TCR funcional. A tres miembros del complejo se les denomina proteínas CD3, y son una cadena γ glucosilada de 25 a 28 kD, una cadena δ glucosilada de 20 kD y una cadena ϵ no glucosilada de 20 kD. Muy probablemente estas cadenas CD3 existen como monómeros en el complejo CD3. Además, el 90% de los complejos del TCR contienen un homodimero de cadenas ζ no glucosiladas de 16 kD, y el 10% restante un heterodimero de una cadena ζ con una cadena η no glucosilada de 22 kD. Así pues, la composición mínima de los TCR mas comunes es $\alpha\beta:\gamma\delta\epsilon\zeta_2$.

Existe un sinergismo dramático en la coestimulación dada por cada una de las vías: la de la interacción CD28 con la familia B7 y la de la proliferación debida a IL-2; también se ha observado que conforme es mayor el grado de expresión del TCR es menos necesaria la coestimulación.

Cuando el antígeno se une al TCR, el CD3 y las cadenas ζ/η transducen las señales al citoplasma de la célula T, lo que conduce a su activación funcional.

Dentro de las moléculas accesorias del linfocito T mas importantes en el reconocimiento de antígenos asociados a moléculas del MHC, tenemos al CD4, que es una glucoproteína transmembranosa de aproximadamente 55 kD, que se expresa como un monómero sobre la superficie de las células T periféricas de los timocitos. Tiene 4 dominios extracelulares similares a los de las Ig, dos de ellos similares a los V y los otros dos que no se parecen a los C ni a los V. Además, hay una región transmembranosa hidrofóbica y una cola citoplasmática muy básica de 38 aminoácidos de longitud. El gen del CD4 se localiza en el cromosoma 12 del humano(18,24).

El CD4 sirve como molécula de adhesión debido a su afinidad específica por las moléculas de clase II del MHC. La molécula CD4 invariable se une a través de sus dos dominios N-terminales similares a los de las Ig al dominio β_2 no polimórfico de la molécula de clase II del MHC. La función adhesiva del CD4 puede ser más importante cuando la afinidad del TCR sea baja.

Además, la molécula CD4 puede transducir señales o facilitar el flujo de la señal mediada por el complejo TCR al unirse a las moléculas de clase II del MHC, promoviendo por lo tanto las respuestas funcionales posteriores de las células T restringidas por la clase II.

Existen otras moléculas accesorias implicadas en la activación de la célula T, como es el caso de las integrinas, el CD28, CTLA-4, CD2, CD45, CD5, Ly-6, CD44.

Aproximadamente 4 días después de la estimulación de células CD4 nativas, la población efectora puede sufrir expansión posterior, sufrir diferenciación terminal y morir, o tal vez revertir a una población de memoria. Así, estos últimos linfocitos generados por exposición aguda a un antígeno al principio de un cultivo no expresan RNAm de citocinas, pero en una re-exposición, se sintetiza rápidamente, 4-6 h, resultando en la síntesis de la citocina; los linfocitos no estimulados ni por antígenos ni por citocinas, persisten en cultivo por 2-5 días y luego sufren apoptosis (18, 19).

Cuando las células T se encuentran vírgenes, sin haberse estimulado, se encuentran en la fase G0 del ciclo celular; una vez que reciben el estímulo adecuado para su diferenciación y proliferación, entran en la fase G1, aumentando la síntesis de ARN en esta fase; al pasar a la fase S, el linfocito virgen sufre la diferenciación que lo hace célula efectora. Sólo en el caso de no haber diferenciación, la célula pasa a formar parte del grupo de los linfocitos T de memoria; aún no se conoce cuál (es) es(son) específicamente el(los) estímulo(s) que determina(n) que los linfocitos T, o B, se desarrollen como células efectoras o de memoria; de hecho, no se sabe si el marcador CD45RO queda expresado por el resto de la vida del linfocito T de memoria o si llegue algún momento en que ya no se exprese, quedando en su lugar la presencia del marcador CD45A.

Otros trabajos indican que, en el envejecimiento, las células presentadoras de antígenos tienen alterada la expresión sobre su membrana de las moléculas codificadas por el MHC. Existe también un aumento en la proporción de linfocitos T de memoria y una disminución en la de células T vírgenes CD45R; además presentan deficiencias para entrar al ciclo celular (4).

En caso de no haber apoptosis, ya que se ha reconocido el complejo péptido-molécula del MHC, las señales intracelulares que aumentan de forma transitoria la transcripción de varios genes que permanecen inactivos en las células T no estimuladas, hay una transducción precoz de la señal que desencadena la activación, la activación de diferentes genes así como de la

expresión de nuevas moléculas de superficie, además de la secreción de citocinas efectoras, realización de las funciones citolíticas o ambas y de la inducción de la actividad mitótica, resultando todo esto en:

- La proliferación de las células T, mediada básicamente por una vía de crecimiento autócrino, en la que la célula T secreta citocinas que promueven su propio crecimiento y expresa receptores de superficie para ellas (siendo la IL-2 el principal factor de crecimiento autócrino) llevando con esto a la expansión clonal de las células T específicas para el antígeno. Una parte de la progenie generada evoluciona a células T de memoria específicas para el antígeno.
- La principal actividad de las células T CD4⁺ es la secreción de citocinas con distinta actividad cada una, tanto sobre la misma célula generadora como sobre las células B, los macrófagos, otras células T, los leucocitos inflamatorios y el endotelio vascular.

De entre las citocinas generadas por los linfocitos T CD4⁺ como producto de su activación se puede mencionar a la IL-2, que es el principal factor de estimulación proliferativa para estas células (de hecho, se ha encontrado que los linfocitos activados en presencia de IL-2 por 1 o 2 semanas mantienen su habilidad para reestimularse por los antígenos y sintetizar citocinas luego de tal estimulación) (18, 19).

La producción de IL-2 depende particularmente de la co-estimulación a través de CD28 y también a través de LFA1 (CD11/CD18). La interleucina 2 y el factor transformante de crecimiento (TGF) β se sinergizan para bloquear la apoptosis y favorecer la expansión efectora extensiva.

Por otro lado, la IL-2 estimula la proliferación de las células NK y aumenta su función citolítica, produciendo las también conocidas como células agresoras activadas por linfocinas (células LAK); además, actúa sobre las células B humanas como factor de proliferación y como un estímulo para la síntesis de anticuerpos. Se ha encontrado que su producción disminuye en

individuos ancianos (4), que, además, en experimentos con envejecimiento acelerado en ratones, hay una caída dramática en sus niveles acompañada de un aumento en la producción de IFN- γ (11).

Otra citocina importante es la interleucina (IL) 4. La principal célula productora que se conoce de IL-4 es la T CD4+, específicamente el grupo de las Th2; de hecho, esta interleucina se utiliza como criterio de clasificación de las células T CD4+ en este subgrupo, pues es un factor de proliferación y diferenciación de las mismas; promueve el desarrollo de células Th2 productoras de IL-4 + IL-5, a partir de células T nativas estimuladas por antígeno.

Su papel mas importante se ha centrado en la respuesta de tipo alérgica, siendo necesaria para estimular el *Switching* en la conversión de las células B al isotipo de las IgE. Es pues, factor de proliferación para los mastocitos. También se le ha reconocido la estimulación de factores de crecimiento hematopoyético (5).

Esta interleucina inhibe, por otra parte, la mayor parte de los efectos activadores del IFN- γ sobre el macrófago, incluida la producción de IL-1, óxido nítrico y prostaglandinas, entre otros factores.

En la literatura se encuentran reportes de que en humanos en condiciones de salud, la producción de IL-4 no se altera significativamente con respecto al avance de la edad de los individuos, aunque sí se ve disminuida en ratones ancianos (3).

La IL-10, cuyas dos actividades principales son inhibir la producción de citocinas por los macrófagos (TNF, IL-1, quimiocinas e IL-12) e inhibir las funciones accesorias de los macrófagos en la activación de la célula T (es decir, inhibir la inflamación mediada por las células T), es producida en su mayor parte por células Th2, aunque también es producida por algunas células B activadas, por algunas células Th1 (en humanos), por macrófagos activados y por algunas células no linfocíticas (como los queratinocitos).

Su nivel de producción y efectos no se encuentran hasta el momento ampliamente estudiados con respecto al envejecimiento.

Para lo referente a las células Th1, estudiamos las condiciones del IFN- γ . También denominado por algunos autores como Interferón II, es considerado como el principal MAF (Factor Activador de Macrófagos, por sus siglas en inglés). Es un potente activador de los fagocitos mononucleares; induce directamente la síntesis de enzimas que median el estallido respiratorio, que permite a los macrófagos matar a los microorganismos fagocitados, así como células tumorales (con ayuda de segundas señales) (13).

Por otro lado, aumenta la expresión de moléculas de clase I del MHC y también provoca la expresión de moléculas de clase II del mismo complejo, sin embargo, se le considera como criterio de selección para células Th1. *In vivo*, puede aumentar las respuestas inmunitarias humorales y celulares a través de estas acciones en la fase de reconocimiento.

Adicional a esto, tenemos que también actúa sobre las células B para promover el "Switching" a las subclases IgG2a e IgG3 en ratones e inhibir el "Switching" a IgG1 e IgE; activa el estallido respiratorio de neutrófilos; estimula la actividad citolítica de las células NK y es activador también de las células endoteliales.

En animales viejos tratados con IL-12 exógena, se ve aumentada su producción (7).

Luego del reconocimiento del antígeno por parte del linfocito T CD4+ se da la fosforilación de la tirosina de la membrana y de las proteínas citoplasmáticas, mediada por la fosfotirosin cinasa (PTK). Esto conduce al acoplamiento y activación de la enzima fosfatidilinositol fosfolipasa C- γ 1 (PI:PLC - γ 1), que se fosforila entonces rápidamente y se acopla también al complejo TCR. No se conoce la PTK precisa que fosforila a la PLC - γ 1, pero

existen tres PTK diferentes implicadas en estas primeras fosforilaciones de la activación de la célula T: lck, fyn y ZAP.

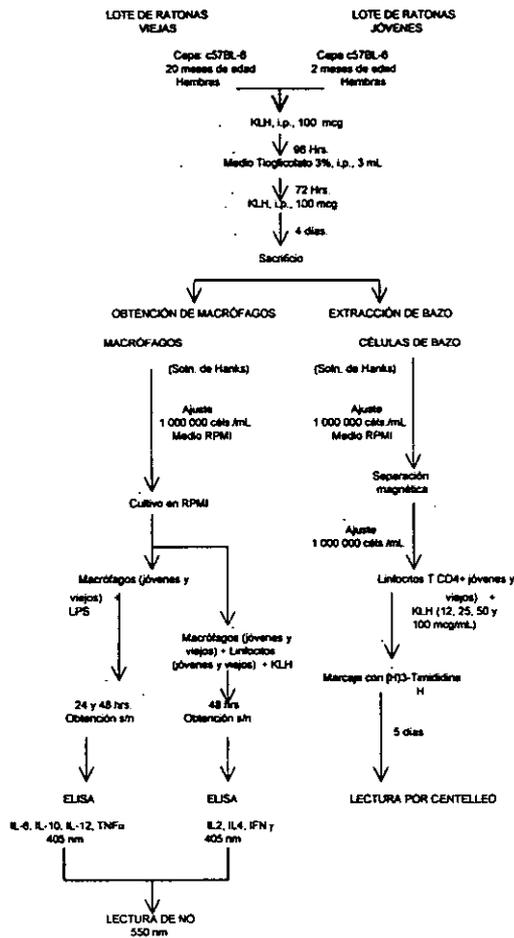
Luego, la PI-PLC- γ 1 cataliza la hidrólisis de un fosfolípido de la membrana plasmática llamado fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PtdInsP₂), llevando al aumento en la concentración plasmática de dos productos de la ruptura del PtdInsP₂: el inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y el diacilglicerol (DAG). La ruptura del PtdInsP₂ se sigue de la rápida elevación de la concentración del calcio citoplasmático ionizado, que depende del flujo extracelular al interior. Se forman complejos calcio-calmodulina, que pueden activar a varias enzimas, incluidas cinasas (que tienen diferentes sustratos de los de la PKC) promoviéndose de esta forma la activación de genes implicados en la proliferación de linfocitos y la producción de citocinas.

Otro elemento regulador clave en los primeros acontecimientos de la activación del linfocito T es la molécula CD45, que posee una actividad intrínseca tirosin fosfatasa en su cola citoplasmática.

Así pues, se ha demostrado que la calidad de la actividad de las APC es determinante en la capacidad de respuesta *in vitro* de las células T CD4+, siendo el resultado una deficiente respuesta global debida no tanto a una falla en las células T o a las de tipo B sino a la célula APC participante, siendo mas importante su presencia y activación en una respuesta primaria que en una secundaria. Además se observa que las células T CD4+ se van acumulando en el bazo con la edad (17).

CAPÍTULO 5

MATERIAL Y MÉTODO



Para el presente trabajo se ocuparon ratones hembra de la cepa C57BL/6. Se consideraron viejos a aquellos animales con 20 - 22 meses de edad, mientras que como animales jóvenes a aquellos con 2 meses de edad.

INMUNÓGENO E INDUCCIÓN DE MACRÓFAGOS Y DE LINFOCITOS T CD₄⁺

La inducción de proliferación de linfocitos T CD₄⁺ se realizó con la hemocianina KLH (Keyhole limpet Hemocyanin lyophilized Calbiochem, San Diego, California), a una dosis de 100 µg por ratón, disueltos en 1 mL de PBS, mediante inyección intraperitoneal.

La inducción de macrófagos se hizo con medio tioglicolato, al 3% (P/V), por inyección intraperitoneal de 3 mL de tal solución. El tioglicolato utilizado se disolvió por calentamiento y luego se esterilizó sometiéndose a 120 – 121°C (15-20 libras) durante 15 minutos.

Los períodos de inmunización, según se observa en el esquema, se realizaron inyectando el primer día una dosis de 100 µg de KLH disueltos en 1 mL de PBS; a las 96 horas se inducen los macrófagos mediante la inyección de 3 mL de la solución de tioglicolato mencionada; transcurridas 72 horas, se refuerza la inducción de linfocitos T CD₄⁺ por inyección intraperitoneal de otros 100 µg de KLH disueltos en 1 mL de PBS, sacrificando finalmente a los ratones 96 horas más tarde.

EXTRACCIÓN Y CULTIVO DE CÉLULAS

Una vez transcurridos los períodos de inmunización e inducción de células, se sacrificaron los ratones por desnucamiento, sumergiéndolos inmediatamente después en una solución de etanol al 50% con la finalidad de sanitizar el cuerpo del animal. En la cavidad peritoneal se inyectaron 5 mL de solución de Hanks (Ver preparación Anexo I), cuidando de no afectar a los intestinos se dio masaje en la misma zona por 2-3 minutos con el fin de recolectar de esta forma los macrófagos inducidos en esa área.

Luego de retirar la piel de la zona peritoneal, se extrajo por succión el lavado peritoneal que contenía a los macrófagos en suspensión, evitando extraer pedazos de tejidos ni sangre, colocando tal suspensión en tubos de centrifuga.

Una vez extraídos los macrófagos de cavidad peritoneal, se procedió a la apertura total de la zona abdominal y a la extracción del bazo de cada animal, depositándolos de inmediato en solución de Hanks.

Se realizó una perfusión a cada bazo para obtener las células del mismo, entre las que se encuentran los linfocitos T CD₄⁺. Tales células se depositaron después en tubos de centrifuga.

Tanto la suspensión con células de bazo como la que contenía los macrófagos de cavidad peritoneal se centrifugaron a 1500 –2000 rpm, decantando el sobrenadante y resuspendiendo las células en solución hemolizante por 3 minutos.

Estas soluciones hemolizadas se llevaron a volumen de 5 mL con solución de Hanks, se centrifugó nuevamente y decantó el sobrenadante, resuspendiendo finalmente en 1 mL de medio de cultivo RPMI suplementado.

Se procedió a la cuenta de células, previa tinción con azul tripano, en cámara de Neubauer (Bright-Line) y al posterior ajuste de número de células siguiente:

Células de bazo: se ajustaron a 3,000,000 células/mL

Macrófagos: se ajustaron a 1,000,000 células/mL.

La cuenta para el ajuste se hizo según el siguiente criterio:

Para las células de bazo:

$$\frac{\text{No. de células contadas} * 100,000}{3,000,000}$$

Para los macrófagos:

No. de células contadas * 100,000

1,000,000

El resultado corresponde al volumen a que se debe ajustar el total de las células correspondientes, con medio RPMI suplementado, restando 1 dado que ya había resuspensión en 1 mL de medio de cultivo.

Los macrófagos se incubaron en placas de cultivo de 24 pozos (Costar) durante 24 y 48 horas a 37°C, recuperando luego de estos períodos de incubación los sobrenadantes para hacer la cuantificación de las Inerleucinas por método de ELISA.

Se cultivaron macrófagos testigo, o basales, mismos a los que se les dejó en cultivo únicamente con medio RPMI, sin estimulación.

Para evaluar la respuesta de estas células se cultivaron macrófagos en el mismo medio con LPS de *E. coli* (Sigma) a una concentración de 10 µg/mL

Por otro lado, para evaluar su actividad como células presentadoras, se co-cultivaron con células T CD₄⁺ de la siguiente manera:

- Macrófagos de ratones jóvenes + células T CD₄⁺ de ratones jóvenes.
- Macrófagos de ratones jóvenes + células T CD₄⁺ de ratones ancianos.
- Macrófagos de ratones ancianos + células T CD₄⁺ de ratones jóvenes.
- Macrófagos de ratones ancianos + células T CD₄⁺ de ratones ancianos.

Las células T CD₄⁺ se cultivaron, una vez hecha la separación magnética, en las siguientes condiciones:

- Para evaluar la capacidad de respuesta inespecífica de los linfocitos T CD₄⁺ se cultivaron linfocitos con concavalina A, a una concentración de 2 µg/mL.

- Linfocitos con KLH.
- Linfocitos únicamente con medio RPMI suplementado.

Identidad de las células cultivadas

CITOMETRÍA DE FLUJO

Para conocer la proporción real de macrófagos cultivados se realizó un análisis de citometría de flujo indirecta, mediante el uso de un FACS (Fluorescence-activated Cell Sorter, o clasificador de células activado por fluorescencia) al momento de la obtención de los mismos y después de 2 horas de su adherencia en la placa de cultivo.

Este tipo de análisis se fundamenta en la unión de anticuerpos específicos para moléculas de membrana de células, en este caso macrófagos peritoneales de ratón, marcados con fluorescencia, donde la cantidad de anticuerpo unido a cada célula en una población se mide haciendo pasar a través de fluorómetro células suspendidas de una en una. El FACS tiene la capacidad, además de cuantificar las células marcadas con el anticuerpo utilizado, separar varias células, unidas a sus anticuerpos correspondientes marcados, a la vez tanto gráfica como físicamente.

Para esto se tomó una alícuota de $1 \cdot 10^6$ células, se suspendió en PBS frío y se centrifugó durante 10 minutos a 3000 rpm.

Se utilizó el anticuerpo monoclonal IgG1 de rata Anti Mac 3 marcado con FITC, durante 30 minutos a 4°C. El Mac 1 es el antígeno 1 de macrófagos, un miembro de la familia de las β -2 integrinas de moléculas de adhesión, también conocido como antígeno 1 receptor del componente C₃ del complemento.

Una vez hechos los lavados correspondientes se resuspenden los complejos Macrófago-anti Mac 3-FITC en PBS-paraformaldehído al 1% y se procede a la lectura de fluorescencia.

Para eliminar ruidos o lecturas falsas se leyeron (como controles del sistema):

- Células solas.
- Células + α Mac 3-FITC.
- Células + Rat IgG1 + estreptoavidina-FITC.
- Células + estreptoavidina-FITC

Los lavados se hicieron con PBS preparado en la misma forma que para el ensayo de ELISA adicionado de NaN_3 al 0.002%.

PURIFICACIÓN DE CÉLULAS CD4+ MEDIANTE SEPARACIÓN MAGNÉTICA

La purificación y cuantificación de células T CD4⁺ que se utilizaron para los cultivos se realizó mediante la técnica de MACS y posterior ajuste de número de células/mL.

Una vez separadas y ajustadas las células de bazo a 3 000 000 células/mL se sometieron a incubación con anticuerpos anti-CD4 unidos a su vez a microesferas magnéticas.

Una vez transcurrido el período de incubación, las células se hacen pasar a través de una columna acoplada a un campo magnético, que retendrá a las microesferas magnéticas, unidas previamente a anticuerpos anti CD4, que a su vez ya han formado complejos con la células que en su superficie han expresado tal marcador. El resto de las células pasan a través del campo magnético sin permanecer ahí.

Después de un lavado a la columna por la que ha pasado el total de la suspensión de células del bazo, se retira el campo magnético permitiendo así, mediante otro lavado con un volumen conocido de amortiguador de pH, la recolección de todas las células que salgan de la columna, siendo éstas exclusivamente CD4+.

El amortiguador de pH utilizado se hizo con PBS, como se preparó para

el ensayo de ELISA, y EDTA 2mM + Albúmina Sérica de Bovino al 0.5%, esterilizando por filtración.

Metodología de Evaluación indirecta de la actividad.

ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) TIPO SANDWICH

Ensayo enzimático cuantitativo en que se fija una cantidad determinada de anticuerpo específico para aquello que se está cuantificando, en este caso Interleucinas, a una superficie sólida (placas con 96 pozos de fondo cóncavo COSTAR).

Las partes de superficie no cubiertas con anticuerpo específico se bloquean con Albúmina Sérica de Bovino.

Se añade después la muestra en que se va a buscar y cuantificar la interleucina buscada, así como cantidades conocidas de la interleucina, a diferentes concentraciones en cuestión como referencia o curva patrón.

Se utiliza después un segundo anticuerpo marcado con biotina, o biotinilado (Pharmingen), específico también contra la Interleucina a cuantificar.

Se forma luego un complejo con esta biotina adicionando estreptoavidina-peroxidasa (Streptoavidin-horserdih peroxidase conjugate Amersham Life Science), en una concentración de 1:1000 partes, con el fin de amplificar la reacción de reconocimiento y llevar a cabo así una cuantificación mas precisa.

Se evidencia la cantidad de estreptoavidina-peroxidasa que se une mediante el desarrollo de color al reaccionar ésta con ABTS [150 mg de 2,2'-Azino-bis(ácido sulfónico 3-etilbenzotiazolona en 500 mL de ácido cítrico 0.1M, a pH de 4.35], sustrato de la peroxidasa (ABTS single solution Zymed), y se lee espectrofotométricamente a 405 la intensidad de color desarrollado, cuantificando así indirectamente la cantidad de Interleucina presente tanto en los pozos de la curva patrón como en los pozos con cantidades desconocidas a

través de los resultados de regresión lineal obtenidos de tal curva. Las lecturas se hicieron con un Lector de placas de ELISA Dynex Technologies MRX Serie ICXC 1373 con impresora Star NX-1001.

Se debe obtener una relación lineal, pues la intensidad de color desarrollada es directamente proporcional a la cantidad de Interleucina presente, determinándose de manera homóloga a la ecuación de una recta a "y" como la absorbancia leída, "x" como la concentración de Interleucina y m, o pendiente, como la cantidad de color desarrollado (absorbancia) en relación con la concentración de Interleucina, cumpliendo con la Ley de Lambert – Beer.

Todos los anticuerpos utilizados son Purified rat anti-mouse Pharmingen.

La actividad de los macrófagos como células presentadoras de antígeno se realizó en sobrenadantes de su co-cultivo con linfocitos T CD₄⁺ mediante la cuantificación de citocinas por técnica de ELISA. (Ver preparación de soluciones Anexo I).

PROLIFERACIÓN DE LINTOCITOS T CD₄⁺

Para conocer la capacidad de proliferación de las células T CD₄⁺ se hizo un marcaje con [³H]-Timidina (Sigma) a una concentración de 10 mCi/mL midiendo luego las cuentas por minuto dadas para cada situación de desarrollo.

MEDICIÓN DE NO₂-

Como parámetro de respuesta de los macrófagos se midió la producción de Oxido Nítrico, mediante la reacción colorida que este óxido da al reaccionar con el reactivo de Griess:

SOLUCIÓN A

Clorhidrato de naftiletilendiamina al 0.1% en agua destilada.

SOLUCIÓN B

Sulfanilamida al 1% en H_3PO_4 al 5%

La solución A y la solución B se mezclaron a volúmenes iguales y se adicionaron a $70\mu\text{L}$ /pozo y se permitió el desarrollo del color durante 10 minutos a temperatura ambiente.

La coloración desarrollada se evaluó leyendo espectrofotométricamente con un filtro a 550 nm para lectura y otro a 620 nm como referencia, siendo la intensidad de color (o absorbancia) directamente proporcional con la cantidad de Óxido Nítrico presente en el medio, obteniéndose un comportamiento acorde con la Ley de Lambert y Beer.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS

Para el presente trabajo se realizaron tres experimentos con el esquema de inmunización y cultivo descritos en el Capítulo 5.

Sin embargo, no se llevaron a cabo las lecturas de todos los parámetros en todos los experimentos contemplados, por causas ajenas a nuestra voluntad, como se podrá observar mas adelante.

EXPERIMENTO 1

Se utilizaron 10 ratones hembras de la cepa C57BL/6: 5 de 2 meses de edad y 6 de entre 20 y 22 meses de edad.

EXPERIMENTO 2

Se utilizaron originalmente 10 ratones hembra de la cepa C57BL/6: 5 de 2 meses de edad y 5 de edades entre los 20 y los 22 meses. Uno de los individuos de menor edad murió por error en la aplicación de la segunda dosis de KLH, por lo tanto se hicieron las mediciones sólo con los sobrenadantes de los cultivos de células provenientes del resto de animales inmunizados.

EXPERIMENTO 3

Se utilizaron 10 ratones hembra de la cepa C57BL/6: 5 de 2 meses de edad y 5 de entre 20 y 22 meses de edad.

En todos los cultivos de macrófagos únicamente, se hicieron cultivos testigo de células en crecimiento sin presencia de LPS (basales), en los que no se detectó significativamente la presencia de las citocinas medidas, y sólo se reportan los resultados correspondientes a los sobrenadantes de cultivos en que se incluyen LPS.

En el caso de los co-cultivos de macrófagos y linfocitos T CD4+ también se realizó en paralelo la incubación de células en las mismas condiciones, sin adición de KLH (basales), que tampoco se reportan aquí.

Al final de las mediciones realizadas en todos los experimentos en forma individual se realizó un "pool" con los sobrenadantes restantes de cada uno, correspondientes entre sí y se hicieron determinaciones finales (confirmatorias) sobre todo en aquellos parámetros que no se pudieron medir al inicio del trabajo.

En las gráficas obtenidas por análisis de citometría de flujo para la estimación cualitativa de la población de macrófagos contenidos en los cultivos realizados no observaron irregularidades en cuanto a las características y proporción de tales células presentes en las muestras. Las gráficas e

imágenes correspondientes no fue posible que se imprimieron por causas ajenas.

En todos los casos se presentan los valores individuales de cada experimento y finalmente los resultados correspondientes al "pool" de sobrenadantes.

En virtud de que las cifras de niveles de citocinas presentados para cada experimento tienen órdenes diferentes (algunos valores, dentro de las centenas y otros dentro de los millares), no se considera posible hacer un análisis de promedio de los resultados obtenidos, ni de desviación estándar, dado que aún con estas diferencias de órdenes, los comportamientos mostrados en las producciones de citocinas y niveles de proliferación celular contemplados resultan ser los mismos en todos los casos.

Los resultados se presentan de acuerdo a la actividad desarrollada por cada tipo de célula.

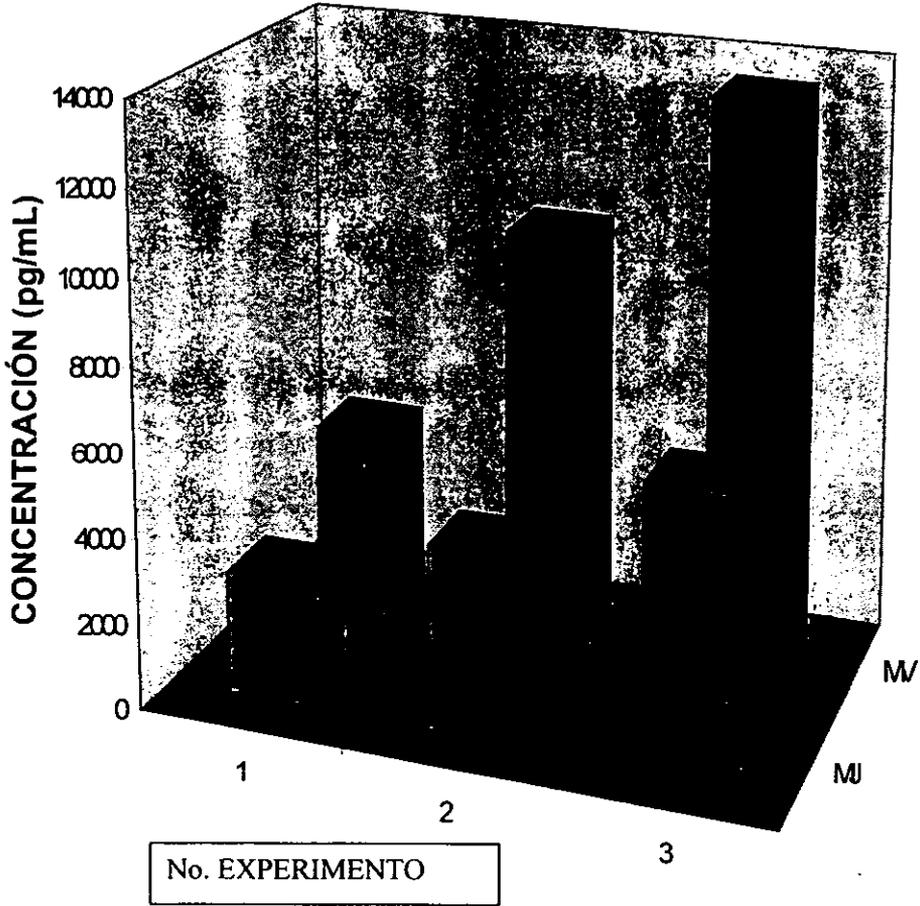
Los experimentos y determinaciones realizadas se resumen de la siguiente manera:

PARÁMETRO DETERMINADO	EXPERIMENTO 1	EXPERIMENTO 2	EXPERIMENTO 3	EXPERIMENTO 4 (POOL)
IL-6	Sí se realizó	Sí se realizó	Sí se realizó	No se realizó
IL-10	Sí se realizó	Sí se realizó	Sí se realizó	No se realizó
IL-12	Sí se realizó	Sí se realizó	Sí se realizó	No se realizó
TNF- α	No se obtuvo lectura	Sí se realizó	Sí se realizó	No se realizó
Óxido Nítrico	No se realizó	No se realizó	Sí se realizó	Sí se realizó
IL-2	No se realizó	No se realizó	No se realizó	Sí se realizó
IL-4	Sí se realizó	Sí se realizó	Sí se realizó	Sí se realizó
IFN- γ	Sí se realizó	Sí se realizó	Sí se realizó	Sí se realizó
Proliferación de Linfocitos T CD4+	Sí se realizó	Sí se realizó	Sí se realizó	No se realizó

Las abreviaturas utilizadas en las gráficas:

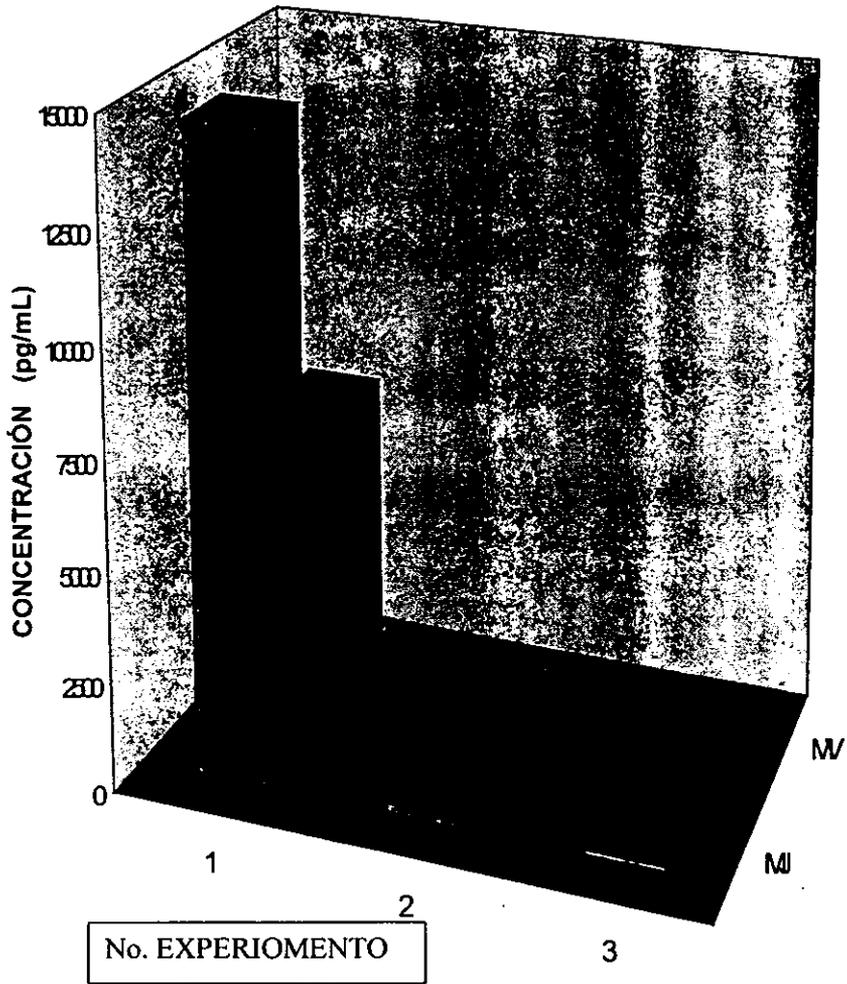
MJ = macrófagos de animales jóvenes LJ = linfocitos T CD4+ de animales j
 jóvenes
 MV = macrófagos de animales viejos LV = linfocitos T CD4+ de animales
 viejos

PRODUCCIÓN DE IL-6



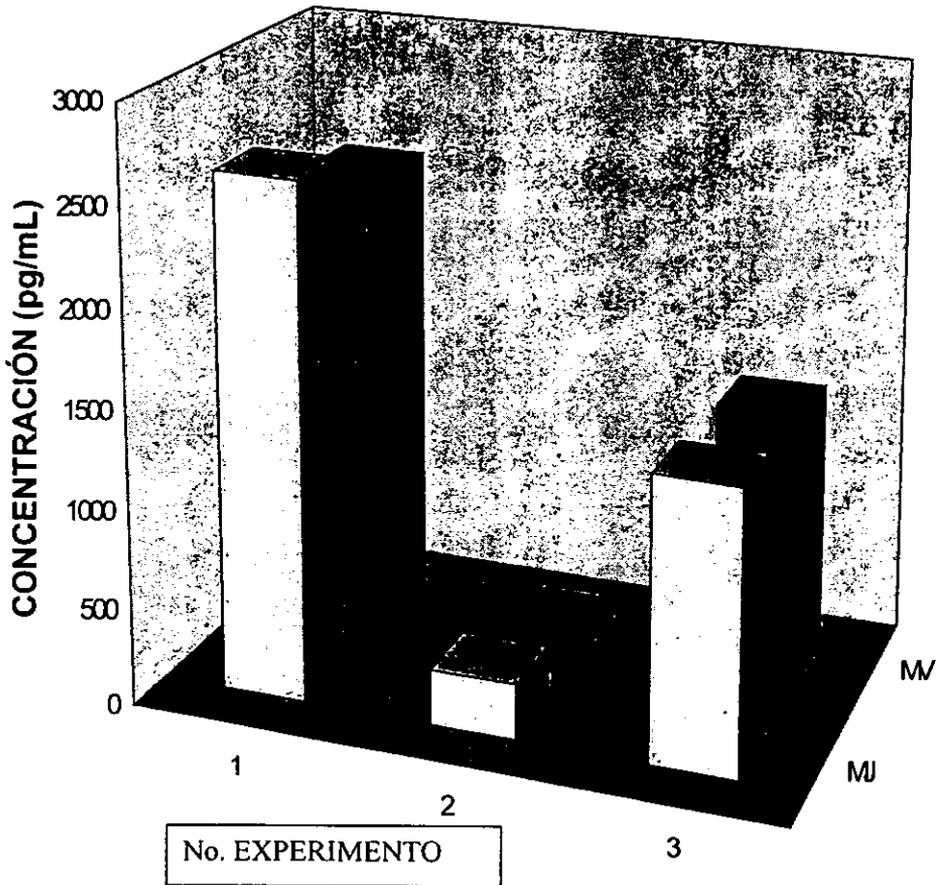
	1	2	3
■ MJ	2894.0296	4274.2691	6489.3264
■ MW	4489.2315	9891.5339	13548.6658

PRODUCCIÓN DE IL-10



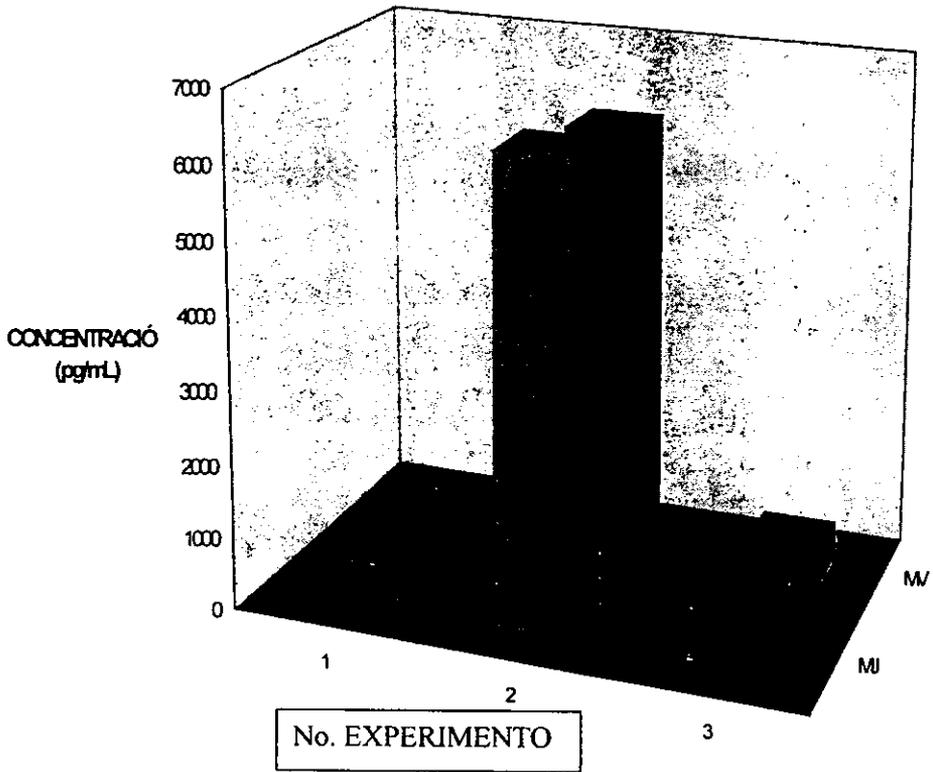
	1	2	3
■ MJ	1465.1349	2059.6204	1280.0069
■ M	675.111	186.9662	88.9076

Producción de IL-12



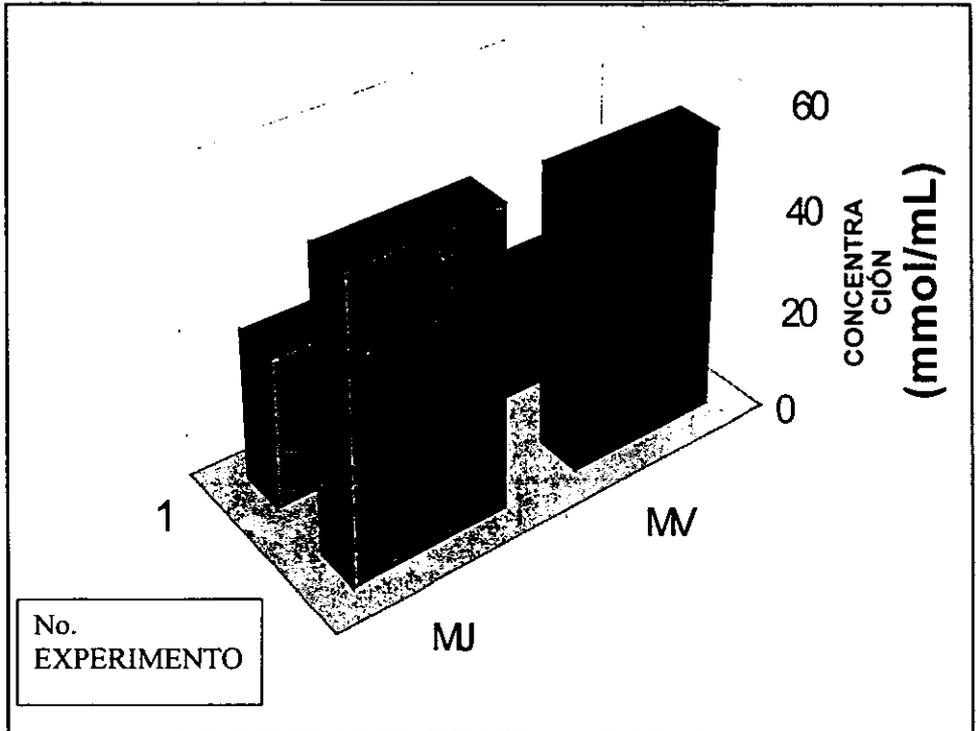
	1	2	3
□ MJ	2618.819	276.9123	1424.8977
■ MW	2359.5024	47.93	1365.7109

PRODUCCIÓN DE TNF- α



	1	2	3
■ MJ	0	6347.7215	763.0915
■ MW	0	5991.3682	487.932158

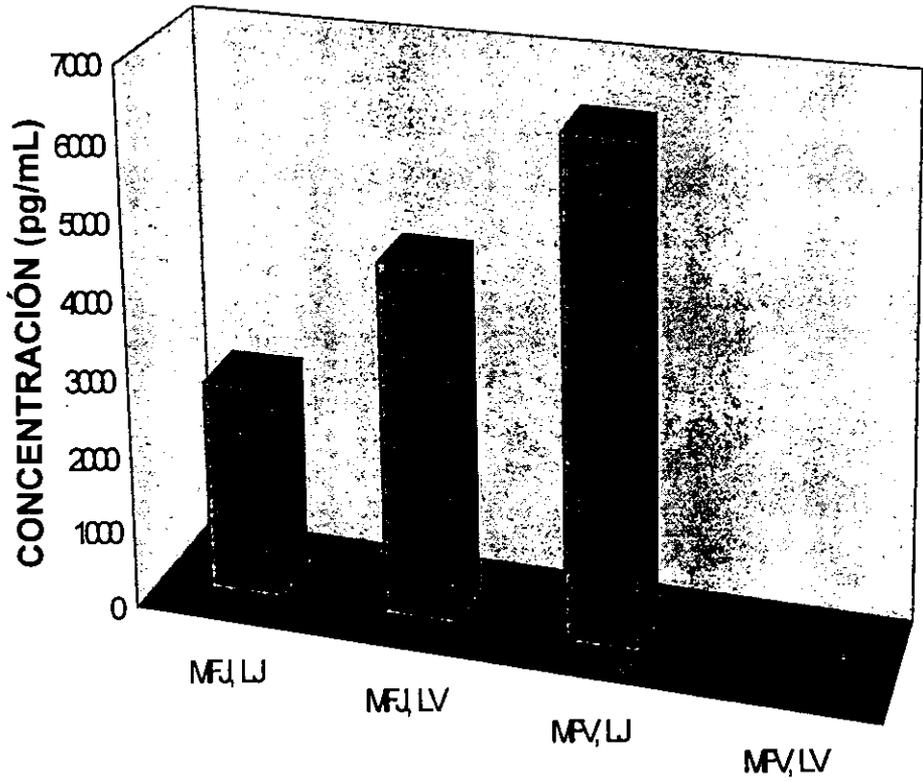
ÓXIDO NÍTRICO



No.
EXPERIMENTO

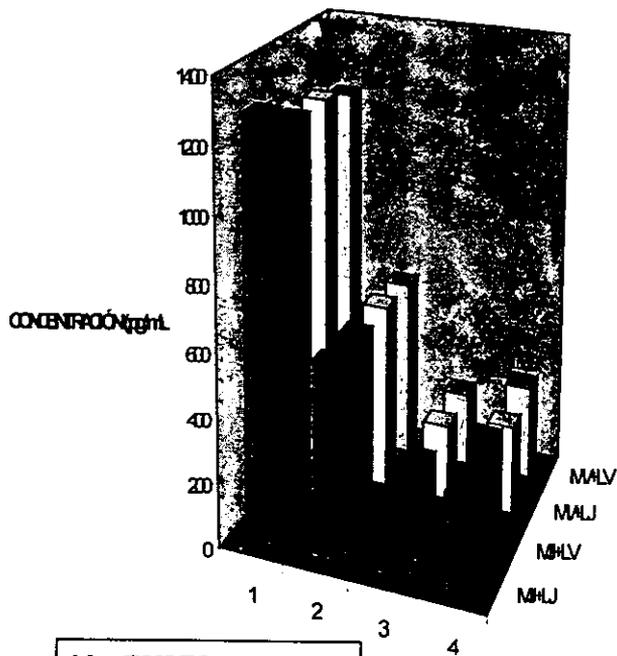
	1	2
MJ	29.1383	57.1027

PRODUCCION DE IL-2



	MFJ, LJ	MFJ, LV	MFV, LJ	MFV, LV
DETERMINACION UNCA	2745.506	4558.5079	6423.5162	0

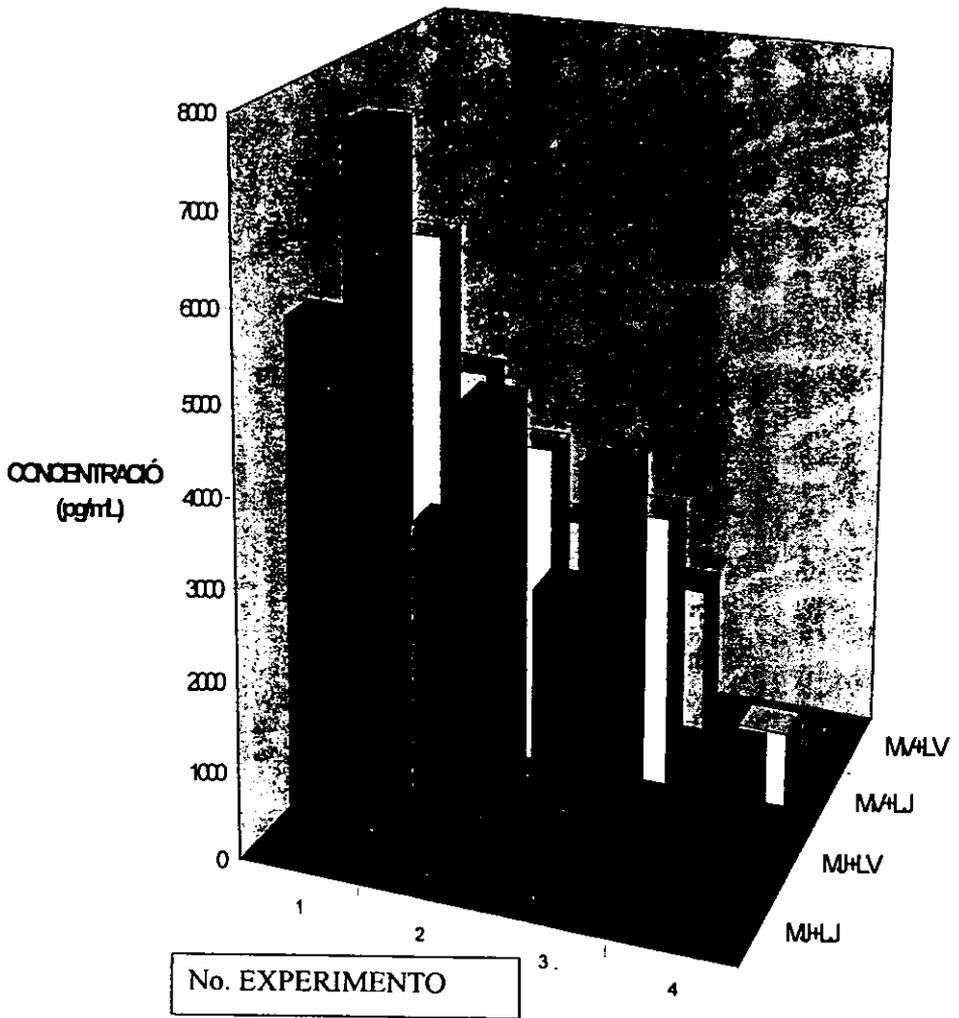
PRODUCCIÓN DE IL-4



No. EXPERIMENTO

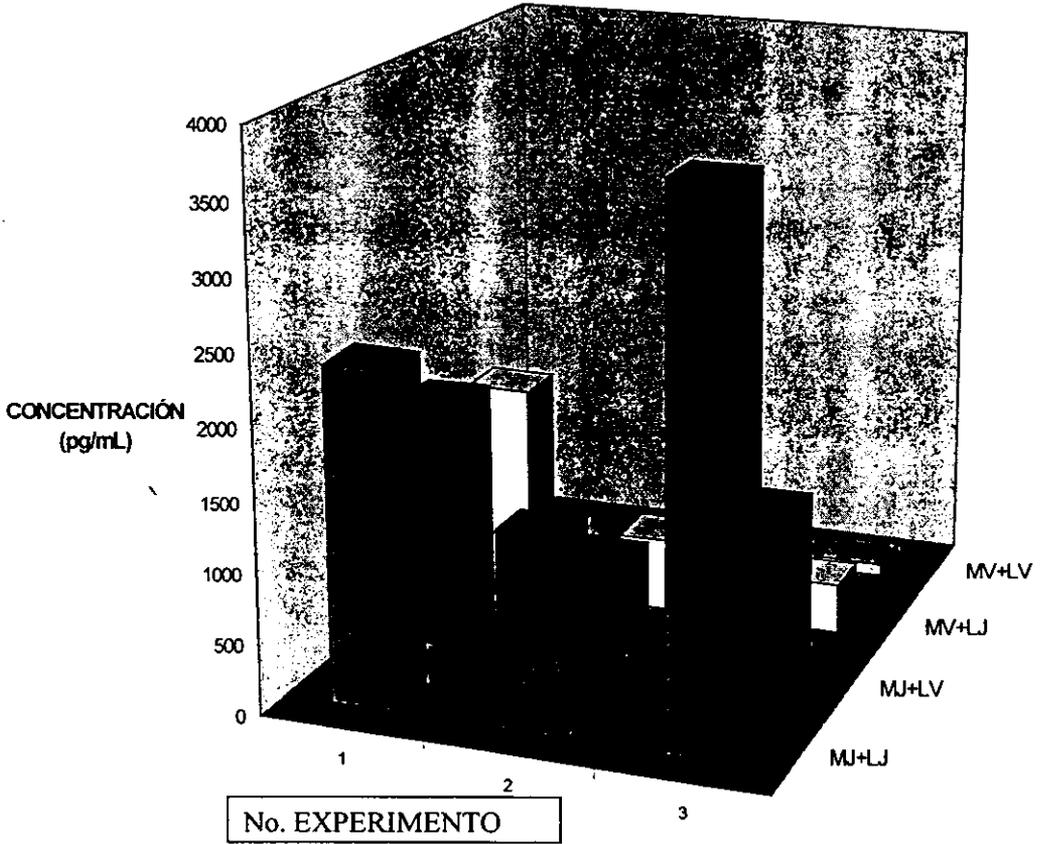
	1	2	3	4
■ MHLJ	12874729	5898417	2003001	2948328
■ MHLV	12122921	5803469	2239259	3388328
□ MALJ	12092466	5791642	2353092	275533
□ MAL	1165304	5642195	234664832	2880247

PRODUCCIÓN DE IFN- γ



	1	2	3	4
■ MHLJ	5840.6115	3830.1684	3367.125	1217.68
■ MHLV	7532.75109	4701.3265	4169.2198	1260.7
□ M+LJ	5949.7817	3702.1568	3101.4697	853.39
□ M+LV	3930.131	2270.1647	1669.1366	10

RESPUESTA PROLIFERATIVA DE LINFOCITOS T CD 4+



	1	2	3
▣ MJ+LJ	2371.4583	1366.4297	3807.9421
■ MJ+LV	1785.9814	786.5213	1286.5
□ MV+LJ	1530.6842	529.1697	354.6536
□ MV+LV	0	26.4231	95.2347

CAPÍTULO 7

ANÁLISIS DE RESULTADOS

Es sabido que la población de linfocitos de memoria aumenta en número durante el proceso de envejecimiento, a su vez disminuye el nivel de las células vírgenes. Aunque no se sabe aún cuál (es) es (son) el (los) mecanismos que determinan el que una célula T, o B, se diferencien en célula efectora o de memoria, es conocido que estas células tienen dificultad para entrar en el ciclo celular en un estado de ancianidad (11). Probablemente esta situación tenga mucho que ver con una estimulación disminuida para que se dé tal diferenciación y se pueda desarrollar memoria efectivamente en un estado de envejecimiento.

En tal caso, resulta de vital importancia el papel de las células presentadoras de antígenos (que es el caso de los macrófagos activados).

Los resultados arrojados por el presente trabajo muestran que efectivamente hay una disminución determinante en la capacidad de los macrófagos como células presentadoras de antígenos, que repercute en una posibilidad limitada de proliferación por parte de los linfocitos T CD4+, que a su vez no parecen tener per se tan limitada su posibilidad de reconocer antígenos y activarse.

La respuesta proliferativa de los linfocitos T CD4+ de animales jóvenes al inmunógeno KLH fue estimulada en menor grado al co-cultivarse estas células con macrófagos de animales viejos (hay un 63.73 % de inhibición).

Al co-cultivarse linfocitos CD4+, alternando con macrófagos de animales jóvenes y viejos, la tendencia es la misma: un 97.95% de diferencia entre los cultivos en que se incluían macrófagos provenientes de ratones ancianos y

aquéllos con células de este tipo pero obtenidos de individuos jóvenes. Esta caída es más dramática engañosamente, pues al comparar la diferencia entre ambos tipos de Linfocitos estando presentes macrófagos extraídos de animales ancianos (una diferencia del 54.67%) con los que estaban en presencia de estas células provenientes de animales jóvenes (del 97.43%), se ve que la diferencia es muy notoria y apunta a una deficiencia en los macrófagos para estimular la proliferación de los linfocitos T CD4+ (aunque no se pierde de vista la deficiencia de estos últimos dada la avanzada edad de los individuos de que se extrajeron).

Esto se correlaciona con la baja producción de IL-2, reportada por algunos autores, en relación con individuos ancianos, utilizando cultivos de células tanto humanas como murinas, situación que aquí se ve reflejada como una producción igual de tal citocina por parte de linfocitos, ya fuera de animales jóvenes o ancianos al estar en contacto con macrófagos extraídos de ratones jóvenes, viéndose depletada en los cultivos donde estaban presentes macrófagos de animales viejos hasta en un 29.74% cuando hay presencia de linfocitos obtenidos de ratones jóvenes, y sin detectarse siquiera en los sobrenadantes de cultivos en que ambos tipos celulares provenían de los animales con la edad mas avanzada. Cabe mencionar que este resultado lo presentamos únicamente como informativo y no podemos concluir determinadamente en base a él, pues no se realizó una cantidad representativa de mediciones que nos permitieran hacer un análisis estadístico confiable; por el contrario, sólo se realizó una vez la cuantificación de esta interleucina.

Sin embargo, y por otra parte, no se ha ahondado en el estudio del nivel de receptores de IL-2, ni de expresión de CD28; sin embargo, se ha visto una elevación en la expresión de TGF- β en la ancianidad (lo que llevaría a la apoptosis de la célula). Tampoco, por otra parte, se ha establecido el "status" de las enzimas y moléculas involucradas en la cadena efectora de proliferación del linfocito T de individuos ancianos (así como de la producción de Interleucinas), como es el caso de la tirosina, las PTKs, proteínas plasmáticas, PLC- γ 1, que pudieran apuntar a una baja optimización en la estimulación de tales factores.

Se obtuvo, por otra parte, una disminución dramática en la producción de IL-12 por parte de los macrófagos de animales ancianos, en relación con aquéllos provenientes de individuos jóvenes. Esto explica la caída en los niveles de IFN- γ al co-cultivarse células CD4+ de animales (ya sea jóvenes o ancianos) con macrófagos de individuos viejos, en comparación con los cultivos en que se incluían macrófagos de individuos jóvenes. Esta observación coincide con los resultados de autores que mencionan que su producción se optimiza mediante la adición externa de IL-12 en cultivos de linfocitos de ratones ancianos (7). De hecho, los linfocitos de animales con esta última característica en co-cultivos con macrófagos de los ratones de menor edad muestran la mayor patrón de producción de IFN- γ , obteniéndose un 3.53 % de producción por arriba del nivel observado para los co-cultivos de linfocitos de animales jóvenes con macrófagos provenientes de estos mismos individuos, lo que indica que los linfocitos T CD4+, aún provenientes de animales viejos tienen la capacidad de producir tal citocina a niveles comparables con las que poseen las células homólogas provenientes de individuos jóvenes, siempre que la estimulación sea la adecuada (situación que se alcanza con la presencia de macrófagos de animales jóvenes y no así por las células del mismo tipo obtenidas de ratones ancianos).

Por el contrario, los co-cultivos en que intervinieron macrófagos de ratones ancianos presentaron los niveles mas bajos de producción de IFN- γ (aproximadamente 30 % mas abajo que en el caso macrófagos de animales jóvenes-linfocito T CD4+ de ratones ancianos) y una caída mas acentuada para los sobrenadantes de co-cultivos con ambos tipos celulares provenientes de individuos ancianos (1.17% del nivel alcanzado por los cultivos con macrófagos extraídos de ratones jóvenes y linfocitos T CD4+ de animales seniles).

La producción de IL-12, por su parte, muestra una disminución del 10.06% por parte de los macrófagos obtenidos de ratones viejos, en relación con los niveles alcanzados por las células homólogas extraídas de los individuos de menor edad.

Los niveles de IL-6 se observan elevados en un estado de envejecimiento, como se ha reportado ya por varios autores, lo que habla del favorecimiento de expresión de TGF reportado en la literatura (1, 3, 12).

La dramática estimulación de producción de IL-6 por parte de los cultivos de macrófagos de ratones ancianos nos da un aumento de 159.76 puntos porcentuales por arriba de lo producido por los macrófagos provenientes de animales jóvenes. Sin embargo, los niveles de IL-6 no se pueden atribuir a una disminución en la producción limitada de TNF- α , pues esta última citocina se ve disminuida en su expresión por parte de los macrófagos obtenidos de ratones viejos en comparación con los resultados arrojados por estas mismas células obtenidas de ratones jóvenes.

Esta disminución de producción de TNF- α lleva al favorecimiento, por otra parte, de una respuesta tipo Th2, que a su vez es congruente con los reportes encontrados en la bibliografía, además de que apoya la idea de que la disminución de esta citocina puede estar relacionada con la mayor susceptibilidad al cáncer en individuos ancianos.

Esta inclinación hacia una respuesta de tipo Th2 se observa en los niveles de IL-4, cuya diferencia entre las diferentes condiciones de cultivo no es estadísticamente significativa; se ha reportado que esta citocina no se ve alterada en su producción por parte de células mononucleares obtenidas de individuos humanos tanto jóvenes como ancianos (aunque en estudios hechos con células murinas se ve disminuido su "status" conforme aumenta la edad de los animales de que se obtengan).

De aquí que tampoco se pueda culpar a una inhibición en la estimulación de los macrófagos en un estado de envejecimiento, para que éstos a su vez estimulen a los Linfocitos T CD4+, dado que la IL-4, entre otras cosas, funge como inhibidor de los activadores del IFN- γ sobre los macrófagos.

Adicional a todo esto, la observación de los resultados obtenidos demuestra que no se puede señalar una inhibición de la actividad linfocítica literalmente, sino de una estimulación deficiente. Eso se deriva de que, además de lo ya mencionado, la producción de IL-10 se vio depletada en los cultivos de macrófagos obtenidos de los animales más viejos, hasta en un 53.28 % en comparación con los niveles presentados por este mismo tipo de células extraídas de ratones jóvenes. Si hay una baja en el nivel de IL-10, hay una baja en la inhibición de la activación de las células T, que se cuenta entre las actividades llevadas a cabo por esta interleucina.

Existen aun muchas interrogantes en cuanto a la presentación de antígenos por parte de los macrófagos hacia los linfocitos T CD4+, como es el caso del lugar exacto dentro de ellos en que se da la asociación del péptido procesado con las moléculas de clase II del MHC, ni cómo es que no haya una degradación completa de tales péptidos hasta aminoácidos (con lo que se daría una presentación ineficiente del antígeno, en caso que se llegue a tal presentación); tampoco se ha comprendido bien cuál es exactamente el papel de las proteínas acompañantes de los péptidos hasta su "encuentro" y asociación con las moléculas de clase II del MHC.

En este sentido, se propone que, a partir de estos resultado que muestran una papel más crucial de la limitación de los macrófagos como Células presentadoras de antígenos que de los linfocitos T CD4+ como células que reconocen y reaccionan, se lleven a cabo estudios mas específicos para cada uno de los aspectos involucrados, como los mencionados anteriormente, mismos en que no se ha profundizado aún en estados "normales".

CAPÍTULO 8

CONCLUSIONES

En el envejecimiento existe una capacidad disminuida de los macrófagos para presentar antígenos a los linfocitos T CD4+ y, por tanto, para activar a éstos últimos.

Por su parte, los linfocitos T CD4+ no tienen afectada de manera significativa para responder a la activación de macrófagos en co-cultivos de estos dos tipos de células.

De la misma manera, se ve favorecida la respuesta inmune de tipo Th2, con respecto de la del tipo Th1, en cuanto al proceso que se desencadena luego de la presentación de antígenos a los linfocitos T CD4+ por parte de los macrófagos, lo que puede explicar la relación de células T de memoria, aumentadas en número, frente a la cantidad de células T vírgenes, disminuidas a su vez, que en individuos ancianos da como resultado un número engañosamente igual de este tipo de células totales en relación con las células presentes en individuos jóvenes.

Anexo I

Para preparar la solución de Hanks se utilizaron:

SOLUCIÓN A (solución 10X, para 1L)

1)

50 g NaCl J.T. Backer

4 g KCl Merck

2 g MgSO₄.7H₂O Merck

400 mL H₂O

2)

1.4 g CaCl₂ Merck

50 mL H₂O

Se mezclaron 1) y 2) y se aforaron a 500 mL

SOLUCIÓN B

1.5 g Na₂HPO₄ . 12 H₂O J. T. Backer

0.60 g KH₂PO₄ Merck

10.0 g Glucosa anhidra Sigma

400 mL H₂O

Se adicionó rojo de fenol al 0.4%, 0.5 mL y se llevó a volumen final de 500 mL.

Las soluciones A y B se esterilizaron a 12 libras de presión por 12 minutos y una vez frías, se mezclaron y se refrigeraron para su uso posterior.

La solución hemolizante se preparó de la siguiente manera:

SOLUCIÓN A

0.87 g NH_4Cl J. T. Backer

100 mL H_2O

SOLUCIÓN B

2.05 g Tris-base Research Organics

100 mL H_2O

Se tomaron 8 partes de A + 2 partes de B, se ajustó el pH a 7.4 y se esterilizó a 120°C (15-20 libras) por 15 minutos.

El NaHCO_3 0.1M, pH 8.2 se preparó con NaHCO_3 Sigma.

Para la preparación del PBS 10 X se mezclaron:

3.864 g NaH_2PO_4 J.T.Backer

10.224 g Na_2HPO_4 Prod. Quím. Monterrey

74.0 g de NaCl J.T. Backer

Se aforaron a 1000 mL y se ajustaron a pH de 7.2-7.4 (pHmetro ORION Mod. 410A)

La solución de PBS-Tween 20 lleva una proporción de 0.5 mL de Tween por cada litro de PBS.

Todas las incubaciones para fijar anticuerpos e interleucinas se hicieron a 4°C durante toda la noche.

BIBLIOGRAFÍA

- (1) Terrazas Valdés L. Ignacio, García Tamayo F.; Envejecimiento e Inmunidad; 19?.
- (2) Belmin J., Bernard C. et al.; Increased production of tumor necrosis factor and interleukin-6 by arterial wall of aged rats; *Am J. Physiol*; 6 pt 2: 268; jul, 1995.
- (3) Caruso C., Candore G. et al; Cytokine production pathway en the elderly; *Immunol. Res.*; 15 (1): 84-90; 1996.
- (4) Globerson A.; T lymphocytes and aging; *Int. Arch. Allergy Immunol*; 107: 491-7; Aug., 1995; .
- (5) Maestroni G. J.; T-helper-2 lymphocytes as a peripheral target of melatonin; *J. Pineal Res.*: 18 (2): 84-9; Mar, 1995.
- (6) Yoneda K, Yamamoto T. et al; Influence of aging and chemoradiotherapy on leucocyte function en oral cancer patients; *Eur. J. Cancer B Oral Oncol.*; 31B (2): 144-50; Mar, 1995.
- (7) Cooper A M, Callahan J E et al; Old mice are able to control low-dose aerogenic infections with *Mycobacterium tuberculosis*; *Infect. Immunol*; 63 (9): 329-65; sep, 1995.
- (8) Miller D J, Yoshikawa TT et al; Effect of age on fever response to recombinant interleukin-6 in a murine model; *J. Gerontol. A. Biol Sci Med Sci.*; 50 (5): M276-9; sep, 1995.
- (9) Jeffery A. Hobden, Sharon A. et al; Proinflammatory Cytokine Deficiency and Pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* Keratitis in Aged Mice; *Infec. and Immunity*; 65(7): 2754-8.
- (10) Tamir S, de Rojas-Walker T et al; Nitric oxide production en relation to spontaneous B-cell lymphoma and myositis in SJL mice; *Cancer Res.*; 55: 4391-7; oct, 1995.
- (11) Aoki K, Asano K et al; Age-related changes in Con A-induced cytokine production by splenocytes from senescence accelerated mice; *Immunol Lett*; 46(1-2): 169-75; may, 1995.
- (12) Asheroft G S, Horan M A et al; The effects of ageing on cutaneous wound healing in mammals; *J. Anat*; 187(Pt 1): 1-26; ago, 1995.
- (13) Masanori Utsuyama, Zsuzsa V. et al; Influence of age on the signal transduction of T cells in mice; *Internat Immunol*; 5 (9): 1177-82; jun, 1993.
- (14) Sato I., Kaji K., et al; Age related decline in cytokine induced nitric oxide

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

synthase activation and apoptosis in cultured endothelial cells: minimal involvement of nitric oxide in the apoptosis; *Mech Ageing Dev.*; 81: 27-36; jun, 1995.

- (15) Cannon J.G.; Cytokines in aging and muscle homeostasis; *J Gerontol A. Biol Sci Med Sci*; 50 Spec: 120 – 3; nov., 1995.
- (16) Mocchegiani E., Santarelli L, et al; Reversibility of the thymic involution and of age-related peripheral immune dysfunctions by zinc supplementation in old mice; *Int J. Immunopharmacol*; 17 (9): 703-18; septiembre, 1995.
- (17) Craig D., Molowitz E, et al; Spleen cells from antigen-minimized mice are superior to spleen cells from germ-free and conventional mice in the stimulation of primary *in vitro* proliferative responses to nominal antigens; *Eur. J. Immunol*; 25: 212-17; 1995.
- (18) Swain S.; CD4 T cell development and cytokine polarization: an overview; *J Leukocyte Biol*; 57: 795-98; mayo, 1995.
- (19) Swain S., Croft M., et al; From naive to memory T cells; *Immunol Rev*; 150: 143-167; 1996.
- (20) Miglioni P., Corradin G et al; Macrophage NO₂ production as a sensitive and rapid assay for the quantitation of murine IFN- γ ; *J Immunol Methods*; 139: 107-114; 1991.
- (21) Jun H. S., Santamaria P.; Absolute requirement of macrophages for the development and activation of beta-cell cytotoxic CD8+ T-Cell receptor transgenic NOD mice; *Diabetes*; 48(1): 34-32; Enero, 1999.
- (22) Khare V., Sodhi A et al; Age-dependent alterations in the tumoricidal functions of tumor-associated macrophages; *Tumor Biol.*; 20 (1): 30-43; Enero-febrero, 1999.
- (23) Sedwick C.E., Morgan M.M., et al.; TCR, LFA-1 and CD28 play unique and complementary roles in signaling T Cell cytoskeletal reorganization; *J. Immunol.*; 162(3): 1367-1375; febrero, 1999.
- (24) Forgenser J.L. P.A.; Molecular components of T-cell recognition ; *Ann Rev Immunol*; 1992.
- (25) Feefjes J. J. And H.L. Ploegh; Intracellular transport of MHC , class II molecules; *Immun Today*; 1992.
- (26) Germain R.H.; The biochemistry and cell biology of antigen processing and presentation; *Ann Rev Immunol*; 1993.
- (27) Abbas Abul, Lichtman Andrew, Pober Jordan; *Inmunología Celular y Molecular*; 2ª. ed; Ed. Interamericana McGraw Hill; 1995