



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**DESARROLLO DE UN MODELO MURINO DE
INMUNOSUPRESIÓN CON RADIACIÓN
IONIZANTE**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

Enue Reynaldo Gómez Macías



DIRECTOR DE TESIS:

Dr. René Álvaro Segura Velázquez

Ciudad Universitaria

México D. F., 2015



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.

Hoja de datos del jurado

1. Datos de alumno

Enue Reynaldo
Gómez
Macías
4621081761
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
409069282

2. Datos del tutor

Dr.
René Álvaro
Segura
Velázquez

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Edda Lydia
Sciutto
Conde

4. Datos del sinodal 2

Dra.
Claudia Andrea
Segal
Kischnevzky

5. Datos del sinodal 3

Dra.
Gladis del Carmen
Fragoso
González

6. Datos sinodal 4

Dra.
María de los Angeles
Cancino
Rodezno

7. Datos del trabajo escrito

Desarrollo de un modelo murino de inmunosupresión con radiación ionizante
60pp
2015

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de la doctora Edda Sciutto Conde, del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM.

Agradecimientos

A la M. en C. Jacquelynnne Brenda Cervantes Torres y QFB Carlos Castellanos Barba por el apoyo técnico otorgado para la realización de la tesis.

Este trabajo se desarrolló con financiamiento recibido del Instituto de Ciencia y Tecnología del Distrito Federal (ICyTDF) proyecto PICSA11-19; del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) proyecto 126978, y la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) proyecto PAPIIT No. IG200414.

Índice

Resumen	3
1. Introducción	4
1.1 Respuesta inmune	4
1.2 Generalidades de vacunas	6
1.2.1 Tipos de vacunas	6
1.2.2 Vacunas contra la influenza	8
1.2.3 Desafíos en la generación de vacunas	9
1.3. Inmunopotenciadores	10
1.3.1 Tipos de inmunopotenciadores	11
1.3.2 Adyuvantes	12
1.3.3 Clasificación de adyuvantes	13
1.4 Modelos de inmunosupresión	15
1.4.1 Modelos químicos de inmunosupresión	16
1.4.2 Modelos físicos de inmunosupresión	17
1.5 Radiación ionizante	17
1.5.1 Efectos de la radiación ionizante en la salud	17
1.5.2 Efectos en el sistema inmune	17
2. Antecedentes	19
3. Hipótesis	20
4. Objetivos	20
4.1 General	20
4.1.2 Particulares	20
5. Metodología	21
5.1 Diagrama experimental	21
5.2 Modelo experimental	22
5.3 Ensayo de irradiación	22
5.3.1 Dosis de irradiación	23
5.3.2 Irradiación	24

5.4 Tratamiento profiláctico post-irradiación	24
5.5 Ensayo de proliferación de linfocitos	25
5.5.1 Obtención de células de bazo.....	25
5.5.2 Tinción con CFSE y ensayos de proliferación	25
5.6 Citometría de flujo.....	26
5.7 Estadística	27
6. Resultados	28
6.1 Estandarización de parámetros control.....	28
6.2 Dosis óptima de irradiación para inducir inmunosupresión.....	29
6.3 Ensayo de sobrevida a diferentes dosis de irradiación.....	30
6.4 Diferencias inmunológicas entre los ratones irradiados y los no-irradiados.	31
6.5 Funcionalidad de la población linfocitaria de ratones irradiados.....	33
6.6 Sobrevida de ratones hembras y machos.....	34
6.7 Diferencias inmunológicas entre machos y hembras irradiados.....	35
6.8 Funcionalidad de linfocitos de ratones irradiados de ambos sexos	37
6.9 Mejora en la supervivencia de los ratones irradiados	38
6.10 Recuperación del sistema inmune de ratones irradiados	39
7. Discusión.....	41
8. Conclusiones.....	48
9. Referencias	49
Anexo I	57
Anexo II	59
Anexo III	60

RESUMEN

La respuesta inmune innata y adaptativa, son estrategias con las que cuentan los organismos para contender con patologías infecciosas y no infecciosas, sin embargo la capacidad de responder adecuadamente a estos desafíos se ve disminuida en casos como el tratamiento de enfermedades neoplásicas o por la propia inmadurez o senescencia de la respuesta inmune de los individuos. En este sentido, los individuos con estas características presentan una pobre respuesta a antígenos vacunales, que los limita a desarrollar una respuesta inmune protectora a diversos agentes infecciosos. Este panorama justifica la búsqueda de estrategias que puedan mejorar la capacidad de respuesta inmune. La evaluación de la efectividad de moléculas inmunoestimulantes requiere la utilización de modelos animales experimentales. Para ello, tradicionalmente se han utilizado ratones senescentes; sin embargo, la disponibilidad y el alto costo de estos ratones limitan su uso. Entre los posibles modelos alternativos figuran los ratones inmunodeprimidos por medios químicos o físicos. Los métodos químicos (fármacos o medicamentos) resultan muy costosos y producen diversos efectos secundarios. En contraste, la inmunodepresión por métodos físicos basados en irradiaciones constituye una herramienta sencilla para estandarizar un modelo de inmunosupresión en el cual pueda evaluarse la eficiencia de diferentes inmunoestimulantes. En este trabajo se desarrolló un modelo de inmunosupresión basado en el uso de radiaciones ionizantes de Cs-137 en ratones BALB/c. Encontramos que la dosis de 5Gy permite inducir la mayor depleción en las células inmunes evaluadas, manteniendo las restantes funcionales. Con respecto a la supervivencia se obtuvo una tasa de supervivencia de 40% en las hembras y un 10% en los ratones machos. Encontramos que al facilitar el alimento a los ratones y realizando una sencilla terapia de estiramientos musculares en sus extremidades, se logra obtener una supervivencia de 100% a largo plazo en los ratones irradiados. Consideramos que este modelo puede contribuir al estudio y selección de sustancias con potencial papel inmunopotenciador y permita a su vez, evaluar vacunas y/o adyuvantes.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 RESPUESTA INMUNE

La respuesta inmune innata y adaptativa, son estrategias con las que cuentan los organismos para contender contra patologías infecciosas y no infecciosas (Parkin & Cohen, 2001).

La respuesta inmune innata es la primera barrera de defensiva del organismo y no requiere sensibilización previa (Medzhitov, 2007). Esta suele desencadenarse cuando los elementos invasivos son identificados por receptores específicos que reconocen componentes ajenos al cuerpo. Se presenta también cuando una célula es dañada (ya sea por una acción física o de algún agente infeccioso) o en condiciones de estrés (Medzhitov, 2007). Las defensas del sistema inmune innato no son específicas, por lo cual reconocen y responden a los patógenos en una forma genérica. Las células que generan esta respuesta son principalmente los neutrófilos, macrófagos y las natural killer (NK) (Beetz et al., 2008). Este conjunto de células se caracterizan por activarse de forma inmediata, siempre que cualquier sustancia extraña penetra en el organismo. Este sistema no confiere una inmunidad duradera contra el patógeno invasor, puesto que no genera memoria inmunológica (Hodges et al., 1988).

Por otra parte, todas las sustancias que se comportan como extrañas a un organismo, frente a las cuales éste desarrolla una respuesta inmune específica, se conocen como antígenos. La especificidad del antígeno permite la generación de respuestas que se adaptan a patógenos específicos o a las células infectadas por patógenos. La habilidad de montar estas respuestas específicas ante antígenos se mantiene en el organismo debido a que estas células especializadas cuentan con la capacidad de mantener su patrón de reconocimiento ante un antígeno presentado, lo que se conoce como memoria inmunológica (Hodges et al., 1988).

Por su parte la respuesta inmune adaptativa se desarrolla únicamente en respuesta a sustancias introducidas que generen su activación (Meraviglia et al.,2011). En ella participan principalmente células especializadas denominadas linfocitos. Según su linaje celular, los linfocitos se dividen en dos grupos: linfocitos B y linfocitos T. Los linfocitos T se subdividen de manera general en linfocitos T colaboradores (Th), linfocitos T citotóxicos (Tc) y linfocitos T supresores/reguladores (Ts) (Miller, 2002). Esta respuesta es mediada por anticuerpos y requiere el reconocimiento de antígenos que no son propios. Según el tipo de estímulo que se genere, la respuesta puede ser de tipo humoral o celular (Hodges et al., 1988). Aunque la separación de ambos tipos de respuesta es mas de tipo didáctico que real, en general se considera que cuando el elemento efector final son las inmunoglobulinas formadas por los linfocitos B se trata de una respuesta tipo humoral, mientras que cuando participan los linfocitos T tanto colaboradores como citotóxicos, se trata de una respuesta de tipo celular (Beetz et al., 2008).

Sin embargo la capacidad del sistema inmune para responder de manera adecuadamente ante los distintos agentes infecciosos se ve disminuida en casos en los cuales los individuos presentan un estado de inmadurez o senescencia de la respuesta inmune (Al-Alawi, Hassan, & Chotirmall, 2014). Esta condición denominada inmunodeficiencia ocurre cuando uno o más de los componentes del sistema inmunitario no son capaces de ser activados ante un estímulo o bien son activados de manera ineficiente (Aw et al., 2007). La capacidad del sistema inmunitario de responder a patógenos y enfermedades es reducida tanto en los niños (por inmadurez inmunológica) como en los ancianos, y la respuesta inmunitaria empieza a entrar en declive aproximadamente después de los cincuenta años de edad, debido al fenómeno de inmunosenescencia (Franceschi, Bonafè, & Valensin, 2000). Esta consiste en una disminución progresiva de la respuesta inmune que afecta a todos los componentes del sistema inmunológico (Al-Alawi et al., 2014).

Si bien el uso de vacunas ayuda a mantener un estado de protección ante una gran gama de antígenos infecciosos, los individuos inmunocomprometidos presentan

una pobre respuesta a los antígenos vacunales, lo que los limita para poder desarrollar una respuesta inmune protectora a diversos agentes infecciosos.

1.2 GENERALIDADES DE VACUNAS

1.2.1 TIPOS DE VACUNAS

Una vacuna es una preparación biológica que proporciona inmunidad activa adquirida a una enfermedad particular (Fiore et al., 2009). Una vacuna contiene típicamente un agente que se asemeja a un microorganismo causante de la enfermedad, y a menudo se elabora con formas atenuadas o muertas del organismo de interés, con toxinas o proteínas de su superficie. Las vacunas también pueden contener virus inactivos o productos virales purificados. El agente inoculado estimula al sistema inmunológico del cuerpo, que lo reconoce como una amenaza, lo destruye y mantiene un registro del mismo. De este modo, el sistema inmune podrá ser capaz de reconocer con mayor facilidad y destruir cualquiera de estos agentes que encuentre en infecciones posteriores (Fiore et al., 2009).

Existen varios tipos de vacunas en uso (National Institutes of Health, 2012). Estos representan diferentes estrategias utilizadas para tratar de reducir el riesgo de contraer la enfermedad, a la par que permiten conservar la capacidad de inducir una respuesta inmune beneficiosa.

Las vacunas inactivadas se generan a partir de organismos tratados con productos químicos o calor y han perdido su virulencia. Esta característica provoca que este tipo de vacunas active al sistema inmune pero el antígeno que las constituye sea incapaz de reproducirse en el hospedero (M. M. J. Cox & Hollister, 2009). La inmunidad generada por este tipo de vacunas generalmente es de menor intensidad y suele durar menos tiempo que las vacunas basadas en patógenos atenuados. Con el propósito de aumentar su capacidad protectora, las vacunas inactivadas se utilizan en más de una dosis. Por otra parte, las vacunas generadas a partir de organismos vivos atenuados se producen con microorganismos cultivados bajo condiciones en las cuales pierden o disminuyen sus propiedades patógenas y en consecuencia, estos son capaces de generar una respuesta inmunológica más

duradera (Chen et al., 2010). Esto se debe a que el microorganismo no se encuentra inactivado y por lo tanto conserva su estructura y simula una infección de baja intensidad pero capaz de generar una inmunidad más efectiva; esta característica provoca en muchas ocasiones patologías en personas inmunodeprimidas. Otro tipo de vacunas son las basadas en el uso de toxoides. Estas se componen de elementos tóxicos inactivados procedentes de microorganismos (Metz et al., 2003).

Por otra su parte, las vacunas acelulares consisten en una mezcla de componentes subcelulares purificados del patógeno contra el que se quiere inmunizar (Herzog, 2015). Éstos constan de proteínas antigénicas altamente inmunogénicas y pueden contener toxoides. Otro tipo de vacunas son conocidas como vacunas recombinantes, en las cuales se utiliza la tecnología del DNA recombinante para introducir en el genoma de un microorganismo un gen codificante para un antígeno, este antígeno es altamente inmunogénico. A partir de ello, es posible producir y purificar la proteína antigénica, que será la base de una vacuna a gran escala y a bajos costos (Cole et al., 2015). Las vacunas con base en vectores recombinantes fusionan componentes de un microorganismo con el DNA de otro distinto. Éstas se utilizan en enfermedades que presentan complicados procesos de infección y que en general se han resistido a las estrategias convencionales para generar inmunidad mediante la vacunación (Graham et al., 2006). Mientras la mayoría de las vacunas se generan usando componentes inactivados o atenuados de microorganismos, las vacunas sintéticas están compuestas en parte o completamente de péptidos, carbohidratos o antígenos. Las vacunas sintéticas suelen considerarse más seguras que las primeras (Wong & Webby, 2013).

En la actualidad se están desarrollando y evaluando nuevos tipos de vacunas, como es el caso de las vacunas con base en polisacáridos. Estos compuestos son mínimamente inmunogénicos. Al ponerlos en contacto con proteínas del hospedero, el sistema inmunitario puede ser capaz de reconocer al polisacárido como si fuera un antígeno. De esa manera se generan anticuerpos contra la bacteria y contra el polisacárido (Safari et al., 2011). Las vacunas de DNA, por su parte, se generan a partir del DNA de un agente infeccioso (Kaiser, 2006). Se fundamentan en la

inserción de un fragmento del DNA del patógeno que codifique para un antígeno protector ensartado en una construcción capaz de llevar el material genético hasta el núcleo del organismo a vacunar. Algunas células del sistema inmunitario reconocen la proteína generada a partir del DNA exógeno insertado y responden tanto a la propia proteína como a las células afectadas (Berdis, 2008). Dado que estas células viven largo tiempo, si el organismo encuentra al agente patógeno que normalmente produce esas proteínas tras un periodo largo, el sistema inmunitario lo atacará instantáneamente. Aun en 2015 este tipo de vacuna continúa en fase experimental, y pese a que presenta resultados esperanzadores, aún no se han aprobado para su uso en humanos (Cole et al., 2015).

1.2.2 VACUNAS CONTRA LA INFLUENZA

Las vacunas anti-influenza ofrecen la mejor protección disponible contra la infección del virus y sus complicaciones (R. B. Couch, 2008). La vacuna contra la influenza también ayuda a prevenir el contagio del virus de persona a persona. Existen vacunas y antivirales para la profilaxis y el tratamiento de las infecciones por este virus. Estas vacunas están diseñadas a partir de virus inactivados o viriones atenuados de las distintas variedades de virus H1N1 y H3N2, así como de virus de la influenza B. Debido a que la antigenicidad de los virus de tipo silvestres (WT) evolucionan, las vacunas se reformulan anualmente. Sin embargo, cuando la antigenicidad de las cepas que forman parte de las vacunas y la de los virus WT que circulan entre la población no coinciden, las vacunas dejan de ser efectivas. En otras ocasiones, incluso cuando ambas antigenicidades coinciden, puede darse el caso de que aparezcan virus mutantes resistentes a la vacuna. Los fármacos antivirales de uso más frecuente incluyen la amantadina, que inhibe la pérdida de la envoltura de los virus al interferir en la unión mediada por la proteína M2 entre la nucleocápside y las glicoproteínas de membrana de la célula infectada; y el oseltamivir, que inhibe el ensamblaje de las unidades de neuraminidasa (NA) de la cápside de los virus, evitando así, la liberación de nuevas unidades virales (Lambert & Fauci, 2010).

La vacunación anti-influenza está ampliamente recomendada para grupos de alto riesgo (Reber et al., 2012), en los cuales las complicaciones de la enfermedad pueden ser graves e inclusive mortales. Este grupo incluye a personas mayores de 60 años, menores de 5 años, inmunodeprimidos (diabetes, sida, trasplantados) y personas con alguna enfermedad grave previa a la infección, especialmente respiratorias (enfisema, bronquitis) o cardíaca (infarto de miocardio, valvulopatías, insuficiencia) (Reber et al., 2012).

Las vacunas anti-influenza pueden fabricarse siguiendo diferentes procesos: el más habitual es el cultivo de virus en embriones de gallina. Tras su purificación, el virus es inactivado mediante el uso de agentes químicos o físicos (Chen et al., 2010). Luego de ello puede producirse una vacuna a partir de virus íntegros o fraccionados; estas últimas son de elección para la aplicación en niños, dado que provocan con menor frecuencia reacciones febriles. También pueden realizarse cultivos de virus en proteínas de huevo hasta que pierden su virulencia (Wong & Webby, 2013).

1.2.3 DESAFÍOS EN LA GENERACIÓN DE VACUNAS

La protección que confieren las vacunas generadas para prevenir el control de enfermedades provocadas por distintos virus de la influenza es muy variable (Nichol & Treanor, 2006). Existen poblaciones en riesgo, en las cuales la utilización de vacunas no resulta satisfactoria para la prevención de la enfermedad. Se ha descrito que 90% de las muertes provocadas por influenza ocurren en personas inmunocomprometidas (Thompson, Shay, & Zhou, 2010). Por ello es necesario contar con opciones de vacunación más eficaces, enfocadas especialmente en individuos de edad avanzada y personas con problemas de salud crónicos subyacentes. (R. Couch, Winokur, Brady, & Belshe, 2007).

Las limitaciones en la producción de las vacunas, la complejidad del proceso de fabricación y los tiempos de producción, señalan la necesidad de generar tecnologías de producción de vacunas más eficientes, que permitan obtener vacunas de una manera más rápida, económica y confiable, así como mejorar la capacidad de reacción en caso de una pandemia (Wong & Webby, 2013).

Una de estas alternativas es adicionar sustancias que en combinación con los antígenos específicos vacunales produzcan una respuesta inmune más efectiva que el antígeno solo. Estas sustancias con capacidad inmunopotenciadora se denominan adyuvantes (Safari et al., 2011).

1.3. INMUNOPOTENCIADORES

Las sustancias inmunomoduladoras constituyen un grupo de sustancias muy heterogénea si considera su origen, naturaleza química y actividad biológica específica (Takx-Kohlen et al., 1992). Dentro de este grupo destacan los agentes inmunopotenciadores, a los cuales se les atribuyen dos funciones fundamentales: la estimulación de la resistencia no específica del hospedero contra las enfermedades infecciosas y el cáncer; y la potenciación de la inmunogenicidad de las vacunas comerciales (Azuma, 1992). Estos son utilizados en tratamientos para ayudar a estimular el sistema inmune de pacientes con inmunodeficiencias relacionadas con algunos tipos de infecciones virales, bacterianas y especialmente en el tratamiento del cáncer (Kohlen, 1992). También suelen combinarse con quimioterapia y radioterapia o utilizarse después de la primera, de forma que el tratamiento recibe el nombre de inmunoquimioterapia (Abdala DO, 1999).

En el caso de las vacunas, es posible potenciar su inmunogenicidad a partir de la adición de antígenos sintéticos, incluidos los de nueva generación, así como la inmunización experimental para obtener antisueros policlonales y anticuerpos monoclonales; en este último caso, a los inmunopotenciadores se les denomina adyuvantes inmunológicos (Azuma, 1992). Por ello, la inmunología experimental contempla investigaciones dirigidas a obtener y evaluar nuevas sustancias con actividad inmunomoduladora y mayor capacidad para estimular la respuesta inmune (Lee & Nguyen, 2015).

1.3.1 TIPOS DE INMUNOPOTENCIADORES

Los inmunopotenciadores se clasifican según su mecanismo de acción en específicos e inespecíficos (Edelman, 1992). Los de acción específica actúan sobre células del sistema inmune, por lo que hay especificidad selectiva en la acción de estas células para producir una respuesta inmune. Esto da como resultado una inmunomodulación selectiva y una inmunorreacción hacia un antígeno o varios, como es el caso de los adyuvantes inmunológicos o las vacunas terapéuticas (Gupta et al., 1996). Por su parte, los de acción inespecífica logran estimular o suprimir la respuesta inmune, sin que la actividad de las células estimuladas vaya dirigida hacia un antígeno determinado. Se clasifican en tres tipos según su acción: los que actúan sobre el sistema inmune sano (tipo I), los que lo hacen sobre el sistema inmune inmunodeprimido (tipo II) y los que actúan sobre ambos (tipo III) (Stites, Stogo, Fuderberg, & Wule, 1985).

El efecto inmunopotenciador de la mayoría de los adyuvantes está relacionado directamente con su toxicidad (Edelman & Tacket, 1990). La introducción de adyuvantes potentes en ensayos clínicos comenzó en relación con las vacunas preventivas y terapéuticas (Edelman, 1992). Uno de los objetivos del desarrollo actual en materia de adyuvantes consiste en disminuir al máximo su toxicidad sin afectar el efecto inmunopotenciador (Petrovsky & Aguilar, 2004).

1.3.2 ADYUVANTES

Los adyuvantes amplifican la respuesta inmune a un antígeno mediante la mejora de su entrega y presentación, mejora del reclutamiento de células inflamatorias e inmunocompetentes a la zona de deposición de antígeno, o por la activación directa de una respuesta inmune innata (Leroux-Roels, 2010).

Diversos ensayos clínicos han demostrado que los adyuvantes ayudan a generar altos niveles de anticuerpos contra virus emergentes de influenza (Nicholson et al., 2001). En 2009, las vacunas contra la influenza H1N1 que se distribuyeron en Europa y varios países asiáticos, contenían adyuvantes de aceite en agua, lo que aumentó la eficiencia de las vacunas aplicadas y permitió contener la epidemia de manera más eficaz. (Wichmann et al., 2010). Por ello, el desarrollo y la aplicación de adyuvantes se ha considerado de alta importancia para el mejoramiento de futuros programas de vacunación (Wichmann et al., 2010).

Existe actualmente una amplia gama de adyuvantes en evaluación que pretenden mejorar la efectividad de las vacunas, como en el caso de las vacunas de influenza (Pasquale et al., 2015). Como ejemplo de adyuvantes novedosos se encuentran los receptores tipo Toll (TLR) y una variedad de receptores agonistas como carbohidratos bacterianos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Algunos de éstos han sido empleados en primeras etapas de fase clínica durante varios años (Wack et al., 2008). Sin embargo, algunos de éstos generan reacciones no deseadas (Lee & Nguyen, 2015). Otro enfoque se ha dirigido a utilizar adyuvantes de origen peptídico, tal es el caso del péptido GK-1, cuya capacidad estimuladora de la respuesta inmune se ha comprobado experimentalmente y hoy se plantea su uso como inmunopotenciador (Segura-Velázquez et al., 2006, 2009, 2013).

1.3.3 CLASIFICACIÓN DE ADYUVANTES

Existen diversas clasificaciones de los adyuvantes según la característica que se desee resaltar (J. C. Cox & Coulter, 1997). Según su origen (Mohan, Verma, & Rao, 2013), se clasifican en:

- Sustancias biológicas: Microorganismos y sus productos, como las mycobacterias de la tuberculosis incorporados al adyuvante completo de Freund (AFC) o la mezcla de toxinas bacterianas, usualmente derivadas de estreptococos y serratias, además de virus, saponinas, vitaminas A y E y lanolina.
- Productos químicamente definidos provenientes de hongos, bacterias y algas: Dipéptido murámico (MDP), trehalosa dimicolato (TDM), proteína P40 asociada al peptidoglicano de la pared bacteriana, lípido A, lipopolisacárido (LPS) proveniente de bacterias Gram negativas, glucanos de hongos y polisacáridos de algas.
- Productos biológicos del sistema inmune: Citoquinas (IL-2, INF γ).
- Productos sintéticos análogos a los biológicos: Componentes de paredes bacterianas.
- Preparaciones químicas: Compuestos del aluminio: Al(OH) $_3$, Al $_2$ (SO $_4$) $_3$, Ca $_3$ (PO $_4$) $_2$, K $_2$ PO $_4$, sulfato de dextrano y liposomas, así como solución de NaCl tratada magnéticamente (CM-95).

- Por su parte, Leroux clasifica a los adyuvantes según su mecanismo de acción (cuadro 1).

Adyuvante	Modo de acción	Aplicación
Sales de aluminio	Actúan a través de la activación de la respuesta inmune innata, mediante la interacción directa con células dendríticas y mediante la inducción in vivo de la liberación de constituyentes celulares capaces de activar células dendríticas.	Hepatitis A, hepatitis B, difteria, tétanos y <i>S. pertussis</i>
Emulsiones aceite-agua	Respuestas inflamatorias innatas, reclutamiento y activación de CPA. Mejora de la persistencia del antígeno en el sitio de la inyección y mejora la presentación a células inmunocompetentes.	Influenza estacional
Emulsiones agua-aceite	Se cree que actúan a través de la inducción de la inflamación local, mediante el aumento, reclutamiento y activación de las CPA.	Tratamiento de VIH, malaria y cáncer de seno
Virosomas	Actúan principalmente como vehículo de suministro para el antígeno. Su función depende de las características estructurales del lisosoma, el cual determina el modo de interacción del antígeno con las CPA.	Influenza y hepatitis A
Complejos de estimulación inmune ISCOM, ISCOMATRIX, MPL	Aumentar expresión de MHC II en CPA, probablemente como resultado del aumento en la presentación de los antígenos.	Tratamiento de VEC, influenza, cáncer
MPL	Se une a TLR4 e induce una mayor respuesta celular y humoral (predominantemente basada en Th1).	Hepatitis B
Saponinas QS21	Mejora la presentación de antígenos a las células CPA. Predominantemente induce la producción de CTL a través de Th1 y la secreción de citocinas Th2.	Tratamiento de alzheimer y chlamydias
ISS CPG	Son agonistas de TLR e inductores de citocinas proinflamatorias, que conducen la amplificación de la respuesta inmune adaptativa.	Tratamiento de hepatitis B, malaria, VIH, cáncer y alergias
Imidazoquinolinas	Mimetizadores naturales del ligando del receptor TLR.	Tratamiento de VIH, VHS y terapias contra el cáncer

Cuadro 1. Clasificación de adyuvantes por su modo de acción y aplicación. Modificado de (Leroux-Roels, 2010).

Riese y colaboradores dividen los adyuvantes inmunológicos en: oleosos, sales minerales, polímeros sintéticos, liposomas y sustancias naturales (Riese, Schulze, Ebensen, Prochnow, & Guzmán, 2013).

Actualmente, los estudios en el área de la inmunología para el uso de cada tipo de adyuvante en vacunas humanas y veterinarias utilizan comúnmente la clasificación propuesta por Leroux-Roels (Leroux-Roels, 2010). Por otro lado, existen una serie de nuevos adyuvantes que se encuentran en diferentes fases de prueba con resultados potencialmente benéficos (cuadro 2) (Lee & Nguyen, 2015).

Nombre	Clase	Composición	Efecto	Fase preclínica
CpG	Agonista TLR-9	Oligonucleótidos CpG	Mejoran el título de anticuerpos, actúan en la inmunidad mediada por Th1 y en la mediada por linfocitos CD8+	3
Flagelina	Agonista TLR-5	Flagelina ligada a antígenos	Mejoran el título de anticuerpos, participa en la inmunidad Th1 y Th2	1
PolyI:C	Agonista TLR-3	Análogos de doble cadena de RNA	Mejoran el título de anticuerpos, actúan en la inmunidad mediada por Th1 y en la mediada por linfocitos CD8+	1
AS01	Combinaciones	Combinación de MPL, QS21 y liposomas	Mejoran el título de anticuerpos, actúan en la inmunidad mediada por Th1 y en la mediada por linfocitos CD8+	3
AS02	Combinaciones	Combinación de MPL, QS21 y emulsión	Mejoran el título de anticuerpos, participa en la inmunidad Th1	3
ISCOMs e ISCOMMATRIX	Combinaciones	Combinación de saponinas y fosfolípidos	Mejoran el título de anticuerpos, actúan en la inmunidad mediada por Th1 y en la mediada por linfocitos CD8+	2

Cuadro 2. Clases de adyuvantes para vacunas probados actualmente para la clínica. Modificado de Lee & Nguyen, 2015.

1.4 MODELOS DE INMUNOSUPRESIÓN

La inmunosupresión en un organismo vivo consiste en la inhibición de los componentes de su sistema inmune innato o adaptativo (Merck, 2011). Ésta puede producirse de dos maneras: natural o artificialmente. En el primer caso, la inmunosupresión se debe a la alteración del sistema inmune de un organismo en respuesta a la modificación de alguno de los mecanismos de su respuesta inmune innata (Janeway & Medzhitov, 2002). Como resultado, se genera una enfermedad que producirá cambios en el estado inmunológico del modelo a evaluar. Por su parte, la inmunosupresión artificial se subdivide en dos grandes grupos según la

naturaleza del método que se utilice. La primera es la inmunosupresión por medios químicos (Díaz, 2003) y la segunda es de origen físico (Rosenberg, 2008).

1.4.1 MODELOS QUÍMICOS DE INMUNOSUPRESIÓN

La inmunosupresión química de animales, en general ratones, se lleva a cabo mediante la exposición a sustancias que provocan una alteración de su sistema inmune (Duran-Struuck & Dysko, 2009). Para este tipo de inmunosupresión suelen utilizarse principalmente compuestos inhibidores de la síntesis de linfocinas, como es el caso de los corticosteroides o las ciclosporinas (Díaz, 2003).

Los corticosteroides se emplean como parte de terapias estándar de inmunosupresión, dada su capacidad para contrarrestar el rechazo de injertos (Goodwin, Mims, & Kaufman, 1962). Éstos se administran, en general, a dosis elevadas durante una intervención quirúrgica seguidos de una pauta descendente durante los primeros días del postoperatorio, para continuar con una dosis moderada. (Halloran, 2004). Por su parte, las ciclosporinas actúan inhibiendo la síntesis de diversas citoquinas, especialmente la interleucina-2, bloqueando así la proliferación de células T (Díaz, 2003).

No obstante, la inmunosupresión química no ha sido una alternativa útil para la evaluación de posibles adyuvantes, dada la gran cantidad de efectos secundarios que intervienen en la evaluación de las sustancias. Tanto los corticosteroides como las ciclosporinas actúan de manera inespecífica en el cuerpo y provocan gran cantidad de efectos adversos, como nefrotoxicidad, neurotoxicidad, hiperplasia gingival, toxicidad hepática y acidosis metabólica (Vallejo, de Leon-Casasola, & Benyamin, 2004).

Si bien la mayoría de esos efectos son reversibles si la dosis de los fármacos disminuye o su administración se suspende, las complicaciones secundarias interfieren en la evaluación de la efectividad de las sustancias inmunopotenciadoras (Díaz, 2003). Otra desventaja de los inmunosupresores químicos al evaluar potenciales adyuvantes son las estrictas condiciones experimentales y los altos

costos (purificación, manipulación y desecho del compuesto) que se requieren para manipular estas sustancias (Lucas & Bald, 1990).

1.4.2 MODELOS FÍSICOS DE INMUNOSUPRESIÓN

Por su parte, la inmunosupresión física por medio de radiaciones ionizantes es una técnica que se ha utilizado satisfactoriamente para la evaluación de inmunopotenciadores (Rosenberg, 2008). Existen tres principales fuentes de inmunosupresión física: Ce-137, K-40 y Sr-90, siendo la primera la más efectiva para deprimir de manera crónica a las células del sistema inmune (Merck, 2011).

1.5 RADIACIÓN IONIZANTE

Los posibles efectos de la radiación sobre el ser humano se han estudiado ampliamente en modelos animales, principalmente en moscas del género *Drosophila* y en ratones de distintas cepas, principalmente C57BL/6 y BALB/c (Duran-Struuck & Dysko, 2009).

1.5.1 EFECTOS DE LA RADIACIÓN IONIZANTE EN LA SALUD

La radiosensibilidad de un tejido es directamente proporcional a su capacidad de reparación e inversamente proporcional al grado de especialización de la célula. El daño producido por la radiación varía en forma inversa a la sensibilidad del tejido expuesto (Haimovitz-Friedman & Kan, 1994). Existe un cierto umbral de radiación después del cual el sistema de los organismos irradiados no es capaz de contrarrestar los efectos producidos por una irradiación crónica. Las dosis a las cuales se ha descrito que los individuos son capaces de sobrevivir oscilan entre 3 y 9 Sv de exposición (Merck, 2011).

1.5.2 EFECTOS EN EL SISTEMA INMUNE

La radiación ionizante produce muerte celular en forma de apoptosis, desencadenada por la activación de las caspasas (Waterhouse et al., 1998). Aunque el mecanismo preciso de cómo se activan las caspasas después de la radiación ionizante aún está en estudio, se han propuesto dos rutas de apoptosis radioinducidas (Hanoux, Pairault, Bakalska, Habert, & Livera, 2007).

En el primer modelo se propone que el daño radio-inducido al DNA puede dar inicio a la apoptosis por la vía de p53, produciendo así una sobreexpresión de la expresión de BAX (*Bcl-2-associated X protein*), la cual regula la apoptosis dependiente de la mitocondria, induciendo la formación del apoptosoma. A su vez, p53 aumenta la expresión del ligando Fas (FasL o Apo-1) y promueve su unión con el receptor de muerte celular CD95, activando así la cascada de caspasas, tanto a través de mecanismos dependientes como independientes de la mitocondria (Tsujiimoto, 2001). En el segundo modelo, cambios bioquímicos tales como el incremento en la generación de especies reactivas del oxígeno y la disminución de glutatión en las células irradiadas se ha relacionado con la pérdida de la integridad de la membrana (Sheng-Tanner, Bump, & Hedley, 1998). De este modo, el estrés oxidante puede tener un rol directo en la apoptosis radio-inducida. De forma parecida, la interacción de la radiación ionizante con la membrana celular induce la hidrólisis rápida de esfingomielina a ceramida (Haimovitz-Friedman & Kan, 1994) y la activación de la ruta SAPK/JNK (proteín kinasa activada por estrés) proapoptótica, que puede ocurrir a partir de las señales de ceramida derivadas de la membrana (Verheij & Bartelink, 2000). Así, la fosforilación de c-Jun aumenta la transcripción de los genes reguladores de apoptosis. Dado que un ambiente sometido a estrés también estimula la SAPK/JNK, la esfingomielina y los sistemas de señalización de SAPK/JNK, pueden estar coordinados en la inducción de apoptosis. Además, la formación de ceramida y la posterior activación de caspasas también puede tomar parte en la apoptosis inducida por daño al DNA (Tepper, 1999).

Las células que mueren por apoptosis radioinducida sufren una serie de cambios morfológicos y bioquímicos característicos, como la fragmentación del DNA, cambios en la simetría de la membrana, activación de caspasas y alteración en los niveles de proteínas relacionadas con la muerte celular (Chang & Yang, 2000).

La rotura del DNA genómico entre unidades nucleosomales es un evento irreversible que lleva a la muerte celular. Sin embargo, los cambios en la morfología celular, incluyendo la pérdida de volumen celular, la condensación cromatínica y citoplasmática, así como la fragmentación en cuerpos apoptóticos, pueden

revertirse cuando la maquinaria de reparación del DNA actúa sobre los sitios dañados por la exposición a la radiación (Elmore, 2007).

2. ANTECEDENTES

En contraste con otros métodos de inmunosupresión (de origen químico o biológico), la terapia de irradiación ofrece una menor cantidad de efectos colaterales, lo que facilita la evaluación de la respuesta inmune que se produzca en los ratones tratados (Liu et al., 2010).

La elección de Ce-137 como fuente de radiación inmunosupresiva radica en la naturaleza metaestable de sus partículas de decaimiento (Unterweger, Hoppes, Schima, & Coursey, 2011). El cesio-137 (^{137}Cs) es un isótopo radiactivo de cesio que se produce principalmente por fisión nuclear (Kirchhoff & Bunsen, 1861). Las explosiones nucleares o la degradación del uranio en barras de combustible pueden producir dos formas radiactivas de cesio: el ^{134}Cs y el ^{137}Cs . Ambos isótopos decaen a elementos no-radiactivos. El ^{134}Cs y el ^{137}Cs generan partículas beta a medida que decaen (Setterberg, 1882). Como isótopo libre, tiene una vida de 30.23 años, y decae emitiendo partículas beta a un isómero nuclear metaestable de bario-137 (Ba-137m) (ATSDR, 2004), el cual tiene una vida media de 2.55 minutos y es el responsable de todas las emisiones de rayos gamma. Estas partículas gama son las responsables de producir el fenómeno de inmunosupresión en los ratones de manera inocua y sin riesgo de contaminación radioactiva (anexo III). Por ello, la irradiación con Cs-137 resulta un método de inmunosupresión ideal, el cual no sólo permitirá la evaluación de la respuesta inmune producida por un inmunógeno de interés, sino que genera la mínima cantidad de efectos secundarios que pudieran producir incertidumbre al evaluar un posible inmunopotenciador.

3. HIPÓTESIS

Mediante el uso de radiación ionizante será posible generar un modelo de depleción celular reversible en el sistema inmune de ratones, que permita evaluar vacunas y/o adyuvantes.

4. OBJETIVOS

4.1 GENERAL

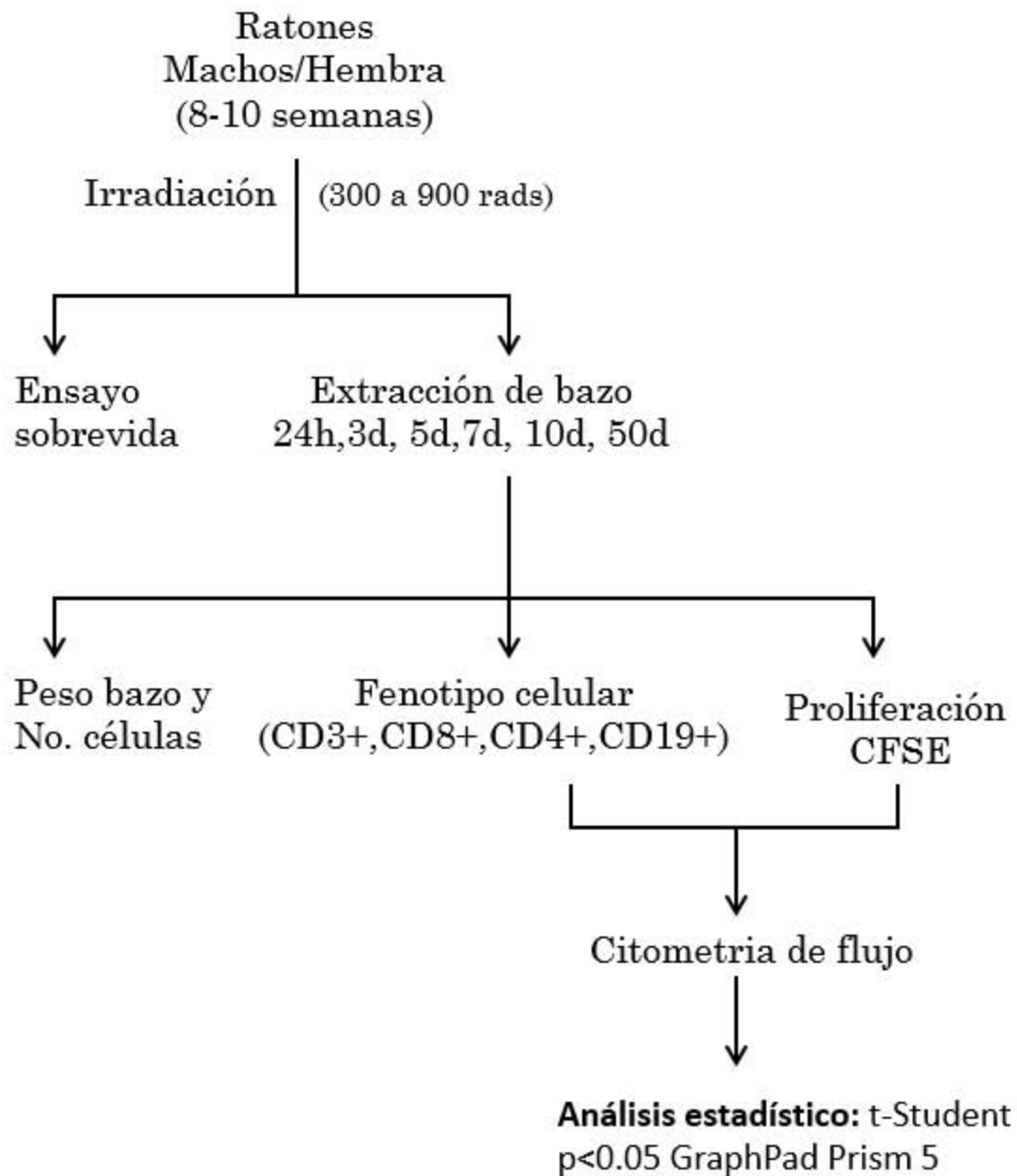
Desarrollar un modelo de inmunosupresión basado en el uso de radiaciones ionizantes de Cs-137 en ratones BALB/c.

4.1.2 PARTICULARES

- Determinar la dosis óptima de irradiación para inducir inmunosupresión en el modelo murino.
- Analizar si existe susceptibilidad asociada al sexo inducida por la irradiación.
- Evaluar la sobrevivencia, la funcionalidad las poblaciones de linfocitos totales.
- Evaluar el grado de depleción celular en las poblaciones de linfocitos T y B de los ratones irradiados.

5. METODOLOGÍA

5.1 DIAGRAMA EXPERIMENTAL



5.2 MODELO EXPERIMENTAL

Se emplearon ratones BALB/c hembras y machos de 7-12 semanas de edad, que fueron manipulados según las especificaciones bioéticas del NIH (EE.UU.) para el uso y la atención de animales de laboratorio.

Los ratones fueron producidos en el Bioterio libre de patógenos específicos del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM. Previo al ensayo de irradiación fueron colocados dentro de cilindros de acrílico con cuatro divisiones (un ratón por división) para facilitar su exposición dentro del irradiador. Una vez terminada la irradiación, se colocaron los ratones dentro de nuevas cajas de mantenimiento, las cuales se limpiaron con benzal al 70% antes de su reingreso a la sala de experimentación.

Después de la irradiación, los ratones se mantuvieron en un anaquel con ventilación, el cual les proporciona aislamiento total, con flujo con filtros de 0.3 micras y ventilación constante de aire de 15 a 18 cambios de aire total/hora; el alimento esterilizado y el suministro de agua Milli-Q. Los ratones fueron tratados con antibióticos para prevenir infecciones bacterianas oportunistas.

Fue necesario revisar cada 24 horas durante los primeros tres días el estado de los ratones irradiados. Después del día 3, se realizó el cambio de agua con antibiótico con el objeto de mantener un suministro constante del mismo.

Para evaluar los parámetros celulares, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical.

5.3 ENSAYO DE IRRADIACIÓN

Para el ensayo de irradiación se utilizó un irradiador Gammacell 1000 elite Irradiator, Nordion International Inc., el cual consiste en un núcleo excitable de Cesio-137 que mediante la liberación de rayos γ produce la inmunosupresión de cuerpo entero (TBI por sus siglas inglés) de los ratones (Duran-Struuck R. and Dysko R. 2009). Este irradiador se encuentra ubicado en el Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas, fuera de la barrera.

5.3.1 DOSIS DE IRRADIACIÓN

La dosis de irradiación está determinada por el tiempo de exposición de los ratones a la fuente radiactiva. Para el cálculo del tiempo de exposición se utiliza la unidad Gy (Gray), y al momento de reportar los resultados se emplea la unidad rad, considerando que $1 \text{ Gy} = 100 \text{ rads}$. Para determinar el tiempo de la dosis de irradiación ideal se empleó la siguiente ecuación:

$$Tiempo = \frac{Dosis \text{ de irradiación (Gy)}}{4.05 \frac{Gy}{min} \times factor \text{ de decaimiento}}$$

El tiempo de exposición es igual a la dosis de irradiación en Gy requerida, dividida entre la velocidad de dosis central (4.05 Gy/min) multiplicado por el factor de decaimiento del mes en que se realiza el experimento (ver anexo II). La velocidad de dosis central fue determinada por la compañía Nordion Inc. y avalada por la forma QC1-16-3516; la velocidad de dosis central de la fuente de Cs-137 se midió el 16 de agosto de 1994 y resultó de 618 Gy ; se hizo una segunda medición el 7 de septiembre de 1994, en la cual la velocidad de dosis central fue $243 \pm 0.53\% \text{ Gy/hora}$, y con base en ella se calculó que el irradiador posee una velocidad de dosis central de 4.05 Gy/min .

Para obtener el factor de decaimiento se consideró la tasa a la cual decae la dosis de irradiación por la degradación de la vida media del material radiactivo del irradiador. Éste emplea una fuente radiactiva Cs-137, el cual tiene una vida media de 30.23 años; se calculó el decaimiento con base en la ecuación $a(1 - T)^n = b$, en donde a es la cantidad inicial de Cs-137 en el momento de activación del irradiador; T es la fracción de decaimiento, y para elementos radioactivos se considera igual a 0.5, dado que al transcurrir una vida media la mitad de los núcleos que componen el elemento se ha degradado; n es el tiempo que ha pasado desde la activación del irradiador a la fecha cuando se realiza el experimento; b es la cantidad de Cs-137 ionizable, cuyo valor se considerará la dosis real de irradiación. El factor de decaimiento se obtuvo multiplicando la cantidad actual de material ionizable por la

capacidad de irradiación inicial del irradiador de 4.05 Gy/minuto, la cual se dividió por la cantidad de material ionizable original.

Para facilitar el cálculo del factor de decaimiento se sugiere utilizar la constante de decaimiento lineal, igual a 0.0013. Esta constante debe ser restada al factor de decaimiento del mes anterior para conseguir el factor de decaimiento del mes en curso. Se recomienda realizar el cálculo del factor de decaimiento cada mes, para garantizar una dosis de radiación constante e independiente de la fecha en que se realice la irradiación.

5.3.2 IRRADIACIÓN

La irradiación se llevó a cabo bajo la supervisión del QFB Carlos Castellanos, única persona certificada en el Instituto de Investigaciones Biomédicas para manipular el irradiador de Cs-137. Por motivos de bioseguridad, se realizó el registro de la fecha de irradiación junto con el nombre de la persona encargada del experimento. Una vez encendido el irradiador, se programó el equipo con el tiempo de irradiación previamente calculado. El equipo cuenta con una pantalla electrónica en donde puede establecerse la duración de varios ciclos y dosis de irradiación consecutivas.

Posteriormente se colocaron cilindros de acrílico conteniendo a los ratones (4 a la vez) a irradiar y se procedió a iniciar la irradiación.

5.4 TRATAMIENTO PROFILÁCTICO POST-IRRADIACIÓN

Este tratamiento tuvo el objetivo de proteger al sistema inmunocomprometido de los ratones irradiados y disminuir al mínimo riesgos de infección por exposición a bacterias y hongos oportunistas. Los antibióticos de selección fueron sulfametoxazol (0.5 mg/mL) y trimetoprima (0.01 mg/mL). El medicamento se disolvió en agua previamente esterilizada.

5.5 ENSAYO DE PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS

5.5.1 OBTENCIÓN DE CÉLULAS DE BAZO

Posterior a la dislocación cervical, se procedió a obtener el bazo de los ratones mediante una incisión en el costado izquierdo del animal. Los bazos se pesaron en una balanza analítica y enseguida se colocaron en 3mL de medio RPMI 1640 (Gibco, Invitrogen) y perfundieron a través de una malla de nylon de 5 micras para obtener las células. La suspensión se centrifugó a 1500 rpm durante 7 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 2mL de solución de lisis de eritrocitos (NH₄Cl / EDTA) durante 5 minutos. Se lavaron y se colocaron en 1-2mL de medio RPMI (2 mL para la muestra control; 1 mL para la muestra irradiada). Se realizó el conteo del número de células en una cámara de Neubauer, haciendo una dilución 1:3: 10 µL muestra + 20 µL azul tripano.

5.5.2 TINCIÓN CON CFSE Y ENSAYOS DE PROLIFERACIÓN

Para realizar el marcaje de las células de bazo se preparó una dilución 1:100 de CFSE, para lo cual se tomó una alícuota de 10 µL de CFSE 5 mM y se llevó a un volumen final de 1000 µL con PBS 1X estéril. A partir del conteo en la cámara de Neubauer, se adicionaron 10 µL de CFSE 1:100 a 10X10⁶ células. El volumen final fue aproximadamente igual a 100 µL, con una concentración final ~5 µM. (NOTA: Es imprescindible que las células estén bien re-suspendidas antes de adicionar el CFSE). Después de agregar el CFSE, las células marcadas se incubaron a 37 °C durante 10 min con agitación constante para asegurar la incorporación del marcador de manera homogénea. Posteriormente, se adicionaron 20 volúmenes (2 mL) de RPMI suplementado frío (ver anexo I) dos veces. Se ajustó a un volumen de 2 × 10⁶ células/mL agregando 5 mL de RPMI suplementado. Se adicionaron 100 µL de la suspensión celular por pozo (0.2 × 10⁶ células/pozo) para placas de 96 pozos y 1 mL de la suspensión (2 × 10⁶ células/pozo) cuando se utilizaron placas de 24 pozos. Se agregó medio del cultivo suplementado con L-glutamina (0.2mM), β-mercaptoetanol (0.05mM), penicilina (100U/mL), estreptomina (100µg/mL) y 10% de suero fetal bovino (FBS). Se utilizó concavalina A (ConA; cat. C2272 SIGMA) a una concentración final de 1.25 µg/mL como control positivo. La ConA se preparó

en medio RPMI suplementado, con una concentración al doble de la deseada, ya que se diluye a la mitad con la suspensión celular (100 μ L suspensión celular + 100 μ L de tratamiento/pozo). Las células marcadas se incubaron a 37 °C durante 5 días. Para cosechar las células, se centrifugó la placa a 1500 rpm por 5 minutos. Las células se resuspendieron en 50 μ L de PBS* (ver anexo I) y se colocaron en tubos para citometría de flujo junto con 250 μ L de PBS*. Posteriormente, se realizó el análisis por citometría de flujo mediante la evaluación de 10,000 eventos celulares.

5.6 CITOMETRÍA DE FLUJO

Para realizar la caracterización de las poblaciones linfocitarias, se utilizaron 500 000 células/pozo por cada reacción. Dicho volumen celular se centrifugó durante 1 minuto a 1500 rpm. Las células se lavaron con 20 μ L de PBS* y se volvieron a centrifugar durante 5 min a 1200 rpm. Se desechó el sobrenadante y se procedió al bloqueo de los receptores Fc mediante la adición de 20 μ L de α -CD16/32 (Cat. 553142 BD). Se incubó por 30 minutos a 4 °C. Las células se lavaron dos veces con 200 μ L de PBS* y se centrifugaron por dos minutos a 1200 rpm. Para las poblaciones de linfocitos T se emplearon anticuerpos anti CD3+, CD8+, CD4+, y para linfocitos B anti-CD19+, se agregó el volumen sugerido en la hoja técnica para cada anticuerpo. Se procedió a la incubación a 4 °C durante 20 minutos (es importante proteger la placa de la luz). Se lavó dos veces con 200 μ L PBS*, se decantó la placa y se adicionaron 150 μ L de PBS*. Cada reacción se pasó a un tubo para citometría de flujo previamente preparado con 250 μ L de PBS* (volumen total del tubo: 400 mL). Se capturaron 10 000 eventos en el citómetro de flujo. Cuando no fue posible realizar el análisis de las muestras el día de su preparación, las células fueron fijadas con PBS-formaldehído al 1%.

La captura y evaluación de los marcadores de interés (CD3+, CD8+, CD4+, CD19+) se llevó a cabo en los citómetros de flujo FACScalibur (BD Biosciences) y FACScan (BD Biosciences).

5.7 ESTADÍSTICA

Las medias entre grupos que recibieron los distintos tratamientos se compararon mediante la prueba paramétrica *t* de Student con el software GraphPad Prism 5 2007® y el programa Microsoft Excel 2007®. Se consideró que había diferencia significativa en los resultados cuando el valor de $P < 0.05$.

6. RESULTADOS

6.1 ESTANDARIZACIÓN DE PARÁMETROS CONTROL

Se utilizó un grupo de 5 ratones BALB/c sin irradiar para realizar la estandarización de las técnicas a utilizar. Se extrajo el bazo, se realizó la obtención y cuantificación de células y se evaluaron las poblaciones de linfocitos B CD19+ y T CD3+ mediante marcaje y análisis por citometría de flujo (figura 1).

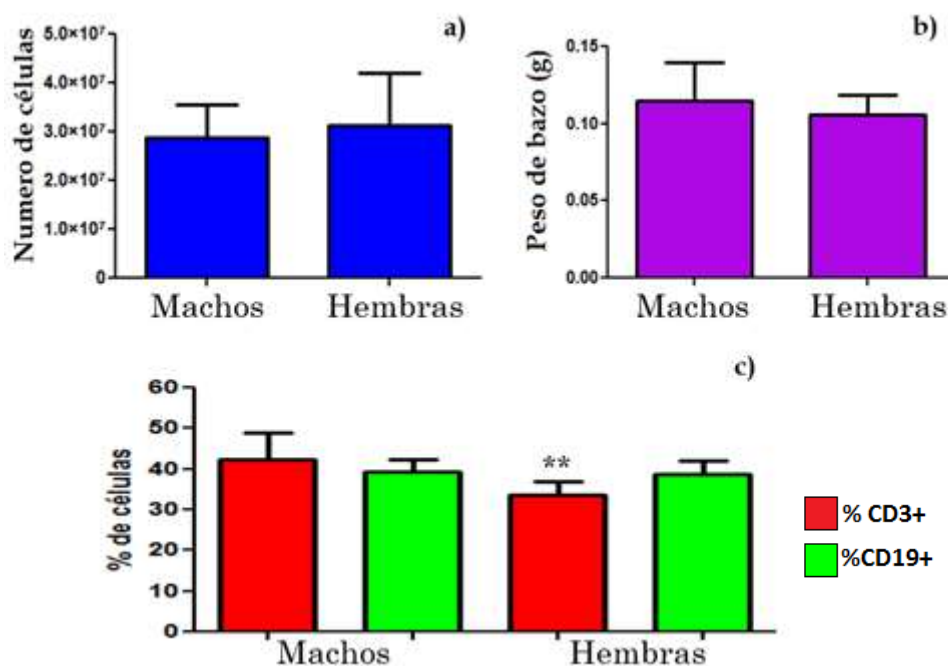


Figura 1. Estandarización de parámetros control. H = hembras; M = machos. a) Número de células recuperadas por lisis del bazo. B) Peso del bazo recuperado. C) Porcentaje de linfocitos CD3 y CD19. ** $p=0.0012$ (t de Student).

El número promedio de células de bazo entre machos y hembras no mostró diferencia significativa. Se obtuvo un promedio de 3.5 millones de células. El peso de los bazos tampoco presentó diferencia significativa entre ambos sexos, con un peso promedio de 0.10 g. Con respecto al porcentaje de células positivas, se observó una diferencia significativa entre el número basal de linfocitos CD3+ entre hembras y machos. El porcentaje de linfocitos CD19+ no mostró diferencias significativas. El porcentaje promedio de linfocitos T CD3+ fue 40% para los machos

y 30% para las hembras. El porcentaje promedio de linfocitos B CD19+ fue 40%. Considerando que los resultados obtenidos al respecto del perfil de composición de células linfoides fueron muy similares en machos y hembras, así como la disponibilidad de ratones para realizar los ensayos, se decidió utilizar ratones hembra para la estandarización de la dosis de irradiación.

6.2 DOSIS ÓPTIMA DE IRRADIACIÓN PARA INDUCIR INMUNOSUPRESIÓN

Grupos de cuatro ratones hembra fueron expuestos a distintas dosis de radiación (de 300 a 900 rads). Estas dosis se determinaron según Merck, 2011, que indica que dosis inferiores a 300 rads no muestran efectos significativos en el daño a los ratones y que dosis superiores a 900 rads resultan letales. Tres de los ratones irradiados por grupo fueron sacrificados por dislocación cervical 24 horas, 3 y 7 días después de la irradiación. Después del sacrificio, se realizó la extracción del bazo. Se obtuvieron las células y se cuantificaron (figura 2).

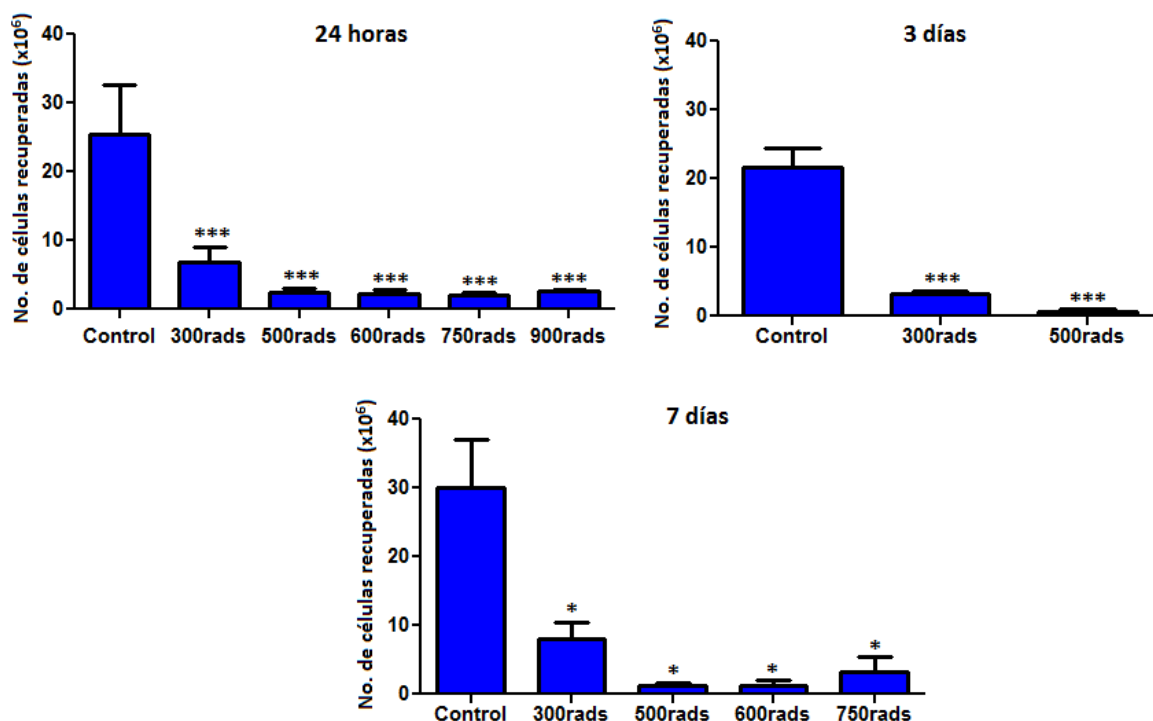


Figura 2. Comparación entre el número de células recuperadas del bazo de ratones control y ratones irradiados, a las 24 h, 3 días y 7 días después de recibir diferentes dosis de radiación. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$; *** $p < 0.0001$ (t de Student).

Se observó que la irradiación con Ce-137 induce depleción celular sustancial y significativa con todas las dosis de radiación. Los ratones irradiados con 900 rads tuvieron una sobrevida máxima de 4 días. Se realizó una extracción control a los 3 días con los ratones irradiados con 300 rads y 500 rads. Se observó que la dosis de 500 rads generaba una depleción mayor que la dosis de 300 rads. A los 7 días se observó una recuperación en el número de células con las diferentes dosis de irradiación, en especial con 300 rads.

6.3 ENSAYO DE SOBREVIDA A DIFERENTES DOSIS DE IRRADIACIÓN

Se mantuvo a los ratones con vida por 50 días a partir del día de la irradiación o hasta que murieran por los efectos de la radiación (figura 3).

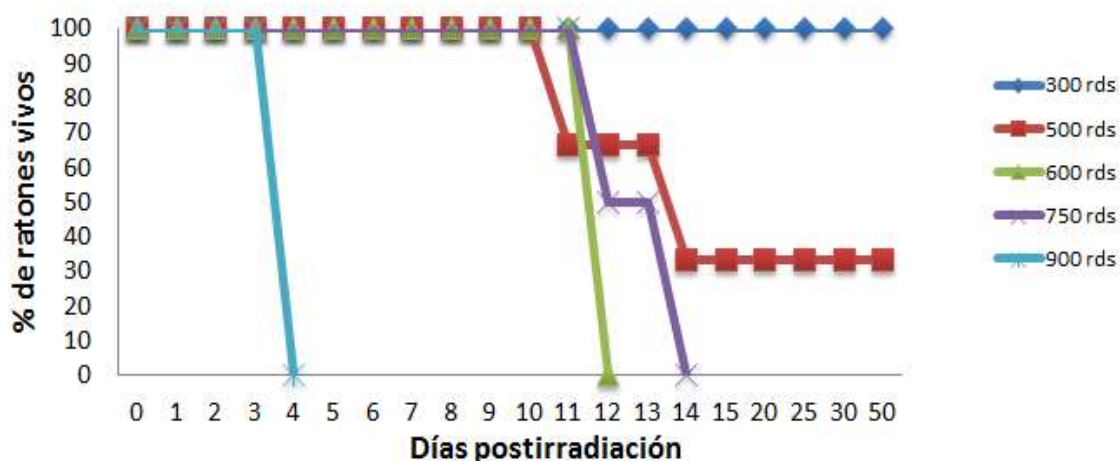


Figura 3. Efecto de distintas dosis de radiación en la sobrevida de ratones hembra (un grupo de 6 ratones por dosis de irradiación).

Los ratones irradiados con 900 rads no sobrevivieron más de cuatro días después de ser irradiados. Los ratones irradiados con 750 y 600 rads sobrevivieron hasta los 12 y 14 días respectivamente; únicamente los ratones irradiados con 300 y 500 rads sobrevivieron durante todo el tiempo de evaluación. La mayor tasa de mortandad en los ratones irradiados fue entre los 4 y los 14 días (este fenómeno se asoció posteriormente a un daño muscular de los ratones irradiados). Después del día 14 no se presentaron más decesos hasta el momento del sacrificio, a los 50 días.

6.4 DIFERENCIAS INMUNOLÓGICAS ENTRE LOS RATONES IRRADIADOS Y LOS NO-IRRADIADOS

A partir de la extracción de células del bazo se realizaron ensayos de citometría de flujo para detectar el efecto producido por la irradiación en linfocitos T CD3+ y linfocitos B CD19+ (figura 4).

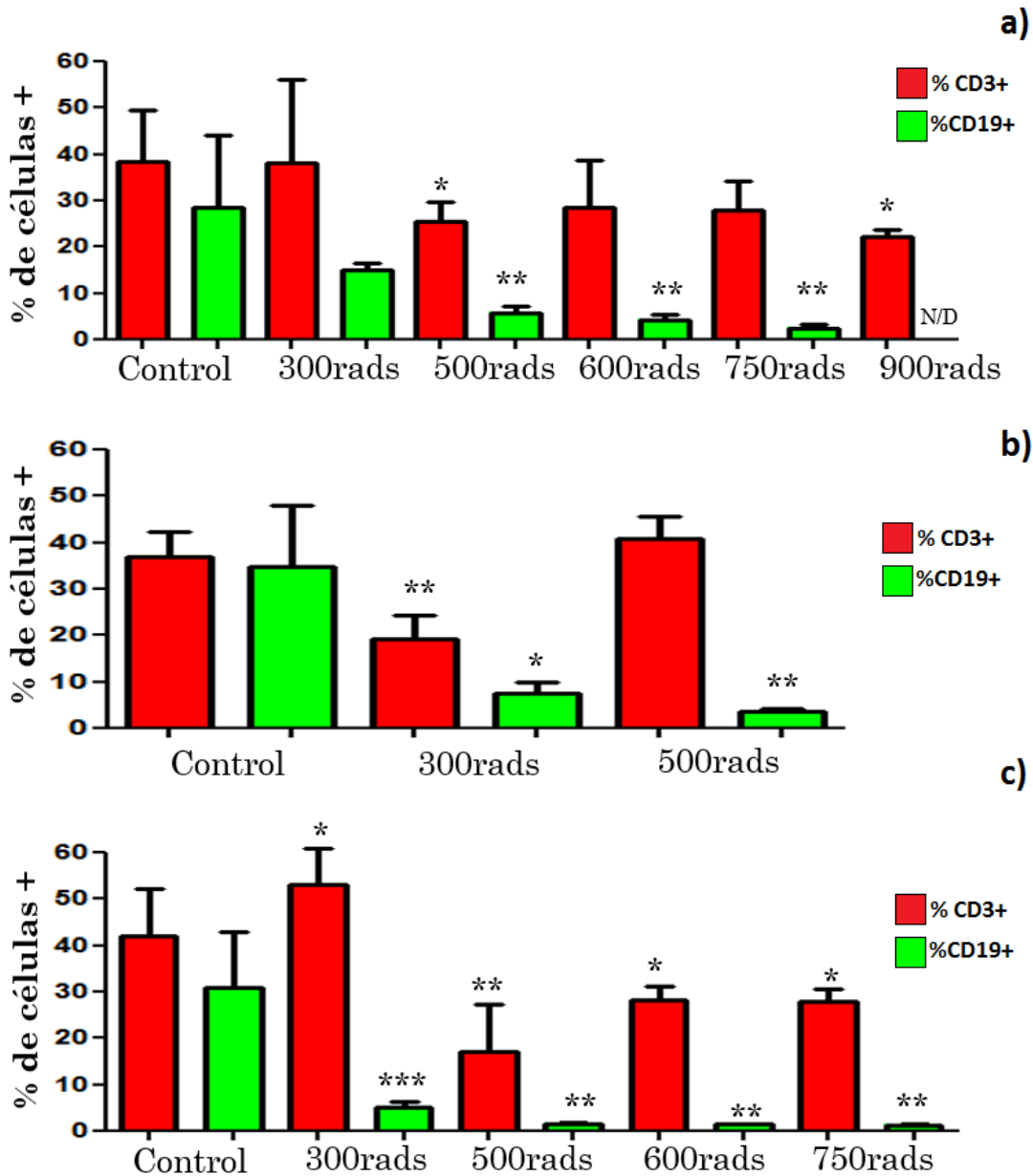


Figura 4. Porcentaje de linfocitos T CD3+ y B CD19+ recuperados a diferentes tiempos después de diferentes dosis de radiación: a) 24 horas, b) 3 días y c) 7 días post-irradiación.

* $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$; *** $p < 0.0001$ (t de Student).

A las 24 horas se observó que la dosis de 300 rads induce una disminución de linfocitos CD19+, mientras que los ratones sometidos a 500 rads mostraban una mayor disminución de linfocitos B que de linfocitos T. A las 24 horas las dosis de 600 y 750 rads indujeron una reducción en el número de linfocitos T, aunque esta reducción no mostro diferencia significativa respecto al control sin irradiar. Por otra parte, se observó una disminución paulatina de los linfocitos B con dosis de 500 a 750 rads. Con respecto a la dosis de 900 rads, no se obtuvieron suficientes células B para realizar el marcaje, aunque sí se observó una ligera disminución de linfocitos T respecto al control.

A los tres días se evaluaron los ratones sometidos a dosis de 300 y 500 rads. En este tiempo se observó una disminución en el porcentaje de linfocitos T con la dosis de 300 rads, no así con la dosis de 500 rads. Por otra parte, se observó una marcada disminución en las células B con ambas dosis, en especial con 500 rads.

A los siete días post-irradiación se observó una recuperación en la cantidad de linfocitos T en los ratones irradiados con 300 rads. Las dosis superiores a 500 rads no mostraron recuperación en el número total de linfocitos CD19+ y mostraron una ligera disminución en el porcentaje de linfocitos B con respecto a las 24 horas de irradiación.

Con base en los resultados obtenidos, hay dos posibles dosis de radiación para la inmunosupresión: 300 o 500 rads. Se realizó un ensayo de proliferación con células de ratones expuestas a estas dos dosis para sustentar la elección de una de las dos. Por otro lado, dado que las hembras control mostraron un número basal de linfocitos T menor que los machos, surgió el interés de saber si esta diferencia podría ser crucial para resistir o mitigar los efectos de la radiación. Por lo tanto, se procedió a evaluar si había diferencias entre ambos sexos con la dosis determinada.

6.5 FUNCIONALIDAD DE LA POBLACIÓN LINFOCITARIA DE RATONES IRRADIADOS

Para evaluar la funcionalidad de las células irradiadas se realizó un ensayo de proliferación celular a diferentes tiempos empleando el marcador CFSE en splenocitos de ratones irradiados con dosis de 300 y 500 rads (figura 5).

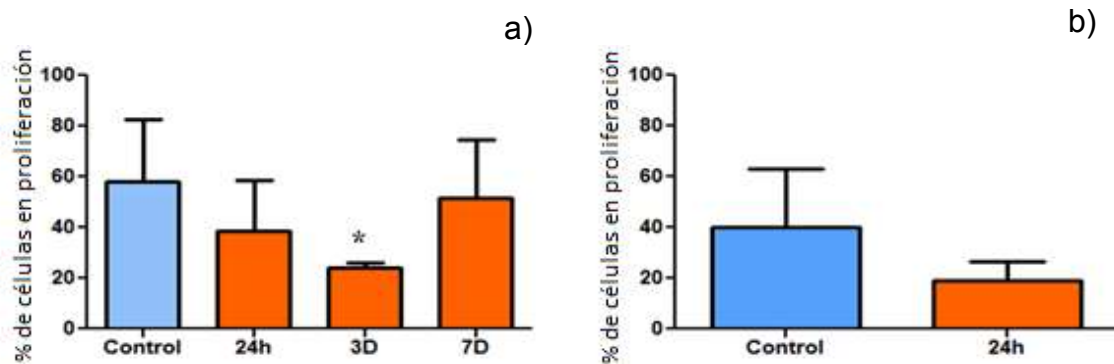


Figura 5. Proliferación de células totales de bazo. a) células de ratones expuestos a 300 rads recuperadas después de 24 horas, 3 y 7 días. b) células de ratones expuestos a 500 rads recuperadas después de 24 horas postirradiación. Ambos grupos fueron comparados con ratones control sin irradiar. La proliferación celular se realizó con 1.25 µg/mL de concanavalina A.

Los ratones expuestos a 300 rads mostraron una disminución de la capacidad proliferativa a los tres días. Estos resultados son congruentes con lo observado en el marcaje de linfocitos B y T, dado que a los 3 días después de la exposición a 300 rads se observó una disminución en el número de linfocitos, tanto T como B. A los 7 días se observó que el número de células que seguían siendo funcionales presento un aumento considerable con respecto al día 3. El número de células a las 24 horas y a los 7 días no mostró diferencias significativas con respecto al control.

Sólo se realizó la evaluación a las 24 horas de los ratones sometidos a 500 rads. En este caso, pese a una disminución porcentual del número de células en proliferación, no se observó diferencia significativa con respecto al control sin irradiar. Esta evidencia muestra que las células de bazo que sobrevivieron a la depleción celular producida por la irradiación, son capaces de mantener su funcionalidad aun después de ser expuestas a 500 rads. Dado que el objetivo de este trabajo fue identificar las condiciones en las que se genere una

inmunosupresión estadísticamente significativa acompañada de la máxima sobrevida, se eligió seguir trabajando con la dosis de 500 rads, debido a que en tiempos tempranos la dosis de 500 rads genera una disminución mayor en el número total de células que la dosis de 300 rads.

6.6 SOBREVIDA DE RATONES HEMBRAS Y MACHOS

Se realizó la irradiación con una dosis de 500 rads a grupos de 12 ratones macho y 6 ratones hembra los cuales se mantuvieron en las condiciones de esterilidad previamente descritas.

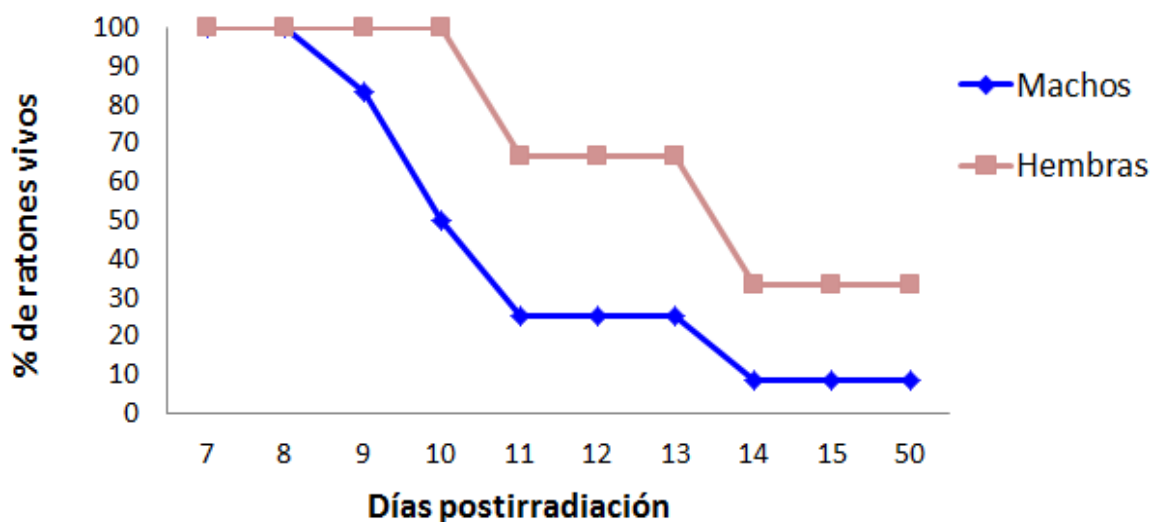


Figura 6. Efecto de la radiación en la sobrevida de ratones machos y hembras expuestos a 500 rads. La dosis de 5 Gy induce diferente grado de depleción celular en ambos sexos.

Al término de los 50 días, se observó que los ratones hembra sobrevivieron 30% más que los ratones machos (figura 6). Los ratones machos empezaron a morir a los 9 días, mientras que las hembras lo hicieron a partir de los 11 días. Los últimos decesos se presentaron a los 14 días. Posterior a este tiempo no se presentaron decesos. Esta aproximación permitió observar que los ratones hembra poseen alguna característica particular que les permite sobrevivir más que los ratones machos. No obstante, la sobrevida final de los ratones resultó muy baja y poco satisfactoria para proponer esta técnica como un método eficiente para la evaluación posterior de tratamientos varios. Se decidió entonces analizar las

posibles causas de muerte, indirectas a la irradiación, y tratar de mejorar la sobrevivencia de los ratones irradiados. También, se decidió seguir utilizando la dosis de 500 rads, puesto que nuestro ensayo de sobrevivencia demostró que los ratones son capaces de resistir 50 días después de la exposición.

6.7 DIFERENCIAS INMUNOLÓGICAS ENTRE MACHOS Y HEMBRAS IRRADIADOS

Luego de la irradiación con 500 rads a grupos de 4-6 ratones, se realizó un análisis por inmunofluorescencia para determinar cómo se había modificado el porcentaje celular de linfocitos B CD19+ y el porcentaje de linfocitos T CD3+CD4+ y T CD3+CD8+ a diferentes tiempos post-irradiación (figura 7).

Respecto al porcentaje de linfocitos B CD19+ se encontró que los ratones machos parecían presentar una mayor disminución a tiempos tempranos con respecto a las hembras. A los 7 días, los ratones machos recuperaron el doble de su porcentaje de CD19+ con respecto a las hembras. A los 10 días, tanto machos como hembras presentaban porcentajes similares de linfocitos B. A los 50 días, ambos sexos mostraron una recuperación total de linfocitos B con respecto a su cantidad basal original.

Al evaluar el número de eventos para los linfocitos T CD3+CD4+, se observó un aumento en su número total en tiempos tempranos (24 horas y 3 días) en los ratones machos; no obstante, en tiempos posteriores hubo una disminución radical. Al final del tiempo de evaluación (50 días) aún presentaban una disminución significativa con respecto al total de eventos del control. Por su parte, los ratones hembra mantuvieron un número de linfocitos T CD3+CD4+ constante. En ningún tiempo se encontraron diferencias significativas con respecto al control. Nos preguntamos si la clave de la sobrevivencia de los ratones hembra podría estar en este mantenimiento constante de linfocitos T CD3+CD4+.

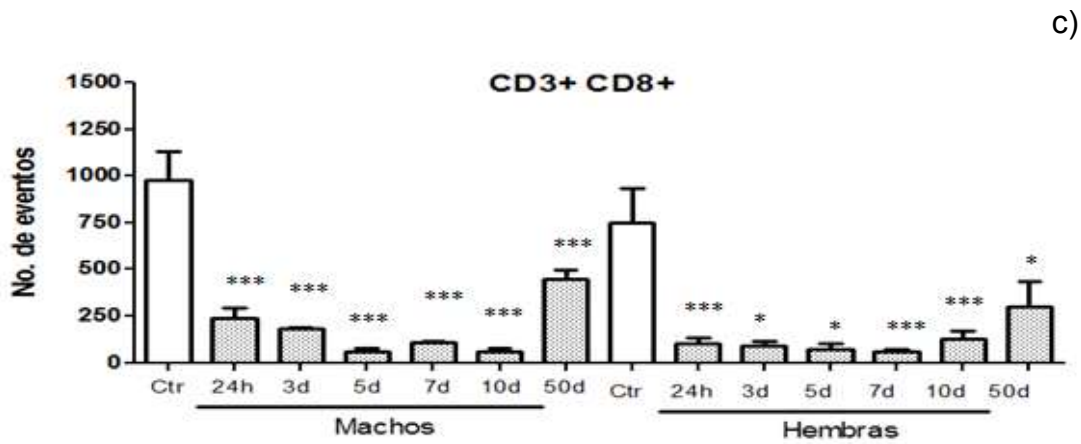
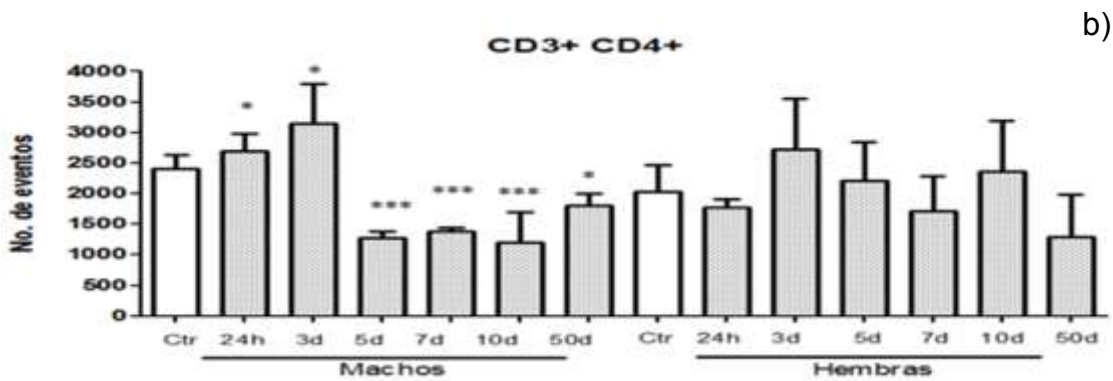
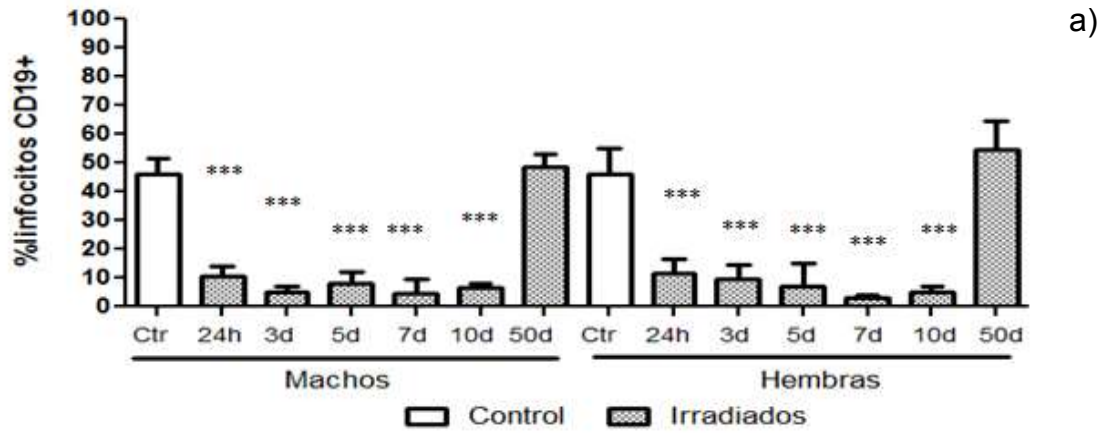


Figura 7. Susceptibilidad a la irradiación en las poblaciones linfoides CD19+(a), CD3+CD8+ (b) y CD3+CD4+(c) de hembras y machos sometidos a 500 rads. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$; *** $p < 0.0001$ (t de Student).

Por otra parte, al analizar el número de eventos de la subpoblación de linfocitos T CD3+CD8+ positiva se observó que tanto en los ratones machos como en las hembras existía una disminución sustancial de estos linfocitos. Inclusive, 10 días

después de la irradiación no se observó recuperación en el número de linfocitos CD3+CD8+. Y si bien los ratones hembra mostraron un ligero aumento en la cantidad de estos linfocitos a los 10 días con respecto a los machos, al término del periodo de evaluación (50 d) ni hembras ni machos habían recuperado los niveles basales de linfocitos CD3+CD8+. De nuevo, esta disminución fue más marcada en los machos que en las hembras.

6.8 FUNCIONALIDAD DE LINFOCITOS DE RATONES IRRADIADOS DE AMBOS SEXOS

A la par se realizaron ensayos de proliferación con los mismos grupos de ratones hembras y machos (figura 8).

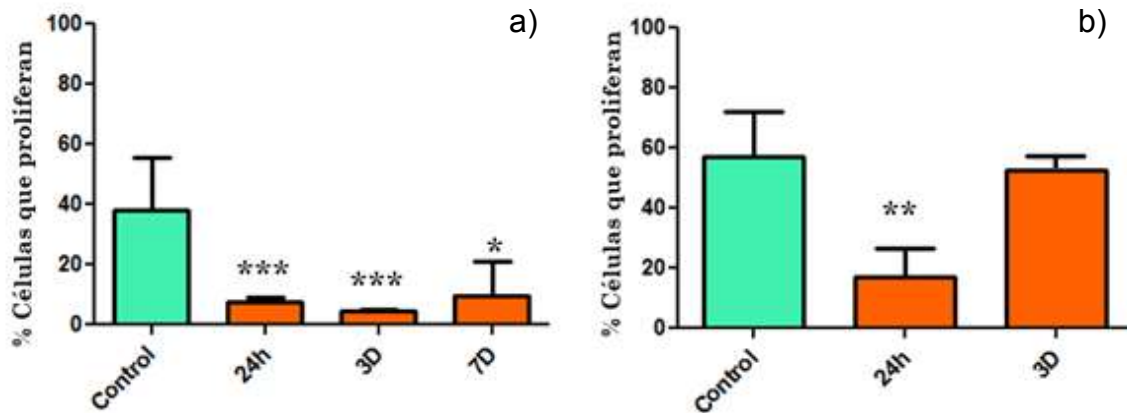


Figura 8. Diferencias en el número de células en proliferación entre machos y hembras: a) machos b) hembras. * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.005$; *** $p < 0.0001$ (t de Student). En ambos grupos los ratones irradiados fueron comparados con ratones control sin irradiar. La proliferación celular se realizó con 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de concanavalina A.

En los machos se encontró que el porcentaje de células que proliferaban se mantenía disminuido en todos los tiempos y mostraba una ligera recuperación a los 7 días. Por su parte, el porcentaje de células en proliferación de los ratones hembra mostraba una menor disminución respecto a los machos aun después de 24 horas. A su vez, después de los tres días de irradiación no se observaron diferencias significativas con respecto al control. Con estos resultados se constató nuevamente que los ratones hembra parecían responder mejor a los efectos de la radiación ionizante.

6.9 MEJORA EN LA SUPERVIVENCIA DE LOS RATONES IRRADIADOS

Uno de los efectos característicos de la exposición a dosis de radiaciones ionizantes es la disminución de tejido muscular. Esta característica nos llevó a preguntarnos si el alto deceso en los ratones era producto exclusivamente de los efectos directos de la radiación o existía alguna otra causa. Al realizar la exploración de los cadáveres de los ratones, éstos aparentaban cierto grado de desnutrición. Una de las posibles razones para la muerte de los ratones era la incapacidad de alcanzar el alimento en el periodo de convalecencia después de la irradiación (entre el día 1 y el 14). Las jaulas en donde se mantiene a los ratones tienen una rejilla en la parte superior, con separaciones para colocar agua y alimento. En condiciones normales los ratones deben erguirse en dos patas y roer a través de las rendijas para obtener el alimento. El agua se encuentra en un reservorio con un bebedero al cual los ratones pueden acceder en cuatro patas. Se decidió colocar cinco grageas de alimento suave en la parte inferior de la jaula y cambiarlas cada tres días. Se diseñó un experimento con dos grupos de ratones hembra (de 6 cada uno) que fueron expuestas a 500 rads. El primero fue mantenido con el alimento facilitado y al segundo se le proporciono alimento de forma normal (figura 9).

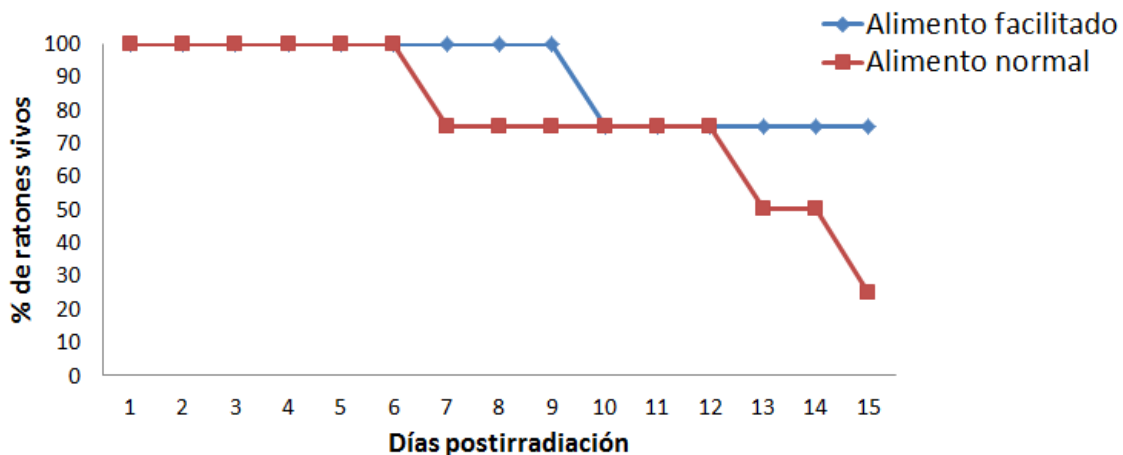


Figura 9. Efecto en la sobrevivencia de dos grupos de ratones hembras irradiados con 500 rads; uno con alimento disponible de forma normal y otro con alimento facilitado.

Los ratones se mantuvieron en observación diaria por 15 días. A partir del día 7 comenzó a haber un aumento en la mortandad en los ratones que no contaban con alimento facilitado. Al término del periodo de convalecencia, 80% de los ratones con alimento facilitado sobrevivieron y únicamente 20% de los ratones con alimento sin facilitar lo hicieron. Se observó que la facilitación de alimento aumentaba de 40% a 80% la sobrevivencia de las hembras.

Esto demostró que en efecto existía un aumento en la sobrevivencia de los ratones si se les facilita el alimento. En un experimento posterior se mantuvieron 4 ratones hembras durante 50 días después de ser irradiadas con 500 rads y con alimento facilitado por 15 días. Para este grupo de ratones se acondicionó una terapia de estiramiento de ligamentos cada tres días durante los primeros 20 días. Las extremidades de los ratones eran estimuladas y se les ponía a correr durante 2 minutos cada día. Todos los ratones de este grupo sobrevivieron hasta los 50 días después de ser expuestos.

6.10 RECUPERACIÓN DEL SISTEMA INMUNE DE RATONES IRRADIADOS

Grupos de 5 ratones fueron irradiados con una dosis de 500 rads y mantenidos durante 50 días; se mantuvieron en condiciones de esterilidad con alimento facilitado por 14 días y ejercicios durante 20 días. Pasado este periodo, los ratones fueron sacrificados por dislocación. Se extrajo y se pesó el bazo y se realizaron ensayos de cuantificación celular y marcaje de anticuerpos anti-CD3+ y anti-CD19+ (figura 10).

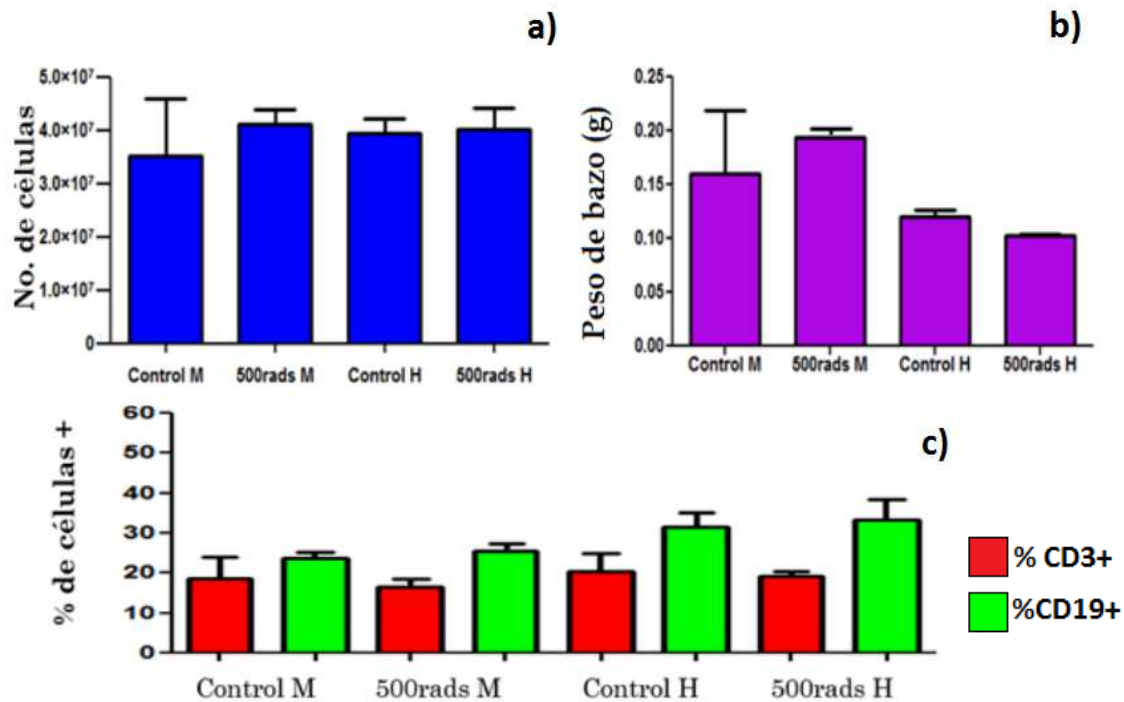


Figura 10. Recuperación del sistema inmune de ratones irradiados machos y hembras 50 días post-irradiación. H = hembras; M = machos: a) número de células recuperadas del bazo, b) peso del bazo en gramos, c) porcentaje de células positivas para CD3+ y CD19+.

Se compararon los resultados entre este grupo de ratones y un grupo de ratones sanos sin irradiar. Después de un periodo de 50 días no se encontraron diferencias significativas en el peso del bazo al comparar ratones irradiados, tanto hembras como machos, con sus contrapartes sanas. A su vez, la cantidad de células recuperadas tampoco mostró diferencias significativas entre ambos grupos. Por otra parte, se encontró una completa recuperación tanto en los linfocitos CD3+ como en los CD19+. Estos resultados permiten confirmar que el modelo de inmunosupresión es completamente funcional, dado que al menos en los parámetros celulares e inmunológicos analizados los ratones volvieron a las condiciones originales. Se demuestra también que los efectos de daño y depleción causados por la radiación son reversibles por completo en un periodo de cincuenta días post-irradiación.

7. DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un modelo de inmunosupresión basado en el uso de radiaciones ionizantes de Cs-137 en ratones BALB/c extrapolable al ser humano con el propósito de establecer las condiciones idóneas para evaluar el potencial de un producto inmunopotenciador de la respuesta inmune.

El uso de radiaciones ionizantes como una opción para generar inmunosupresión tanto en animales como en la funcionalidad de células inmunes ha sido ampliamente difundido (Duran-Struuck & Dysko, 2009). Diversos estudios han evaluado el papel de la irradiación sobre el sistema inmune de ratones (McFarland et al., 2012). En este trabajo examinamos el efecto de diferentes niveles de irradiación en parámetros inmunológicos asociados a los linfocitos T y B en ratones de diferentes sexos (figura 1). Los resultados de la inmunofluorescencia de linfocitos CD3+ y CD19+ de ratones control machos y hembra, revelaron una diferencia significativa (*t* de Student: $p=0.0012$) en el número total de linfocitos CD3+ entre machos y las hembras de la misma edad (6-8 semanas). Los machos presentaron alrededor de un 8% más de linfocitos CD3+ respecto a las hembras. Está reportado que el valor estándar promedio de linfocitos CD3+ en el bazo de ratones hembra y machos oscila entre 21% y 30% del total de la población celular (León Chavez, 2009). Esta diferencia se debe en gran medida a un metabolismo más acelerado que tienen los ratones machos respecto a las hembras (Senthil Kumar et al., 2014). Se ha reportado que existen diferencias significativas en la respuesta al daño inducido por exposición a radiaciones ionizantes entre ratones hembras y machos en un modelo de tumorigénesis inducido (Trani et al., 2013). La diferencia porcentual de linfocitos T CD3+ fue el único parámetro evaluado que mostró diferencia significativa en los ratones control entre machos y hembras. Teniendo en consideración esta variedad basal, se decidió realizar la estandarización de la dosis de irradiación necesaria para inducir inmunosupresión en ratones hembras. Los resultados confirmaron el umbral de tolerancia reportado en los ratones a la irradiación. Se sabe que las dosis subletales de irradiación en ratones oscila entre 450-1200 rads y que la DL50 se encuentra entre 860 a 900 rads (Hanson et al., 1987). También se ha reportado que

sepas de ratones particulares, tienen radiorresistencias diferentes, siendo los ratones B6 los más resistentes a la radiación (Liu et al., 2010). En este trabajo se optó por emplear ratones BALB/c, debido a que estos cuentan con la radiosensibilidad más parecida a la del ser humano (Liu et al., 2010). Se consideró que esta característica podría permitir hacer que el modelo fuera extrapolable al humano al momento de realizar la evaluación de algún adyuvante de interés. Al realizar el conteo de células totales extraídas de los bazos de ratones irradiados a diferentes tiempos (figura 2) se observó que desde las 24 horas tras la irradiación, la cantidad de células recuperadas se había reducido drásticamente en comparación con los ratones no irradiados. Esta reducción en el número de células recuperadas fue aumentando en los siguientes tiempos evaluados. En una evaluación parcial realizada a los 3 días posteriores a la irradiación en ratones expuestos a 300 y 500 rads, se confirmó que existía una disminución estadísticamente significativa (*t de Student: $p < 0.0001$*) de células respecto los controles sin irradiar. Se observó que existía una mayor disminución en el número total de células recuperadas en los ratones irradiados con 300 rads en comparación a los expuestos a 500 rads. Los ratones irradiados con dosis de 300, 500 y 750 rads, analizados 7 días después de ser irradiados, presentaron un aumento en el número total de células respecto a los tiempos anteriores. Se analizó entonces la viabilidad de las células expuestas a estas dosis a los mismos tiempos en los que se procesó el bazo con las dosis en las que se presentó recuperación en el número total de células (figura 5). No se realizó proliferación ni subsecuentes estudios con las células recuperadas a partir de 750 rads debido a que esta dosis se encuentra dentro de la DL50 de los ratones, lo que supondría que en los subsecuentes experimentos se produciría un rendimiento bajo en el número de ratones obtenidos. En los ensayos de proliferación se encontró que la recuperación celular aumentaba al igual que lo observado con el conteo total de células con la dosis de 300 rads. Dado que el objetivo de este trabajo fue identificar las condiciones en las que se genere una inmunosupresión estadísticamente significativa acompañada de la máxima sobrevivencia, se eligió seguir trabajando con la dosis de 500 rads, porque en tiempos tempranos la dosis de 500 rads ofrece una diferencia significativa mayor en

la disminución de células que la dosis de 300 rads. Si bien el número de linfocitos a los tres días con la dosis de 500 rads había disminuido, se decidió seguir empleando esta dosis ya que en los ensayos de supervida, se tuvieron ratones capaces de resistir 50 días después de la exposición. Por su parte los ensayos de inmunofluorescencia evaluados por citometría de flujo de las estirpes celulares de linfocitos T y B extraídas de bazo de ratones expuestos a distintas dosis de irradiación (figura 4), demostraron la estrecha relación que existe entre el decaimiento de las poblaciones linfoides y la disminución de la supervida de los ratones. Los linfocitos B CD19+ resultaron ser altamente afectados por la irradiación en las distintas dosis. Está reportado que el bazo es notablemente radiosensible en comparación con otros órganos como el cerebro (Krízala, Kovárová, Stoklasová, & Ledvina, 1982). A su vez se sabe que el factor de ponderación tisular del bazo es similar al de la glándula tiroides (0.05wT), lo cual significa que el efecto lesivo total debido a todos los efectos estocásticos resultantes de la irradiación uniforme en todo el cuerpo del ratón, es uniformemente equivalente en ambos tejidos (European Nuclear Society, 2007). Dado que el bazo es el principal centro de maduración de los linfocitos B, suponemos que ello conlleva a explicar por qué se observa una disminución tan marcada de este linaje celular. Mediante el marcaje con CFSE de las células puestas en proliferación a diferentes tiempos después de ser irradiadas con 300 y 500 rads se observaron diferencias significativas (*t de Student: p=0.0329*) en la capacidad proliferativa a los tres días después de la irradiación con la dosis de 300 rads (figura 5). Como se mencionó anteriormente, la exposición a dosis agudas de irradiación afecta la viabilidad y funcionalidad de las células. Sin embargo, el daño a médula producido con la dosis de 500 rads en los ratones no es significativo, por lo que puede reestablecer el sistema a largo plazo (Liu et al., 2010). En los ensayos de supervida dada la exposición de los ratones a diferentes dosis, se observó cómo a mayores dosis de irradiación la supervida de los ratones disminuye de manera acelerada (figura 3). Los ratones irradiados expuestos a 300 y 500 rads fueron los únicos que lograron sobrevivir hasta los 50 días posteriores a la irradiación; las dosis mayores a 500 rads provocaron el deceso de los ratones entre los 4 y los 14 días. En la literatura se menciona que dosis cercanas a 500 rads (+/-

50 rads) han sido utilizadas de manera satisfactoria en diferentes estudios con la intención de generar inmunosupresión en ratones (McFarland et al., 2012). La dosis de 500 rads resulta ideal para generar un modelo de inmunosupresión controlada que permitiría identificar las diferencias mínimas que se produzcan en la recuperación de los ratones irradiados a causa del efecto de un inmunopotenciador de interés. Los ratones irradiados con Cesio-137 han sido ampliamente utilizados como modelo de estudio en distintos campos de investigación: han permitido evaluar estrategias de terapia génica (Fredrickson, Cohn, Coffey, Pek, & Finkel, 2008), entender la evolución de enfermedades neurodegenerativas (Fraser, Farquhar, McConnell, & Davies, 1989), evaluar modelos de daño neuronal (Ghoneum, Badr El-Din, Abdel Fattah, & Tolentino, 2013) y caracterizar grados de reparación de médula ósea (Olch & Crooks, 2011), entre otros. Nuestros resultados demuestran que esta metodología permite generar inmunosupresión controlada en los ratones, la cual sería de gran utilidad en la evaluación de moléculas inmunomoduladoras (incluyendo adyuvantes e inmunopotenciadores). Dado que las hembras control mostraron tener un número menor de linfocitos T basal respecto a los machos, surgió el interés de saber si esta diferencia podría ser crucial para resistir o mitigar los efectos de la irradiación, por lo que se procedió a evaluar si había diferencias entre ambos sexos con la dosis de 500 rads.

Los resultados muestran que hay una diferencia sustancial del efecto de la irradiación ligado al sexo en la sobrevivencia de los ratones expuestos (figura 6). Ensayos de radiosensibilidad y radiotolerancia han mostrado diferencias en la respuesta a la irradiación en ratones hembras y machos expuestos a dosis agudas de irradiación (Billings, Romero-weaver, & Kennedy, 2014). Los resultados mostraron una mayor tolerancia a la irradiación en los ratones hembras que en machos; los ensayos de proliferación celular realizados en hembras y machos irradiados con una dosis de 500 rads, demostraron que si bien los machos presentan una ligera recuperación a los 7 días, los ratones hembra muestran esta recuperación a partir de los 3 días (figura 8). Una de las teorías que explican este comportamiento son las diferencias antropométricas que existe entre el músculo de las hembras y de los machos (Ghazy, Abu El-Nazar, Ghoneim, Taha, & Aboueilla,

2015). Si bien se ha descrito que existe una amplia variedad de mecanismos que se ven alterados dada la exposición aguda a una irradiación, se sabe que la deficiencia en los distintos tipos de tejido muscular es un factor asociado al daño a corto plazo por exposición aguda a la irradiación (McDonald, Kunz, & McLoon, 2014). Una ventaja de nuestro modelo es que es posible disminuir (y en algunos casos revertir) el daño causado por una irradiación subletal con terapias de acompañamiento y alimento facilitado (figura 9). Estas dos metodologías son simples mecanismos físicos, que no interfieren con el desarrollo y el papel que puedan tener sustancias evaluadas en nuestro modelo. En la mayoría de la literatura analizada, se suele utilizar ratones inmunodeprimidos indistintamente según su disponibilidad, ya sean hembra (McFarland et al., 2012), machos (Ghazy et al., 2015) o ambos (Billings et al., 2014). La mayor sobrevivencia de las hembras sobre los machos apoya nuestra propuesta de utilizarlas en el desarrollo del modelo. Si las características propias del inmunopotenciador o el adyuvante a evaluar requiriera el uso exclusivo de ratones machos, el modelo podría adaptarse y funcionar aumentando bien sea el número de ratones utilizados o prolongar el tiempo que se les provee alimento facilitado y terapia. La sencilla caminata por dos minutos es una extrapolación de las terapias que realizan los pacientes afectados por irradiaciones y tienen deficiencia muscular (US Department of Health and Human Services, 2013); se ha descrito que los ejercicios aeróbicos permiten mitigar de una forma más eficiente el daño muscular (Pandya & Eichinger, 2012). El hacer caminar a los ratones por dos minutos ayuda también a disminuir el estrés de estar enjaulados largos periodos de tiempo, los ratones se mostraban más tranquilos y con el tiempo se condicionaron a la manipulación. Al evaluar por citometría de flujo el efecto de la irradiación con 500 rads sobre las poblaciones de linfocitos CD19+ en machos y hembras a diferentes días (figura 7), se presentó una disminución sustancial de esta población celular aun a los 10 días después de la irradiación. Dado el reducido número de linfocitos T recuperados, se decidió realizar las comparaciones estadísticas utilizando el número de eventos capturado en los análisis por citometría de flujo. Se encontró que el subgrupo CD3+CD8+ era sustancialmente más afectado por la irradiación que el CD3+CD4+. En los ratones machos el subgrupo CD4+

mostró un incremento respecto al control sin irradiar (t de Student: $p \leq 0.05$) a las 24 horas y 3 días después de la irradiación. Se ha descrito que este fenómeno ocurre cuando el número de células que entran en apoptosis excede la capacidad del órgano blanco para eliminarlas; condición conocida como anastasis celular (Tang et al., 2012). En esta, las células son arrestadas en estados de apoptosis primarios, por lo cual pueden continuar desempeñando su función (y en este caso seguir expresando receptores) por el tiempo que el sistema se vuelve a equilibrar o es capaz de eliminarlas. Posterior al 5 día de irradiación, los niveles de linfocitos CD4+ decaen considerablemente $p < 0.0001$ (t de Student) y se mantienen así hasta la última evaluación del día diez. No obstante en los ratones hembra este mismo subgrupo de CD4+ no mostró diferencias significativas en ningún tiempo respecto a los ratones sin irradiar. Este puede ser considerado como una de las mayores diferencias en la respuesta a la radiación ligada al sexo entre hembras y machos. Por otra parte el número de eventos evaluado tanto en hembras y machos para CD8+ fue el más afectado en ambos sexos, en todos los tiempos e inclusive permaneció disminuido ligeramente aun 50 días después de la irradiación.

El hecho que sea posible medir diferencias significativas tan marcadas como resultado de la exposición a la irradiación, permitiría analizar cualquier recuperación o fluctuación de estos parámetros como resultado del efecto de alguna sustancia de interés evaluada. Si bien existe una gran variedad de inmunopotenciadores y adyuvantes, en general actúan sobre la estimulación de la respuesta inmune adaptativa y de la memoria inmunológica (Lee & Nguyen, 2015). Las técnicas para evaluar la eficiencia de inmunopotenciadores en su mayoría requieren organismos con sistemas inmunocomprometidos (Walzer et al., 1997). Si bien en la evaluación de adyuvantes se han empleado ratones senescentes para emular el deterioro inmunológico (Segura-Velázquez et al., 2006), estos requieren ocupar espacio y recursos por lo menos año y medio antes de ser considerados senescentes. El modelo propuesto permitiría reducir esos tiempos de meses a días. En ratones con inmunosupresión química, se tiene la desventaja que el efecto producido por una sustancia de interés puede estar enmascarado por los efectos secundarios a largo plazo del inmunosupresor químico utilizado (Rodríguez Cerón, Vacas Puertollano,

& Puertollano, 2014). Respecto a ello, nuestros resultados demuestran que después de un periodo de 50 días tanto el número de células recuperadas del bazo como en los porcentajes de las poblaciones linfocitarias CD19+, CD3+CD8 y CD3+CD4 evaluadas, no muestran diferencias significativas en comparación con los parámetros de referencia inicial sin irradiar (figura 10). Esta evidencia confirma que el daño provocado con 500 rads es completamente reversible a los 50 días. Al igual que en una enfermedad curable, el método aquí propuesto tiene la virtud de permitir a los ratones ir recuperando paulatinamente su sistema inmune, con lo cual se genera un modelo con una mayor significancia biológica. Este modelo además permitiría volver a inducir la inmunosupresión a un ratón recuperado e incluso simular los efectos de una recaída del sistema inmune.

Consideramos que este modelo podría considerarse una buena alternativa que facilitaría en gran medida el análisis y la evaluación de distintas sustancias inmunopotenciadoras de una manera más práctica, rápida y eficiente en comparación con las alternativas disponibles a la fecha.

A manera de perspectiva se sugiere evaluar en este modelo una sustancia con potencial papel adyuvante, a la par de alguna sustancia previamente caracterizada con capacidad inmunoestimulante, con lo cual se podría corroborar la eficiencia de nuestro modelo y confirmar su utilidad práctica.

8. CONCLUSIONES

La irradiación con 5 Gy de Cs-137 permite inducir la mayor depleción en las células inmunes evaluadas, manteniendo las restantes funcionales.

La dosis de 5 Gy induce diferente grado de depleción celular en ambos sexos: siendo las hembras más resistentes a la radiación ionizante que los machos. Con esta dosis se obtuvo una tasa de supervivencia de 40% en las hembras y un 10% en los ratones machos irradiados.

Se presentó una disminución sustancial de linfocitos B CD19+ en ambos sexos desde las 24 horas hasta los 10 días post-irradiación.

Respecto a los subgrupos de linfocitos T evaluados, los CD8+ fueron los más afectados por la radiación en ambos sexos. En los ratones hembra, los CD4+ no mostraron diferencias significativas en ningún tiempo evaluado respecto a los ratones sin irradiar. Sin embargo, CD4+ mostró un decremento considerable en los ratones macho a partir de los 5 días de irradiación.

Si se facilita el alimento y se realiza una sencilla terapia de estiramientos musculares en sus extremidades, se logra obtener una sobrevivencia de 100% a largo plazo en los ratones irradiados.

Después de transcurridos 50 días post irradiación, los ratones macho y hembras recuperaron el número original de células recuperadas del bazo con respecto al control, así como sus niveles normales de linfocitos B y T.

9. REFERENCIAS

- Abdala DO, C. H. M. C. M. R. (1999). Adyuvantes inmunológicos. *Rev Cubana Investig Bioméd*, 18(2), 130–7.
- Al-Alawi, M., Hassan, T., & Chotirmall, S. H. (2014). Advances in the Diagnosis and Management of Asthma in Older Adults. *The American Journal of Medicine*, 127(5), 370–378.
<http://doi.org/10.1016/j.amjmed.2013.12.013>
- ATSDR. RESUMEN DE SALUD PÚBLICA Cesio (2004).
- Aw, D., Silva, A. B., & Palmer, D. B. (2007). Immunosenescence: emerging challenges for an ageing population. *Immunology*, 120(4), 435–46. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2007.02555.x>
- Azuma, I. (1992). Synthetic immunoadjuvants: application to non-specific host stimulation and potentiation of vaccine immunogenicity. *Vaccine*, 10(14), 1000–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1471423>
- Beetz, S., Wesch, D., Marischen, L., Welte, S., Oberg, H.-H., & Kabelitz, D. (2008). Innate immune functions of human $\gamma\delta$ T cells. *Immunobiology*, 213(3-4), 173–182.
<http://doi.org/10.1016/j.imbio.2007.10.006>
- Berdis, A. (2008). DNA Polymerases as Therapeutic Targets†. *Biochemistry*, 47(32), 8253–8260.
<http://doi.org/10.1021/bi801179f.DNA>
- Billings, P. C., Romero-weaver, A. L., & Kennedy, A. R. (2014). Effect of Gender on the Radiation Sensitivity of Murine Blood Cells. *Gravitational and Space Research*, 2(1), 25–31.
- Bulbulian, S. (2008). *La radioactividad* (2a ed.). Mexico D.F.
- Chang, H. Y., & Yang, X. (2000). Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 64(4), 821–46. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=99015&tool=pmcentrez&render type=abstract>
- Chen, Z., Wang, W., Zhou, H., Suguitan, A. L., Shambaugh, C., Kim, L., ... Jin, H. (2010). Generation of live attenuated novel influenza virus A/California/7/09 (H1N1) vaccines with high yield in embryonated chicken eggs. *Journal of Virology*, 84(1), 44–51.
<http://doi.org/10.1128/JVI.02106-09>
- Cole, G., McCaffrey, J., Ali, A. A., & McCarthy, H. O. (2015). DNA vaccination for prostate cancer: key concepts and considerations. *Cancer Nanotechnology*, 6(1), 2.
<http://doi.org/10.1186/s12645-015-0010-5>
- Couch, R. B. (2008). Seasonal inactivated influenza virus vaccines. *Vaccine*, 26 Suppl 4, D5–9.
<http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.05.076>

- Couch, R., Winokur, P., Brady, R., & Belshe, R. (2007). Safety and immunogenicity of a high dosage trivalent influenza vaccine among elderly subjects. *Vaccine*, 25(44), 7656–7663. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X07009681>
- Cox, J. C., & Coulter, A. R. (1997). Adjuvants - A classification and review of their modes of action. *Vaccine*, 15(3), 248–256. [http://doi.org/10.1016/S0264-410X\(96\)00183-1](http://doi.org/10.1016/S0264-410X(96)00183-1)
- Cox, M. M. J., & Hollister, J. R. (2009). FluBlok, a next generation influenza vaccine manufactured in insect cells. *Biologicals : Journal of the International Association of Biological Standardization*, 37(3), 182–9. <http://doi.org/10.1016/j.biologicals.2009.02.014>
- Díaz, E. B. (2003). Inmunosupresión. Retrieved from <http://www.fac.org.ar/tcvc/llave/c231/buzon.PDF>
- Duran-Struuck, R., & Dysko, R. C. (2009). Principles of bone marrow transplantation (BMT): providing optimal veterinary and husbandry care to irradiated mice in BMT studies. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science : JAALAS*, 48(1), 11–22. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2694700&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Edelman, R. (1992). An update on vaccine adjuvants in clinical trial. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 8(8), 1409–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1466969>
- Edelman, R., & Tacket, C. O. (1990). Adjuvants. *International Reviews of Immunology*, 7(1), 51–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2132879>
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic Pathology*, 35(4), 495–516. <http://doi.org/10.1080/01926230701320337>
- European Nuclear Society. (2007). Tissue weighting factor. Retrieved July 23, 2015, from <https://www.euronuclear.org/info/encyclopedia/t/tissue-weight-factor.htm>
- Fiore, A. E., Bridges, C. B., & Cox, N. J. (2009). Seasonal influenza vaccines. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 333, 43–82. http://doi.org/10.1007/978-3-540-92165-3_3
- Franceschi, C., Bonafè, M., & Valensin, S. (2000). Human immunosenescence: the prevailing of innate immunity, the failing of clonotypic immunity, and the filling of immunological space. *Vaccine*, 18(16), 1717–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10689155>
- Fraser, H., Farquhar, C. F., McConnell, I., & Davies, D. (1989). The scrapie disease process is unaffected by ionising radiation. *Progress in Clinical and Biological Research*, 317, 653–8. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2513584>
- Fredrickson, B. L., Cohn, M. a, Coffey, K. a, Pek, J., & Finkel, S. M. (2008). Modulation of Total Body Irradiation Induced Life Shortening by Systemic Intravenous MnSOD-Plasmid Liposome Gene Therapy. *Radiat Res.*, 95(5), 1045–1062. <http://doi.org/10.1037/a0013262>.Open

- Ghazy, A. a., Abu El-Nazar, S. Y., Ghoneim, H. E., Taha, A.-R. M., & Abouelella, A. M. (2015). Effect of murine exposure to gamma rays on the interplay between Th1 and Th2 lymphocytes. *Frontiers in Pharmacology*, *06*(April), 1–10. <http://doi.org/10.3389/fphar.2015.00074>
- Ghoneum, M., Badr El-Din, N. K., Abdel Fattah, S. M., & Tolentino, L. (2013). Arabinoxylan rice bran (MGN-3/Biobran) provides protection against whole-body γ -irradiation in mice via restoration of hematopoietic tissues. *Journal of Radiation Research*, *54*(3), 419–429. <http://doi.org/10.1093/jrr/rrs119>
- Goodwin, W. E., Mims, M. M., & Kaufman, J. J. (1962). Human renal transplantation III. Technical problems encountered in six cases of kidney homotransplantation. *Transactions of the American Association of Genito-Urinary Surgeons*, *54*, 116–25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13949131>
- Graham, B. S., Koup, R. a, Roederer, M., Bailer, R. T., Enama, M. E., Moodie, Z., ... Nabel, G. J. (2006). Phase 1 safety and immunogenicity evaluation of a multiclade HIV-1 DNA candidate vaccine. *The Journal of Infectious Diseases*, *194*(12), 1650–1660. <http://doi.org/10.1086/509259>
- Gupta, R., Griffin, P., Echenchang, J., Rivera, R., Anderson, R., & Rots, B. (1996). The role of adjuvant and delivery. Systems in modulation of immune response to vaccine. Novel strategies in design and production of vaccines. *New York: Plenum Press*, 105–13.
- Haimovitz-Friedman, A., & Kan, C. (1994). Ionizing radiation acts on cellular membranes to generate ceramide and initiate apoptosis. *The Journal of ...*, *180*(August), 525–535. Retrieved from <http://jem.rupress.org/content/180/2/525.abstract>
- Halloran, P. F. (2004). Immunosuppressive drugs for kidney transplantation. *The New England Journal of Medicine*, *351*(26), 2715–29. <http://doi.org/10.1056/NEJMra033540>
- Hanoux, V., Pairault, C., Bakalska, M., Habert, R., & Livera, G. (2007). Caspase-2 involvement during ionizing radiation-induced oocyte death in the mouse ovary. *Cell Death and Differentiation*, *14*(4), 671–81. <http://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402052>
- Hanson, W. R., Fry, R. J., Sallese, A. R., Frischer, H., Ahmad, T., & Ainsworth, E. J. (1987). Comparison of intestine and bone marrow radiosensitivity of the BALB/c and the C57BL/6 mouse strains and their B6CF1 offspring. *Radiation Research*, *110*(3), 340–52. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3588842>
- Herzog, C. (2015). Changing from whole-cell to acellular pertussis vaccines would trade superior tolerability for inferior protection. *Expert Review of Vaccines*, 1–8. <http://doi.org/10.1586/14760584.2015.1059759>
- Hodges, R. S., Heaton, R. J., Parker, J. M., Molday, L., & Molday, R. S. (1988). Antigen-antibody interaction. Synthetic peptides define linear antigenic determinants recognized by monoclonal antibodies directed to the cytoplasmic carboxyl terminus of rhodopsin. *The Journal of Biological Chemistry*, *263*(24), 11768–75. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2457026>

- Janeway, C. a, & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annual Review of Immunology*, 20(2), 197–216. <http://doi.org/10.1146/annurev.immunol.20.083001.084359>
- Kaiser, J. (2006). A one-size-fits-all flu vaccine? *Science (New York, N.Y.)*, 312(5772), 380–2. <http://doi.org/10.1126/science.312.5772.380>
- Kirchhoff, G., & Bunsen, R. (1861). Chemical analysis by spectrum-observations.—Second memoir. *Philosophical Magazine and Journal of Science*, 22(7), 329–349. Retrieved from http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14786446108643164?journalCode=tphm15#.VaSXz19_OIQ
- Kohlen, T. (1992). Immunomodulators. Future prospects. *Pharmacology Weebi*, 14, 24–52.
- Krízala, J., Kovárová, H., Stoklasová, A., & Ledvina, M. (1982). Superoxide dismutase levels in various radioresistant and radiosensitive tissues of irradiated rats. *Physiologia Bohemoslovaca*, 31(2), 151–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6212955>
- Lambert, L. C., & Fauci, A. S. (2010). Influenza vaccines for the future. *The New England Journal of Medicine*, 363(21), 2036–44. <http://doi.org/10.1056/NEJMra1002842>
- Lee, S., & Nguyen, M. T. (2015). Recent advances of vaccine adjuvants for infectious diseases. *Immune Network*, 15(2), 51–7. <http://doi.org/10.4110/in.2015.15.2.51>
- León Chavez, H. (2009). *Efecto del estrés agudo por restricción de movimiento en la producción de IgA y en el número de linfocitos T y B del NALT de ratones Balb/c.*
- Leroux-Roels, G. (2010). Unmet needs in modern vaccinology: adjuvants to improve the immune response. *Vaccine*, 28 Suppl 3, C25–36. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.021>
- Liu, Y., Wang, L., Fatahi, R., Kronenberg, M., Kalajzic, I., Rowe, D., ... Maye, P. (2010). Isolation of murine bone marrow derived mesenchymal stem cells using Twist2 Cre transgenic mice. *Bone*, 47(5), 916–25. <http://doi.org/10.1016/j.bone.2010.07.022>
- Lucas, C., & Bald, L. (1990). The autocrine production of transforming growth factor-beta 1 during lymphocyte activation. A study with a monoclonal antibody-based ELISA. *The Journal of ...*, 145(5), 1415–1422. Retrieved from <http://www.jimmunol.org/content/145/5/1415.short>
- McDonald, A. a., Kunz, M. D., & McLoon, L. K. (2014). Dystrophic changes in extraocular muscles after gamma irradiation in mdx:utrophin+/- mice. *PLoS ONE*, 9(1). <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0086424>
- McFarland, H. I., Puig, M., Grajkowska, L. T., Tsuji, K., Lee, J. P., Mason, K. P., ... Rosenberg, A. S. (2012). Regulatory T cells in γ irradiation-induced immune suppression. *PLoS ONE*, 7(6), 1–11. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0039092>

- Medzhitov, R. (2007). Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature*, 449(7164), 819–26. <http://doi.org/10.1038/nature06246>
- Meraviglia, S., El Daker, S., Dieli, F., Martini, F., & Martino, A. (2011). $\gamma\delta$ T cells cross-link innate and adaptive immunity in Mycobacterium tuberculosis infection. *Clinical & Developmental Immunology*, 2011, 587315. <http://doi.org/10.1155/2011/587315>
- Merck, M. T. (2011). Radiation Exposure and Contamination: Merck Manual Professional. Retrieved from [http://www.merckmanuals.com/professional/injuries_poisoning/radiation_exposure_and_contamination/radiation_exposure_and_contamination.html?qt=Radiation Exposure and Contamination&alt=sh](http://www.merckmanuals.com/professional/injuries_poisoning/radiation_exposure_and_contamination/radiation_exposure_and_contamination.html?qt=Radiation+Exposure+and+Contamination&alt=sh)
- Metz, B., Jiskoot, W., Hennink, W. E., Crommelin, D. J. A., & Kersten, G. F. A. (2003). Physicochemical and immunochemical techniques predict the quality of diphtheria toxoid vaccines. *Vaccine*, 22(2), 156–67. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14615142>
- Miller, J. F. A. P. (2002). The discovery of thymus function and of thymus-derived lymphocytes. *Immunological Reviews*, 185, 7–14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12190917>
- Mohan, T., Verma, P., & Rao, D. N. (2013). Novel adjuvants & delivery vehicles for vaccines development: A road ahead. *The Indian Journal of Medical Research*, 138(5), 779–795. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3928709/>
- National Institutes of Health. (2012). *Vaccine Types*. Retrieved from <http://www.niaid.nih.gov/topics/vaccines/understanding/pages/typesvaccines.aspx>
- Nichol, K., & Treanor, J. (2006). Vaccines for seasonal and pandemic influenza. *Journal of Infectious Diseases*, 146(4), 111–118. Retrieved from http://jid.oxfordjournals.org/content/194/Supplement_2/S111.short
- Nicholson, K. G., Colegate, A. E., Podda, A., Stephenson, I., Wood, J., Ypma, E., & Zambon, M. C. (2001). Safety and antigenicity of non-adjuvanted and MF59-adjuvanted influenza A/Duck/Singapore/97 (H5N3) vaccine: A randomised trial of two potential vaccines against H5N1 influenza. *Lancet*, 357(9272), 1937–1943. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)05066-2](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)05066-2)
- Olch, A. J., & Crooks, G. M. (2011). Effects of Sub-lethal Irradiation on Patterns of Engraftment after Murine Bone Marrow Transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant*, 17(5), 608–619. <http://doi.org/10.1016/j.bbmt.2010.12.697>.Effects
- Pandya, S., & Eichinger, K. (2012). Role of physical therapy in the assessment and management of individual with Myotonic Dystrophy. *Myotonic Dystrophy Foundation*, 24, 91–99.

- Parkin, J., & Cohen, B. (2001). An overview of the immune system. *Lancet*, 357(9270), 1777–89. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04904-7](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04904-7)
- Pasquale, A., Preiss, S., Silva, F., & Garçon, N. (2015). Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines*, 3(2), 320–343. <http://doi.org/10.3390/vaccines3020320>
- Petrovsky, N., & Aguilar, J. C. (2004). Special Feature Vaccine adjuvants : Current state and future trends. *Immunology and Cell Biology*, 82, 488–496. <http://doi.org/10.1111/j.1440-1711.2004.01272.x>
- Reber, A. J., Chirkova, T., Kim, J. H., Cao, W., Biber, R., Shay, D. K., & Sambhara, S. (2012). Immunosenescence and Challenges of Vaccination against Influenza in the Aging Population. *Aging and Disease*, 3(1), 68–90. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Immunosenescence+and+Challenges+of+Vaccination+against+Influenza+in+the+Aging+Population#0>
- Riese, P., Schulze, K., Ebensen, T., Prochnow, B., & Guzmán, C. A. (2013). Vaccine adjuvants: key tools for innovative vaccine design. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 13(20), 2562–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24066891>
- Rodríguez Cerón, M., Vacas Puertollano, Á., & Puertollano, E. (2014). Immunomodulatory ROle of Dietary Lipids in an Immunosuppressed Mouse Model and Infected with Listeria Monocytogenes, 30(4), 837–844. <http://doi.org/10.3305/nh.2014.30.4.7677>
- Rosenberg, I. (2008). Radiation Oncology Physics: A Handbook for Teachers and Students. *British Journal of Cancer*. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2266863/>
- Safari, D., Dekker, H. a T., Rijkers, G., & Snippe, H. (2011). Codelivery of adjuvants at the primary immunization site is essential for evoking a robust immune response to neoglycoconjugates. *Vaccine*, 29(4), 849–54. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.10.084>
- Segura-Velázquez, R., Pérez-Torres, A., Rosas, G., Toledo, A., Restelli, M., Acosta, E., ... Sciutto, E. (2006). A novel synthetic adjuvant effectively enhances the immunogenicity of the influenza vaccine. *Vaccine*, 24(8), 1073–80. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2005.09.014>
- Senthil Kumar, S. P. D., Shen, M., Spicer, E. G., Goudjo-Ako, A. J., Stumph, J. D., Zhang, J., & Shi, H. (2014). Distinct metabolic effects following short-term exposure of different high-fat diets in male and female mice. *Endocrine Journal*, 61(5), 457–70. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4045093&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
- Sheng-Tanner, X., Bump, E. A., & Hedley, D. W. (1998). An oxidative stress-mediated death pathway in irradiated human leukemia cells mapped using multilaser flow cytometry. *Radiation Research*, 150(6), 636–47. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9840183>
- Stites, D., Stogo, J., Fuderbarg, U., & Wule, V. (1985). *Inmunología básica y clínica*.

- Tang, H. L., Tang, H. M., Mak, K. H., Hu, S., Wang, S. S., Wong, K. M., ... Fung, M. C. (2012). Cell survival, DNA damage, and oncogenic transformation after a transient and reversible apoptotic response. *Molecular Biology of the Cell*, 23(12), 2240–2252. <http://doi.org/10.1091/mbc.E11-11-0926>
- Tepper, A. (1999). Ordering of ceramide formation, caspase activation, and mitochondrial changes during CD95- and DNA damage-induced apoptosis. *Journal of Clinical Investigation*, 103(7), 971–978. Retrieved from <http://www.jci.org/cgi/content/abstract/103/7/971>
- Thompson, M., Shay, D., & Zhou, H. (2010). Estimates of deaths associated with seasonal influenza—United States, 1976–2007. *MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report*, 59(33), 1976–2007. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Estimates+of+Deaths+Associated+with+Seasonal+Influenza+?+United+States+,+1976+?+2007#0>
- Trani, D., Moon, B.-H., Kallakury, B., Hartmann, D. P., Datta, K., & Fornace, A. J. (2013). Sex-dependent differences in intestinal tumorigenesis induced in Apc1638N/+ mice by exposure to γ rays. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 29(6), 997–1003. <http://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.08.021>. Secreted
- Tsujimoto, Y. (2001). Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes to Cells*, 3, 697–707. Retrieved from <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2443.1998.00223.x/full>
- Unterwiesing, M., Hoppes, D., Schima, F., & Coursey, J. (2011). Radionuclide half-life measurements. Retrieved from <http://www.nist.gov/pml/data/half-life.cfm>
- US Department of Health and Human Services. (2013). What are the treatments for muscular dystrophy? Retrieved July 21, 2015, from <https://www.nichd.nih.gov/health/topics/muscular-dys/conditioninfo/Pages/treatment.aspx>
- Vallejo, R., de Leon-Casasola, O., & Benyamin, R. (2004). Opioid therapy and immunosuppression: a review. *American Journal of Therapeutics*, 11(5), 354–65. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15356431>
- Verheij, M., & Bartelink, H. (2000). Radiation-induced apoptosis. *Cell and Tissue Research*, 301, 133–142. Retrieved from <http://www.springerlink.com/index/cjhj18x8byv25ffy.pdf>
- Wack, A., Baudner, B. C., Hilbert, A. K., Manini, I., Nuti, S., Tavarini, S., ... O'Hagan, D. T. (2008). Combination adjuvants for the induction of potent, long-lasting antibody and T-cell responses to influenza vaccine in mice. *Vaccine*, 26(4), 552–61. <http://doi.org/10.1016/j.vaccine.2007.11.054>
- Walzer, P. D., Runck, J., Steele, P., White, M., Linke, M. J., & Sidman, C. L. (1997). Immunodeficient and immunosuppressed mice as models to test anti-Pneumocystis carinii drugs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41(2), 251–258.

- Waterhouse, N. J., Finucane, D. M., Green, D. R., Elce, J. S., Kumar, S., Alnemri, E. S., ... Watters, D. J. (1998). Calpain activation is upstream of caspases in radiation-induced apoptosis. *Cell Death and Differentiation*, 5(12), 1051–61. <http://doi.org/10.1038/sj.cdd.4400425>
- Wichmann, O., Stocker, P., Poggensee, G., Altmann, D., Walter, D., Hellenbrand, W., ... Eckmanns, T. (2010). Pandemic influenza A(H1N1) 2009 breakthrough infections and estimates of vaccine effectiveness in Germany 2009-2010. *Euro Surveillance : Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*, 15(18), 1–4. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20460094>
- Wong, S.-S., & Webby, R. J. (2013). Traditional and new influenza vaccines. *Clinical Microbiology Reviews*, 26(3), 476–92. <http://doi.org/10.1128/CMR.00097-12>

ANEXO I

Anexo I Soluciones y concentración de anticuerpos utilizados

Soluciones utilizadas:

RPMI suplementado

Para 50 mL de medio RPMI (Cat. 22400 GIBCO)

5 mL de suero fetal bovino (Cat. 16000 GIBCO)

500 µL penicilina/estreptomicina (Cat. 15149-123 GIBCO)

500 µL L-glutamina

500 µL β-mercaptoetanol

NOTA: Preparar en cabina de seguridad.

Buffer de lisis de eritrocitos

2.08 g cloruro de amonio (NH_4Cl)

0.25 g bicarbonato de potasio (KHCO_3)

0.009 g ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)

Aforar con 250 mL de agua MiliQ, filtrar y esterilizar.

PBS 1X – Preparar a partir de PBS 10X

PBS 10X (pH = 7.2)

80 g cloruro de sodio (NaCl)

11.6 g fosfato dibásico de sodio (Na_2HPO_4)

2 g fosfato monobásico de potasio (KH_2PO_4)

2 g cloruro de potasio (KCl)

750 mL de agua MQ y ajustar pH a 7.2

Aforar a 1 L con agua MQ.

Filtrar y esterilizar

*PBS**

200 mL PBS 1X

10 mL de SFB Hyclone (5%)

0.2 g de azida de sodio (0.1%)

PBS-Formaldehido al 1%

1 mL de formaldehido al 37%

100 mL de PBS 1X

Anticuerpos:

Anti CD16-CD32 purificado (Cat. 553142 BD). Dilución 1:100 μ L de PBS*

Anti CD3-PE (Cat. 553064 BD). Dilución 2:100 μ L de PBS*

Isotipo PE Hámster IgG1k para CD3-PE. Dilución 0.5:100 μ L de PBS*

Anti CD19-PE (Cat. 553786 BD). Dilución 2:100 μ L de PBS*

Isotipo PE Rat IgG2ak para Anti CD19-PE [3]. Dilución 2:100 μ L de PBS*

Actinomicina se utilizó 1:100 μ L de suspensión.

Tabla de factor de decaimiento de decaimiento del Cs-137

Año\Mes	Enero	Febrero	Marzo	Abril	Mayo	Junio	Julio	Agosto	Septiembre	Octubre	Noviembre	Diciembre
2004	0.8060	0.8045	0.8029	0.8014	0.7998	0.7983	0.7968	0.7952	0.7937	0.7922	0.7907	0.7891
2005	0.7876	0.7861	0.7846	0.7831	0.7816	0.7801	0.7786	0.7771	0.7756	0.7741	0.7726	0.7711
2006	0.7696	0.7681	0.7667	0.7652	0.7637	0.7622	0.7608	0.7593	0.7579	0.7564	0.7549	0.7535
2007	0.7520	0.7506	0.7492	0.7477	0.7463	0.7448	0.7434	0.7420	0.7405	0.7391	0.7377	0.7363
2008	0.7349	0.7335	0.7320	0.7306	0.7292	0.7278	0.7264	0.7250	0.7236	0.7222	0.7209	0.7195
2009	0.7181	0.7167	0.7153	0.7139	0.7126	0.7112	0.7098	0.7085	0.7071	0.7057	0.7044	0.7030
2010	0.7017	0.7003	0.6990	0.6976	0.6963	0.6950	0.6936	0.6923	0.6910	0.6896	0.6883	0.6870
2011	0.6857	0.6843	0.6830	0.6817	0.6804	0.6791	0.6778	0.6765	0.6752	0.6739	0.6726	0.6713
2012	0.6700	0.6687	0.6674	0.6661	0.6649	0.6636	0.6623	0.6610	0.6598	0.6585	0.6572	0.6560
2013	0.6547	0.6534	0.6522	0.6509	0.6497	0.6484	0.6472	0.6459	0.6447	0.6434	0.6422	0.6410
2014	0.6397	0.6385	0.6373	0.6361	0.6348	0.6336	0.6324	0.6312	0.6300	0.6287	0.6275	0.6263
2015	0.6251	0.6239	0.6227	0.6215	0.6203	0.6191	0.6179	0.6168	0.6156	0.6144	0.6132	0.6120
2016	0.6108	0.6097	0.6085	0.6073	0.6062	0.6050	0.6038	0.6027	0.6015	0.6004	0.5992	0.5980
2017	0.5969	0.5957	0.5946	0.5935	0.5923	0.5912	0.5900	0.5889	0.5878	0.5866	0.5855	0.5844
2018	0.5833	0.5821	0.5810	0.5799	0.5788	0.5777	0.5766	0.5755	0.5743	0.5732	0.5721	0.5710
2019	0.5699	0.5688	0.5678	0.5667	0.5656	0.5645	0.5634	0.5623	0.5612	0.5602	0.5591	0.5580
2020	0.5569	0.5559	0.5548	0.5537	0.5527	0.5516	0.5505	0.5495	0.5484	0.5474	0.5463	0.5453
2021	0.5442	0.5432	0.5421	0.5411	0.5400	0.5390	0.5380	0.5369	0.5359	0.5349	0.5338	0.5328
2022	0.5318	0.5308	0.5297	0.5287	0.5277	0.5267	0.5257	0.5247	0.5236	0.5226	0.5216	0.5206
2023	0.5196	0.5186	0.5176	0.5166	0.5156	0.5147	0.5137	0.5127	0.5117	0.5107	0.5097	0.5087
2024	0.5078	0.5068	0.5058	0.5048	0.5039	0.5029	0.5019	0.5010	0.5000	0.4990	0.4981	0.4971

ANEXO III

Penetración de las radiaciones ionizantes en la materia viva (Bulbulian, 2008)

Radiaciones ionizantes son aquellas radiaciones con energía suficiente para ionizar la materia, extrayendo los electrones de sus estados ligados al átomo. A diferencia de la radiación directa, estas no liberan partículas alfa ni beta, únicamente partículas gama. Las partículas gama son las que contienen una carga energética mayor entre las tres. Esta característica les permite atravesar libremente cualquier cuerpo a excepción del plomo. Los rayos gamma interactúan con los átomos de la materia con tres mecanismos distintos:

Absorción fotoeléctrica: es una interacción en la que el fotón gamma incidente desaparece. En su lugar, se produce un fotoelectrón de una de las capas electrónicas del material absorbente con una energía cinética procedente de la energía del fotón incidente, menos la energía de ligadura del electrón en su capa original.

Efecto Compton: es una colisión elástica entre un electrón ligado y un fotón incidente, siendo la división de energía entre ambos dependiente del ángulo de dispersión.

Producción de pares: el proceso ocurre en el campo de un núcleo del material absorbente y corresponde a la creación de un par electrón (positrón) en el punto en que desaparece el fotón gamma incidente. Debido a que el positrón es una forma de antimateria, una vez que su energía cinética se haga despreciable se combinará con un electrón del material absorbente, aniquilándose y produciendo un par de fotones.

Si bien los neutrones interactúan con los núcleos de la materia orgánica mediante los tres mecanismos mencionados, al terminar la estimulación de la fuente radioactiva, la liberación de partículas gama cesa y por tanto cualquier daño secundario que se pueda generar.

Los remanentes de rayos gama dentro del irradiador rebotan hasta que son energéticamente neutralizados por las partículas del entorno circundante, garantizando que no hay ningún tipo de contaminación al medio, ni daño al investigador.