

53
Lej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

DIVISION DE INVESTIGACION BASICA DEL
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGIA

“Ontogenia de los linfocitos T en la rata”

T E S I S

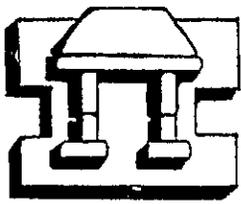
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

MARIA DEL ROCIO MORALES BARCENAS

DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE A. REYES ESPARZA



IZTACALA

LOS REYES IZTACALA, EDO. MEX.

1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

02 10 01



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS
PROFESIONALES IZTACALA
JEFATURA DE BIOLOGIA

Los Reyes Iztacala, 28 de IX de 1999

DR. FELIPE TIRADO SEGURA
DIRECTOR
PRESENTE.

Atención Lic. América Landa Romero
Jefa de la Unidad de Administración Escolar

Los abajo firmantes miembros de la Comisión Dictaminadora del trabajo de

(X) Tesis de Investigación

Tesis de Experiencia Profesional ()

Titulado: "Ontogenia de los linfocitos T en la rota"

Registrado en la jefatura de carrera con fecha 22/X/97

Que presenta el (la) pasante de Biología MARIA DEL ROCIO MORALES BARCENAS

No Cuenta: 9461935-7

Para obtener el título de biólogo (a).

Informan que después de haber revisado cuidadosamente el trabajo y considerando las características de calidad académica que se requieren para aspirar a la obtención del grado citado, acreditan el trabajo escrito y dan su Voto aprobatorio para la presentación del examen profesional correspondiente.

GRADO	NOMBRE	FIRMA	CARGO
M EN C	MARTHA O. SALCEDO ALVAREZ	<i>[Firma]</i>	Presidente
DR.	JORGE A. REYES ESPARZA	<i>[Firma]</i>	Vocal
M C	RAFAEL JIMENEZ FLORES	<i>[Firma]</i>	Secretario
BIOLOGO	DAVID GONZALEZ PANTALEON	<i>[Firma]</i>	Suplente
DR.	MARTIN PALOMAR MORALES	<i>[Firma]</i>	Suplente

Con base en lo anterior, solicita su autorización para que los profesores que otorgan el Voto aprobatorio funjan como SINODALES del Examen Profesional en el cargo anotado, y a la Administración Escolar, otorgue fecha para la Réplica Oral del trabajo presentado.

Atentamente,
"Por mi raza hablara el espíritu"

M en C. Sergio Vaca Pacheco,
Jefe de la Carrera d Biología

VoBo Director del Plantel

*La lucha por saber es uno de los dramas
más excitantes de la vida, y todo aquel que
ha tratado de aprender algo, ha sido actor de
ese drama en cierta medida.*

Richard R. Powel

DEDICATORIAS

A mi mamá Tere

*Por ser mi mejor amiga dándome
tu gran ejemplo y cariñosa
comprensión, brindándome siempre
tus consejos y apoyo que me han impulsado
hacia metas superiores.*

A mi papá David

*Aunque estés lejos, gracias por
brindarme tu apoyo en todo
momento e impulsarme siempre a
ser mejor.*

A mis hermanos David, Héctor, Daniel y Vladimir

*Por ser siempre un ejemplo de preparación
constante para enfrentarme a la vida.*

A mis sobrinos Arturo, Lupe Y Elizabeth

*Por ser siempre un motivo de alegría
y brindarme una sonrisa en todo
momento.*

A Pablo

*Por la amistad y el amor que siempre me has
demostrado, por tu apoyo desinteresado y por
estar conmigo en los momentos más difíciles
alentándome siempre a seguir adelante.*

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó en la división de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología bajo la dirección del Dr. Jorge Reyes a quien le quiero agradecer haberme permitido realizar este trabajo.

A la M. en C. Ana María Espinosa por su valiosa orientación y asesoría en el desarrollo experimental de éste trabajo.

A la Dra. Emma Verástegui por su asesoría y apoyo académico así como por darme la oportunidad de superarme profesionalmente.

A mis compañeros de laboratorio Bertha y Rafael que aunque casi no nos tratamos el trabajo era menos tedioso.

A mis amigas de Biología Claudia, Adriana, Aída, Beatriz y en especial a Silvia por brindarme su amistad y que aunque ya casi no nos vemos sé que cuento con ustedes.

A mis compañeras de Inmunología Beatriz, Emmy y Ma. De Jesús de quienes he aprendido muchas cosas buenas y malas, así como por hacerme reír y enojar en algunos momentos.

ÍNDICE

PÁGINA

ABREVIATURAS

RESUMEN	1
---------	---

I.- INTRODUCCIÓN

1.- Sistema inmune	3
--------------------	---

1.1.- Tipos de inmunidad	3
--------------------------	---

1.1.1. Inmunidad inespecífica	3
-------------------------------	---

1.1.2. Inmunidad específica	4
-----------------------------	---

1.2.- Órganos linfoides	4
-------------------------	---

1.3.- Células linfoides	6
-------------------------	---

1.3.1.- Linfocitos B	6
----------------------	---

1.3.2.- Linfocitos T	6
----------------------	---

1.4 - Respuesta inmune	8
------------------------	---

1.4.1 - Características de la respuesta inmune	8
--	---

2.- El timo	9
-------------	---

2.1.- Histología	9
------------------	---

2.1.1. Estructura del timo	9
----------------------------	---

corteza y médula	10
------------------	----

2.2.- Ontogenia del timo	13
--------------------------	----

2.3.- Funciones del timo	15
--------------------------	----

2.3.1. Función inmune	15
-----------------------	----

2.3.2. Función endócrina	16
--------------------------	----

2.4. Involución del timo	17
--------------------------	----

2.4.1. Involución relacionada con la edad	17
---	----

2.4.1.1. Características de la involución	18
---	----

2.4.2 Involución accidental	19
-----------------------------	----

3 - Células linfoides del timo	21
--------------------------------	----

3.1 Origen de las células T	21
-----------------------------	----

3.2. Receptor de células T (TCR)	22
----------------------------------	----

3.3. Expresión de CD4 y CD8	24
3.4. Desarrollo de linfocitos T	26
3.5. Selección celular	29
II.- OBJETIVOS	
1 - Objetivo general	32
2.- Objetivos particulares	32
III.- MATERIAL Y MÉTODOS	
1.- Animales	33
2.- Aislamiento de timocitos	33
3.- Preparación del gradiente de percoll	34
4.- Ontogenia del timo	34
5.- Citometría de flujo	35
5.1. Análisis de la expresión de antígenos CD4 y CD8	35
5.2. Análisis de ciclo celular	36
5.3. Análisis de apoptosis	38
6 - Análisis estadístico	39
7 - Diagrama de flujo	40
IV - RESULTADOS	
1.- Ontogenia del timo	41
1.1. Peso del timo	41
1.2. Relación peso timo/peso corporal	42
1.3. Cantidad total de timocitos	43
1.4. Relación timocitos/ mg. Peso timo	44
2.- Caracterización fenotípica de timocitos	45
2.1. Expresión de antígenos CD4 y CD8 en timocitos fetales	45
2.2. Expresión de antígenos CD4 y CD8 en timocitos de ratas de distintas edades	47
3.- Análisis de ciclo celular	48

4.- Análisis de apoptosis	49
5.- Distribución de timocitos en el gradiente de percoll	50
V.- DISCUSIÓN	51
VI.- CONCLUSIONES	67
VII.- ANEXO	68
VIII.- BIBLIOGRAFÍA	80

ABREVIATURAS

ACTH	Hormona adercorticotrófica.
Ag.	Antígeno
BcR	Receptor de células B.
CD	Grupos de diferenciación celular.
DN	Dobles negativas.
DP	Dobles positivas.
FITC	Isotiocianato de fluoresceína.
FL	Fluorescencia (1, 2, 3).
FSC	Tamaño.
HSA	Antígeno estable al calor.
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleucina.
IP	Ioduro de propidio.
LTC	Linfocitos T citolíticos.
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad.
NK	Células naturales asesinas
PBS	Amortiguador de fosfatos salinos.
R.I.	Respuesta inmune.
RN	Recién nacidas
RPE	Ficoeritrina
7-AAD	7 Aminoactinomicina
SP	Simplex positivas.
SSC	Granularidad
Tc	Linfocitos T citotóxicos
TcR	Receptor de células T
TdT	Enzima desoxinucleotidiltransferasa terminal
TDTH	Linfocitos T de hipersensibilidad retardada
Th	Linfocitos T cooperadores
Ts	Linfocitos T supresores

R E S U M E N

Durante el proceso de maduración de los timocitos se presentan una serie de eventos controlados por el estroma tímico, como son el rearrreglo de genes del Receptor de Células T (TCR), alteraciones fenotípicas y modificaciones bioquímicas. El estudio del proceso de diferenciación y maduración de los linfocitos T se basa principalmente en la expresión de los correceptores CD4 y CD8 por los prelinfocitos. Estas células tímicas se dividen en cuatro poblaciones celulares: células dobles negativas (CD4-CD8-), células dobles positivas (CD4+CD8+), células simples positivas CD4+ y simples positivas CD8+, además éstas últimas expresan el receptor de células T (TCR).

En éste trabajo se estudió la ontogenia de los linfocitos T en la rata, en base a la expresión de los correceptores CD4 y CD8; la proliferación celular, y la apoptosis celular, mediante citometría de flujo. Timocitos de ratas de distintas edades fueron estudiados haciéndolos pasar por un gradiente continuo de Percoll, se marcaron con anticuerpos monoclonales anti-CD4 y anti-CD8 combinados con isotiocianato de fluoresceína (FITC) y ficoeritrina (RPE) respectivamente para analizar la expresión de los antígenos mencionados. Para la identificación de la apoptosis se marcaron con 7-aminoactinomicina D (7-AAD); para medir el contenido de ADN y ciclo celular se marcaron con Ioduro de Propidio (IP), finalmente fueron analizados por citometría de flujo de dos colores.

En los resultados obtenidos se observó que el primer correceptor en expresarse es el CD4, el cual se detecta a partir de los 15 días de gestación, en aproximadamente el 40% de las células. A partir de los 17 días de gestación se detecta la expresión del correceptor CD8, tanto en células dobles positivas (CD4+CD8+) en un 30%; como simples positivas (CD8+) en un 18%. Por lo que a ésta edad ya se observan en la rata las 4 poblaciones detectadas en el adulto. En el día 19 de gestación se observa un incremento de las células dobles positivas, así como una disminución de las células simples positivas; al nacimiento las poblaciones de linfocitos ya tienen las proporciones del animal adulto. Se observó que la mayor proporción de células en proliferación se da en los últimos días de la gestación (17-20), y ésta actividad permanece alta aún durante la primera semana de vida extrauterina; a partir de los 15 días de edad se alcanzan los niveles de proliferación celular del adulto. Se

observó además que el fenómeno apoptótico es mayor en las primeras etapas del timo, días 15 y 17 de gestación, coincidiendo con el inicio de la expresión de los correceptores CD4 y CD8. A partir del día 19 alcanza los niveles que estarán presentes en el adulto, aunque se observan pequeñas variaciones

I. - INTRODUCCIÓN

1. - Sistema inmune:

Nuestro medio ambiente contiene una gran variedad de agentes que nos pueden afectar, como virus, bacterias, hongos, helmintos, etc los cuales nos pueden provocar alguna infección ó enfermedad. Para enfrentar todos estos agentes, los vertebrados superiores desarrollaron un sistema capaz de disminuir el desarrollo de la enfermedad, este sistema es el sistema inmune. Este sistema proporciona de manera rápida y específica protección, reconocimiento, discriminación y defensa contra agentes extraños, como microorganismos, además de sus constituyentes ó secreciones naturales; y así mismo contra células propias transformadas (Paul, 1998, Weissman y Cooper, 1993).

1.1 Tipos de inmunidad:

El sistema inmune es un sistema complejo que incluye la participación de una gran cantidad de células y factores solubles que interaccionan entre ellos para conformar un sistema biológico de defensa. La respuesta biológica defensiva frente a la agresión de microorganismos ó toxinas que tienden a lesionar tejidos u órganos del organismo se ha clasificado en dos tipos de respuesta. inespecífica ó innata (inflamatoria y natural); y la específica (adaptativa). (Craps *et al*, 1993).

1.1.1 Inmunidad inespecífica:

La respuesta inflamatoria y la natural forman parte de la inmunidad innata ó inespecífica, la cual se caracteriza por la ausencia de reconocimiento específico de un antígeno dado y por la ausencia de memoria inmunológica para el mismo. Este tipo de defensa está constituido por las barreras físicas (piel y mucosas), y barreras químicas (pH ácido, secreción de lisozimas, etc), además de una barrera biológica compuesta por células

que se encargan de eliminar los agentes agresores, sin necesidad de reconocimiento específico para el antígeno. Estas células son los macrófagos, eosinófilos, basófilos, monocitos, células naturales asesinas (NK), así como varias moléculas circulantes como el complemento. Estas células poseen la capacidad para distinguir lo propio de lo extraño sin necesidad de mecanismos complejos, lo que implica una ausencia de memoria superior para el mismo antígeno dado (Paul, 1998)

1.1.2 Inmunidad específica:

La inmunidad específica o adaptativa se caracteriza principalmente por la necesidad de reconocimiento específico y la presencia de memoria inmunológica, y depende generalmente de la producción de anticuerpos y linfocitos activados. En este tipo de inmunidad participan los linfocitos B y T. Se clasifica en dos tipos de acuerdo a la función de los componentes del sistema inmune: Inmunidad humoral e Inmunidad celular (Craps *et al*, 1993).

La inmunidad humoral está mediada por anticuerpos o inmunoglobulinas producidos por células plasmáticas (linfocitos B transformados). Los linfocitos B ante una estimulación antigénica y la mayoría de las veces con la colaboración de linfocitos T cooperadores, van a transformarse en células plasmáticas, que secretan anticuerpos específicos contra el antígeno activador.

La inmunidad celular está mediada por células T, que llegan a tener contacto con el antígeno y actúan por citotoxicidad directa (CD8+) o liberación de mediadores químicos inespecíficos (CD4+) (citocinas) (Paul, 1998 y Abbas *et al*, 1995).

1.2 Órganos Linfoides:

Para poder llevar a cabo la inmunidad específica en un organismo hace falta que las células se encuentren concentradas y organizadas en tejidos y órganos, los cuales son

lugares óptimos para el crecimiento, diferenciación de dichas células, inicialización, regulación y realización de la respuesta inmune (R.I.). Los órganos linfoides se clasifican basándose en su función como: órganos linfoides primarios ó centrales y órganos linfoides secundarios ó periféricos.

Los órganos primarios ó centrales son el timo, la médula ósea, y en el caso de las aves la bursa de Fabricio, son aquellos en los que se llevan a cabo el proceso de maduración y diferenciación de los linfocitos.

Los órganos linfoides secundarios ó periféricos, comprenden el bazo, los ganglios linfáticos, las amígdalas, las placas de Peyer, las adenoides y el apéndice. Estos son los órganos donde los linfocitos maduros van a anidar, y reconocer los antígenos extraños, además de que ahí se van a llevar a cabo las respuestas inmunes (Adkins, *et al*, 1987; Zambrano, 1994 y Abbas *et al*, 1995). (Fig. 1)

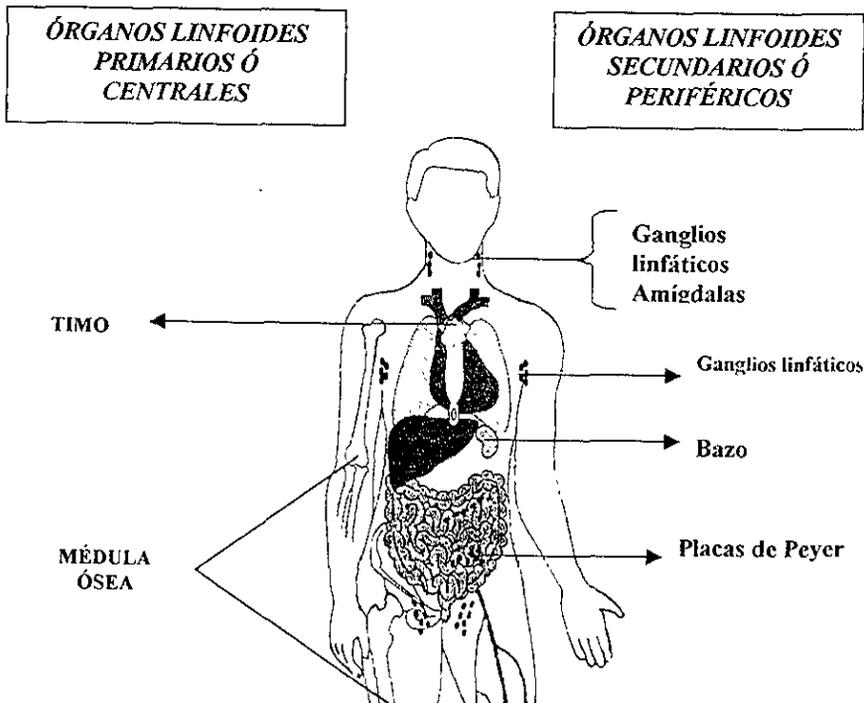


Fig. 1. - Esquema del sistema linfático humano. Se muestran los órganos primarios ó centrales y los órganos secundarios ó periféricos. Modificado de Craps y Basle (1993).

1.3 Células linfoides:

Las células efectoras de la respuesta inmune son los linfocitos. Los linfocitos ocupan el papel central debido a que son las células que determinan las respuestas de inmunidad específica, además de que son las únicas células del cuerpo capaces de reconocer y distinguir de forma específica diferentes determinantes antigénicos, y así mismo responder en conjunto con los otros miembros del sistema inmune (Tórtora y Anagnostakos, 1989; Abbas *et al*, 1995). Los linfocitos se dividen en dos poblaciones principales, una de ellas llamada linfocitos B y la otra linfocitos T.

1.3.1 Linfocitos B:

Los linfocitos B son las células precursoras de las células plasmáticas, las cuales son las que secretan los anticuerpos, y por tanto tienen las funciones de inmunidad humoral. Se originan en la médula ósea y en el hígado fetal. Se caracterizan por expresar en su superficie el Receptor de células B (BcR), mejor conocido como inmunoglobulinas (Igs). Inicialmente expresan IgM-IgD en etapas independientes de antígenos, y posteriormente en fases dependientes cambian de clase (Craps *et al*, 1993)

1.3.2. Linfocitos T:

Los linfocitos T son células que se encargan de la inmunidad celular, y se diferencian en el timo. Dentro de los linfocitos T existen diversas subpoblaciones, cada una con una función determinada, entre ellas se encuentran los linfocitos cooperadores (Th) y linfocitos citotóxicos (Tc) Los linfocitos Th tienen la función principal de regular la respuesta inmune; se subdividen de acuerdo al tipo de citocinas que secretan en Th₀, Th₁ y Th₂; la otra subpoblación son los linfocitos Tc, que se encargan de regular negativamente la respuesta, evitando que el sistema inmune específico sea nocivo contra el propio organismo. Los linfocitos T participan en el rechazo de aloinjertos, inmunovigilancia contra células malignas y resistencia del huésped a las infecciones por virus, hongos, micobacterias y protozoarios

(Adkins *et al*, 1987, Paul, 1998); se encargan de patógenos intracelulares (virus) y parásitos intracelulares, secretan citocinas cuya función es promover la proliferación y diferenciación de ellas mismas, así como otras células incluyendo las células B y los macrófagos, además de actuar como agentes citotóxicos. (Grey *et al*, 1986, Weissman y Cooper, 1993).

Todas las células que conforman la respuesta biológica defensiva tienen su origen en la médula ósea, a partir de la proliferación y diferenciación de unas células pluripotenciales denominadas células madre ó tronco hematopoyéticas. Así los precursores de los linfocitos T emigran hacia el timo, y de ahí salen y migran hacia los órganos linfoides secundarios, donde después de ser activados maduran a células T activadas o linfocitos irritativos. Los linfocitos B maduran en la misma médula ósea y posteriormente a su maduración migran también hacia los órganos linfoides secundarios, donde ocurre su maduración definitiva a células plasmáticas o linfocitos de memoria, gracias a estimulaciones antigénicas llevando a cabo la respuesta inmune específica (Davis, 1990)

Para poder distinguir entre linfocitos T y B se llevaron a cabo diversos experimentos, en uno de ellos se utilizó a las aves, principalmente al pollo como primer modelo experimental. Estos animales presentan un órgano linfoide denominado bursa de Fabricio. En éste órgano se realiza la maduración de los linfocitos B, función similar a la que se lleva a cabo en el timo con los linfocitos T.

La extirpación de la bursa de Fabricio produjo ausencia de linfocitos B, y se pudo entonces deducir que la bursa de Fabricio en el pollo podría cumplir la función que realiza la médula ósea en humanos. Se observó que la extirpación del timo produce deficiencia de células T tanto en aves como en mamíferos (Adkins *et al*, 1987, Weissman y Cooper, 1993).

Debido a que no ha quedado aclarado éste punto, se ha tratado de identificar el equivalente de éste órgano en mamíferos, se han estudiado el apéndice, las placas de Peyser, la médula ósea, el bazo e hígado; pero aún no queda clara ésta semejanza, y probablemente es solo en las aves donde se presenta éste órgano por cuestiones evolutivas (Burnet, 1962)

1.4. Respuesta Inmune

La respuesta inmune específica se inicia con el reconocimiento de los antígenos extraños por linfocitos específicos, cuya función es eliminar al antígeno. Este reconocimiento produce que estas células se activen, por lo que proliferan y se diferencian (Craps *et al*, 1993)

1.4.1. Características de la respuesta inmune:

Las características de la respuesta inmune son: especificidad, memoria, autolimitación y discriminación entre lo propio y lo extraño. Estas cuatro características son necesarias para que el sistema inmune efectúe sus funciones de defensa del huésped.

La especificidad y la memoria capacitan al sistema inmune para llevar a cabo respuestas específicas frente a una estimulación persistente ó repetida por el mismo antígeno, y de ésta manera combatir las infecciones prolongadas ó repetidas.

La diversidad es importante si el sistema inmune va a defender al organismo contra muchos patógenos potenciales del ambiente. La autolimitación permite al sistema volver a su estado de reposo tras la eliminación del antígeno extraño, capacitándose así para responder de forma óptima a otros antígenos con los que el organismo se enfrente.

La autotolerancia y la capacidad de distinguir entre lo propio y lo extraño son necesarias para evitar reacciones contra las células y tejidos propios, mientras se mantiene un repertorio de linfocitos específicos para antígenos extraños (Stites *et al*, 1996; Zambrano, 1994 y Fitch *et al*, 1993)

2.- El timo

El timo es el primer órgano linfoide en aparecer después de la médula ósea durante la vida embrionaria. Su maduración y mayor actividad funcional se llevan a cabo durante la vida embrionaria y fetal. El timo participa en la diferenciación celular de los linfocitos T, modulando la transformación de los prolinfocitos que llegan a él (células pre-tímicas) en linfocitos T funcionales (células pos-tímicas) e influyendo sobre ellos después de que han salido del mismo hacia los órganos linfoides secundarios, posiblemente a través de factores humorales (Adkins *et al*, 1987). En el timo se lleva a cabo el proceso de maduración y diferenciación de los linfocitos T responsables de la inmunidad celular.

El timo se encuentra localizado en la parte anterior y superior del mediastino, por detrás del manubrio del esternón y delante del corazón y los grandes vasos (Burnet, 1962; Zambrano, 1994; Haynes *et al*, 1998). Está formado por dos lóbulos envueltos por una cápsula de tejido conjuntivo denso. Cada lóbulo está constituido por un cordón central de parénquima que emite prolongaciones que penetran a los lóbulos y los divide en lobulillos. Cada lobulillo está formado por una zona periférica de tejido linfoide denso, denominada **zona cortical**, la cual es relativamente rica en linfocitos, y una zona central de tejido difuso de células epiteliales, que es la **zona medular** (Adkins *et al*, 1987; Cormack, 1988; Paul, 1998)

2.1 HISTOLOGÍA DEL TIMO

2.1.1 Estructura del timo:

El timo se encuentra envuelto por una cápsula delgada de tejido conectivo. El tejido conectivo que penetra en el timo separa a los lóbulos y los lobulillos formando un sistema de tabiques y trabéculas. El timo se encuentra constituido por diversos tipos celulares, entre los cuales se encuentran las células reticuloepiteliales, macrófagos, células adiposas,

mastocitos, fibroblastos, eosinófilos, y los linfocitos, que son las células más abundantes y las que ocupan el papel central del funcionamiento del órgano (Cormack, 1988). (Fig. 2).

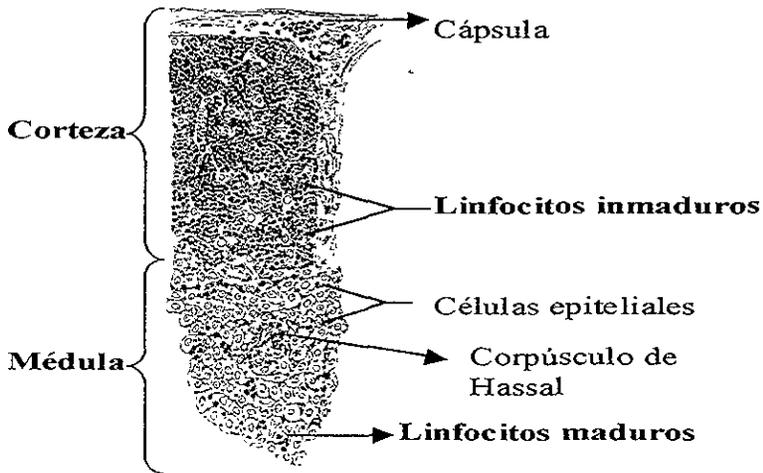


FIG. 2. - Representación esquemática de la estructura del lóbulo tímico. Se observa claramente que la corteza se encuentra muy infiltrada por linfocitos inmaduros, mientras que en la médula hay una menor cantidad de linfocitos, pero ya maduros. Modificado de Cormack (1988).

Desde el punto de vista histológico el timo se divide en dos zonas claramente delimitadas: la cortical y la medular:

Corteza: En la zona cortical del timo se distinguen tres zonas: la cortical subcapsular, la cortical profunda y la cortical yuxtamedular (Zambrano, 1994); la corteza se encuentra constituida por una densa población de linfocitos y de células epiteliales, que son poco abundantes y presentan prolongaciones muy finas debido a la poca distinción que se forma por el acumulo de linfocitos. Las células reticulares se encuentran muy escasas en el timo fetal y en la parte superficial de la corteza, pero conforme va aumentando la edad, la

cantidad de éstas células aumenta, principalmente en las partes corticales profundas del lobulillo (Adkins *et al*, 1987, Paul, 1998; Haynes *et al*, 1998).

Se localizan macrófagos en pequeña proporción, pero estos son constantes de la población celular de la corteza. Se encuentran diseminados por la corteza y aumentan en número en la frontera entre la médula y la corteza, ésto en la mayoría de los mamíferos a excepción del ratón (Adkins *et al*, 1987).

Los linfocitos que aquí se encuentran son células básicamente inmaduras, y es ahí donde se lleva a cabo su proceso de diferenciación y maduración; después de ello pasan hacia la médula, únicamente los linfocitos que han madurado (Aspinall *et al*, 1991). Se menciona que más del 95% de las células que se encuentran en la corteza mueren antes de llegar a la médula; ésto se puede deber probablemente a los procesos de selección, que conservan una minoría de células T en desarrollo que expresen el receptor de células T (TCR) específico frente a antígenos extraños (Abbas *et al*, 1995). En la corteza es donde se lleva a cabo la mayor actividad linfocitaria particularmente durante la etapa fetal y neonatal.

La mayor parte de la población celular de la corteza se encuentra constituida por linfocitos. Se pueden encontrar linfocitos pequeños medianos y grandes dependiendo de la zona y madurez en que se encuentren. En la zona cortical subcapsular se encuentran predominando los linfocitos grandes e inmaduros que comprenden alrededor del 5 al 15% del total de las células linfoides del timo. En la zona cortical profunda predominan los linfocitos pequeños y constituyen alrededor del 85% del total de las células linfoides del timo (Aspinall *et al*, 1991; Zambrano, 1994). En la corteza tímica es posible encontrar con frecuencia linfocitos en división junto a linfocitos que están experimentando muerte celular por apoptosis.

Médula: La parte medular conforma la zona central del timo, se encuentra constituida por una población más dispersa de linfocitos medianos debido a que en ella solo se van a encontrar linfocitos maduros que han emigrado de la corteza, y que están listos para

salir del timo y encaminarse hacia los tejidos linfoides periféricos (Adkins *et al*, 1987; Paul, 1998). La médula contiene una gran cantidad de células epiteliales, posee numerosos vasos sanguíneos, de los cuales se observan fibras de colágenas y reticulares que se encuentran entre las células epiteliales; los macrófagos son raros en la médula, se pueden encontrar granulocitos como eosinófilos en pequeñas cantidades, se pueden localizar también melanocitos, plasmocitos y mastocitos

Tanto en la médula como la corteza se encuentran localizadas células retículo epiteliales ó epiteliales clásicas ó del tipo I; existen otros tipos de células epiteliales llamadas epiteliales alveolares del tipo II las cuales únicamente se encuentran en la médula tímica; y las células epiteliales con cavidad intracitoplásmica de tipo III, las cuales son raras y se encuentran solo en la médula (Ewijk, 1991). Estos tipos celulares se encuentran asociados formando dos estructuras en el timo, una son las cavidades quísticas y la otra son los corpúsculos de Hassal, las primeras se cree que sirven como indicadores en la trayectoria de los linfocitos entre la corteza y la médula, durante los procesos de maduración (Adkins *et al*, 1987). En el centro de los corpúsculos de Hassal se han llegado a observar macrófagos y linfocitos muertos en forma apretada y concentrada, lo que sugiere que ésta estructura participa en la remoción de células muertas, éstas células se hinchan, queratinizan, calcifican y necrosan, algunas pueden experimentar lisis y posteriormente formar una estructura quística (Adkins *et al*, 1987, Zambrano, 1994) Conforme un individuo sea mayor de edad, los corpúsculos del timo se tornan cada vez más grandes y pueden llegar a transformarse en grandes estructuras

En la médula se localizan alrededor de un 15% de la población linfoide del timo. Se menciona que aproximadamente 2×10^6 de células mueren o son exportadas por día. Estas células son reemplazadas por células importadas desde la corteza y posiblemente por la proliferación interna, la cual ocurre a bajos niveles, en un intervalo de 2-5% (Scollary, *et al*, 1995, Haynes *et al*, 1998)

2.2. ONTOGENIA DEL TIMO:

En el humano alrededor de la quinta semana de vida intrauterina se forma una evaginación de la porción ventral del tercer par de arcos faríngeos que llevan a la formación de los primordios del timo. Estos se separan de la pared faríngea alrededor de la sexta semana de vida embrionaria, y se dirigen hasta la porción superior y anterior del tórax, donde se unen constituyendo el timo, esto es alrededor de la séptima semana de gestación en el humano, lo que coincide con el día 11 de gestación en el ratón (Burnet, 1962; Mandel y Kennedy, 1978; Ewijk, 1991 y Paul, 1998)

Cada evaginación se caracteriza por poseer una proliferación de células epiteliales de las cuales se derivan las células reticulares; esto sucede alrededor del segundo mes de gestación en el humano. En esta etapa se diferencia la médula de la corteza tímica. A los 10 y 11 días de gestación en el ratón, se da la colonización de las células progenitoras, se forman las células epiteliales a partir del ectodermo y endodermo de la tercera hendidura y arcos faríngeos respectivamente; formándose al mismo tiempo los lobulillos separados por tabiques de tejido conectivo (Adkins *et al*, 1987). Hacia la primera mitad de la vida fetal hacen su aparición los corpúsculos de Hassall; a los 13 días de gestación los primordios tímicos son divididos en corteza y médula, y para el día 14 de gestación hacen su aparición los fagocitos mononucleares, y los microambientes estromales también son organizados siendo fenotípicamente maduros en esta etapa del desarrollo fetal (Cormack, 1988).

En embriones humanos de unos 10 mm de longitud, se observa un timo rudimentario, que aparece como una delgada prolongación tubular, extendida desde la tercera bolsa branquial hacia abajo y hacia la línea media, la porción intermedia del divertículo del timo que representa la conexión con la faringe desaparece al llegar a los 35 mm de longitud dejando libre la porción terminal en la región del mediastino. Cuando llega a los 40 mm de longitud el embrión adopta una disposición lobulada, y a los 60 a 70 mm de longitud comienzan a aparecer los corpúsculos tímicos (Cormack, 1988)

Penit y Vasseur (citado por Ewijk, 1991) han mostrado que en el ratón ocurren dos etapas que definen el período de crecimiento del timo. La primera ocurre antes del nacimiento entre el día 13 y 18 de gestación, y la segunda ocurre a los 3-6 días después del nacimiento. En el ratón se ha visto que a los 11 días de gestación el timo aparece, y es rápidamente colonizado por células inmigrantes. En el treceavo día de gestación en los ratones claramente se distingue el timo en el que cada lóbulo contiene alrededor de 20,000 células, incrementándose a 40,000 en el catorceavo día de gestación. A partir de los 18 días de gestación la proliferación es prácticamente idéntica que en los ratones adultos (Nicolic-Zugic, 1991; Mandel y Kenedy, 1992 y Paul, 1998) Cabe mencionar que para que se lleve a cabo la proliferación celular parece ser necesaria la presencia intacta del microambiente tímico adecuado para que haya generación de células T inmunológicamente competentes. (Fig. 3)

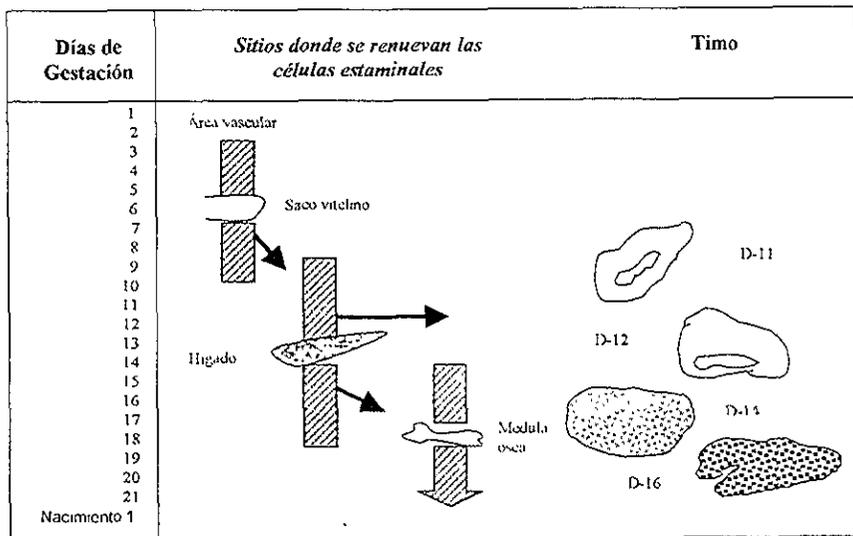


Fig. 3. - ONTOGENIA DEL TIMO EN EL RATÓN. Se muestra el desarrollo del timo desde la etapa embrionaria, hasta el momento del nacimiento. Modificado de Bach (1994).

2.3. FUNCIONES DEL TIMO

Las funciones del timo incluyen una serie de compromisos bioquímicos y biológicos que inducen la selección en el desarrollo de las poblaciones de timocitos y células T maduras (Adkins *et al*, 1987).

2.3.1 Función inmune

Si bien la existencia del timo desde el punto de vista anatómico es conocida desde el tiempo de los griegos, es hasta principios del siglo XX que numerosas investigaciones mostraron el papel central del timo en el desarrollo del sistema inmune (Nicolic-Zugic, 1991).

En 1909 se vio que el timo es importante para la protección en contra de las infecciones, puesto que las enfermedades son más severas en animales que han sido timectomizados. Para 1911 y 1930 se estableció que las ratas timectomizadas presentaban una baja resistencia a la recepción de trasplantes, pero al remover otras glándulas como los testículos aumentaba esta resistencia (Cardarelli, 1989).

En 1960 Jacques Miller y Osoba (citado por Anderson *et al*, 1996) mostraron que la extirpación del timo en roedores con 1 ó 2 días después del nacimiento provoca una considerable disminución de los linfocitos circulantes y como consecuencia una deficiencia en la generación de la respuesta inmune en contra de agentes infecciosos así como el rechazo de injertos, por lo que se vio que la presencia e influencia del timo normal durante el último periodo de la vida fetal, así como en la etapa neonatal es muy importante debido a que en esas etapas comienza el proceso de maduración de los linfocitos T, y además se tiene una mayor actividad; aquí el individuo va a adquirir los mecanismos que le permitan contar con una inmunidad adecuada, tanto por su "competencia" y madurez, como por la eliminación de las clonas autorreactivas.

Otros estudios que se realizaron fueron en los animales adultos donde se vio que los efectos de la timectomía no son muy pronunciados, solo se aprecia una ligera disminución del número de linfocitos y del peso del bazo y ganglios linfáticos, por lo que en la etapa adulta la influencia del timo es menor debido a que ya se cuenta con una reserva de linfocitos T maduros circulantes y/o en los órganos linfoides secundarios (Cardarelli, 1989; Nicolic-Zugic, 1991 y Zambrano, 1994)

2 3.2. Función endócrina

Se ha determinado en los últimos años que el timo influye sobre algunas glándulas endócrinas como la tiroides, la corteza adrenal y las gónadas. Se ha observado en ratones que cuando se extirpa el timo en los primeros días de vida postnatal se presentan cambios degenerativos en estas glándulas u órganos. Pero si se administran extractos tímicos o se hacen injertos de timo, casi inmediatos a la extirpación, se observa reversión de los cambios (Cardarelli, 1989).

Después de los estudios de Miller y Osoba en los años 60's sobre el papel central del timo en el desarrollo del sistema inmune, alrededor de los años 70's se comenzaron a hacer estudios en donde se conoce el papel endócrino del timo (Hadden *et al*, 1992). El timo es considerado como una glándula endócrina ya que en él se sintetizan muchos y diferentes productos parecidos a las hormonas que se encuentran en el timo y en el plasma. Goldstein (1966) y Consa (1973) (citado por Reyes, 1991), demostraron esta teoría con experimentos de timectomía y la posterior administración de extractos tímicos, observando que mediante un implante del órgano en cámaras cerradas de Millipore (a la que no pueden entrar ni salir células) se impide el contacto directo entre prolinfocitos y células sanguíneas; el animal tratado de esta manera no va a sufrir trastornos inmunológicos y el déficit de linfocitos se corrige en gran medida.

La endocrinología del timo ha sido caracterizada por la acción de varias hormonas. Estas sustancias peptídicas han sido extraídas desde el timo intacto. Aunque el origen

endócrino de éstos péptidos aún no ha sido aclarado completamente. Recientes trabajos muestran que las células epiteliales tímicas son los componentes endócrinos del timo, y que a partir de éstas células se derivan las citocinas tímicas; las cuales se dividen en Interleucinas y Hormonas peptídicas (Hadden *et al*, 1992).

Recientemente se conocen ya varias sustancias que han sido obtenidas como productos endócrinos del timo; entre ellas se encuentran el factor tímico humoral, la timosina, el factor tímico sérico, la timoestimulina y la timopoyetina (Reyes, 1991). Con el descubrimiento de éstas hormonas se observó que el timo regula la respuesta inmune de las células linfoides de manera endócrina, debido a que su acción biológica se lleva a cabo en órganos secundarios; se ha visto también que éstas hormonas junto con algunas citocinas tímicas, forman el ambiente químico, el cual es generado por el epitelio tímico en que se lleva a cabo el proceso de maduración de los linfocitos T (Hadden *et al*, 1992).

2.4. INVOLUCIÓN DEL TIMO

2.4.1. Involución relacionada con la edad:

La velocidad de crecimiento del timo, cuando se expresa en relación con el peso corporal, se equilibra al comienzo del último trimestre del desarrollo fetal. Es seguido por un descenso gradual, que ya es perceptible en el momento del nacimiento y que continúa después, sin embargo en roedores el timo continúa creciendo hasta la segunda semana de vida postnatal (Haynes *et al*, 1998).

Con relación al peso corporal en el humano, el timo alcanza su máximo desarrollo después del nacimiento, durante la infancia continúa creciendo y al llegar a la pubertad sufre un lento proceso fisiológico de involución (Cormack, 1988)

Al nacer el humano el timo pesa alrededor de 12 a 15 g, al llegar a la pubertad pesa cerca de 30 a 40 g, y al llegar a la senectud (60 años aprox.) sólo pesa de 10 a 15 g. (Cormack, 1988; Cardarelli, 1989). Con relación a la rata, se ha visto que en la etapa neonatal el timo pesa aproximadamente 10 mg mientras que en el adulto pesa unos 150 mg (Reyes, 1991).

En la última etapa de la vida fetal comienza a disminuir la velocidad de crecimiento del timo en relación con el crecimiento del organismo, y ésta disminución relativa continúa luego del nacimiento, por lo que el timo posee su mayor tamaño relativo en el nacimiento. La involución aparece en la pubertad, que es cuando comienza a disminuir el peso absoluto, por lo que el mayor tamaño absoluto se da en la pubertad, y se debe a los esteroides sexuales (Cormack, 1988).

2.4.1 I. Características de la involución tímica:

La involución relacionada con la edad se presenta primero en la médula y después en la corteza; la zona cortical rápidamente se ve reducida mientras que la médula comienza a involucionar en la pubertad. De manera general éste proceso normal de involución con la edad coincide con la pubertad, pero si se toma como índice la actividad funcional disminuída, la reducción relativa del parénquima cortical en el humano, éste proceso comienza ya muy pronto en la infancia (Cormack, 1988).

La involución consiste principalmente en: disminución del peso del timo, disminución de linfocitos corticales, el parénquima se retrae y es reemplazado por tejido adiposo y fibroso, aumento del tamaño del número de corpúsculos de Hassall, en los adultos, el tejido se transforma en una masa de tejido adiposo, a medida que los lóbulos se atrofian, los tabiques aumentan de espesor; y en la senectud el timo está básicamente representado por células reticulares, corpúsculos de Hassall, algunos linfocitos y gran cantidad de tejido adiposo (Cormack, 1988, Hadden *et al*, 1992 y Ming *et al*, 1992).

2.4.2. Involución de tipo accidental

El proceso de la involución relacionado con la edad puede afectarse y acelerarse a consecuencia de una involución accidental, la cual puede llevarse a cabo por respuesta a ciertos estímulos como:

Enfermedades.

Estrés.

Deficiencias dietéticas.

Exposición a radiaciones ionizantes.

Inyección de sustancias coloidales

Endotoxinas bacterianas.

Secreción aumentada de hormonas corticoesteroides, etc.

Algunos ejemplos de involución accidental debido a una enfermedad son cuando en niños que mueren súbitamente y sin ninguna razón aparente el timo se observa muy grande en algunos casos, por el contrario en niños que mueren después de haber presentado enfermedades muy prolongadas se ha observado que el timo tiene un peso muy por debajo de lo normal (Cormack, 1988); otra ejemplo es que al ingerir grandes dosis de corticoides es posible desencadenar una involución severa con pronunciada desaparición de linfocitos corticales, otro ejemplo es la hormona adrenocorticotrófica (ACTH) que disminuye la proliferación y produce apoptosis de los linfocitos además reduce el grosor de la corteza del timo (Cardarelli, 1989; Hadden *et al*, 1992)

La causa de la involución del timo es poco conocida, se tienen evidencias de que los esteroides adrenales y gonadales están involucrados en la atrofia tímica por lo que se considera que los esteroides sexuales influyen sobre el timo (Grenstein *et al*, 1986; Pearcc *et al*, 1981; Aguilera y Romano, 1989).

Es bien conocido que los esteroides sexuales ejercen una influencia sobre la respuesta inmunológica. Uno de ellos son los estrógenos, que actúan sobre el timo afectando *in vitro* la liberación de factores inmunorreguladores, importantes para la proliferación, diferenciación y respuesta de los linfocitos (Aguilera y Romano, 1989).

A pesar de que el timo involuciona con la edad, continúa funcionando y cuando sus células son estimuladas, son capaces de reaccionar, aumentando la producción de linfocitos. A lo largo de toda la vida persisten restos de parénquima, y experimentos en animales indican que el timo permanece activo funcionalmente incluso en la ancianidad ó vejez (Fitzpatrick *et al*, 1985) (Fig. 4).

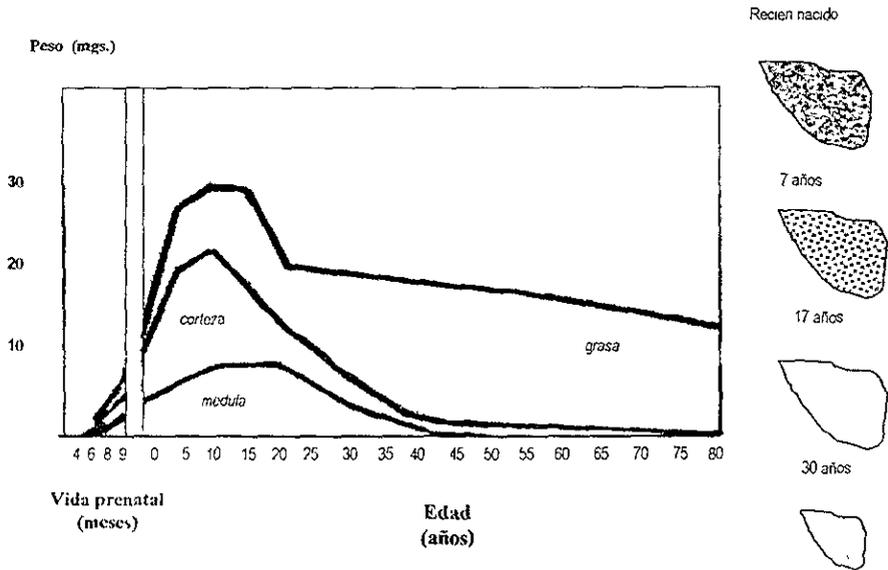


FIG. 4. - Involución tímica en el humano. Sé obseva la relación del peso del timo con la edad del hombre. Modificado de Bach (1984).

3. - Células linfoides del timo:

El timo es el mejor sitio de maduración de los linfocitos T, desde los progenitores hematopoyéticos hasta el producto final que son los linfocitos T maduros, los cuales son equipados con todos los mecanismos bioquímicos que participan en la activación y respuesta antes de ser enviados a los órganos linfoides secundarios (Adkins *et al*, 1987).

3.1 ORÍGEN DE LAS CELULAS T:

Se pudo comprobar que el timo es colonizado por un precursor hematopoyético denominado pro-timocito, que proviene de la médula ósea en la vida adulta ó del hígado ó saco vitelino en la vida fetal (Fainboim y Sastz, 1994; Davis, 1990, Boyd y Hugo, 1991). Estos precursores dejan la médula ósea, circulan en la sangre y entran en la corteza tímica a través de los vasos sanguíneos, dentro de la cual muchas células proliferan y otras mueren (Abbas *et al*, 1995).

En la actualidad se sabe muy poco de cómo las células precursoras de las células T migran hacia el timo. Existen evidencias de que éstos precursores expresan moléculas de superficie (adhesinas) aún no determinadas ó identificadas, que se ligan de forma selectiva a células endoteliales de los vasos del timo; y otra evidencia sugiere que el mecanismo por el cual los precursores hematopoyéticos ingresan al timo se debe a factores quimiotácticos, los cuales son producidos por el estroma tímico y que atraen las células al timo (Adkins *et al* 1987; Boyd y Hugo, 1991; Anderson *et al*, 1996).

3.2. RECEPTOR DE CELULAS T (TCR):

El reconocimiento del antígeno por las células T varía en diferentes aspectos del presentado por las células B, es decir que no poseen inmunoglobulinas de superficie y no reconocen epítopes en antígenos libres y nativos. Las células T expresan una estructura distinta de reconocimiento denominada receptor de células T ó TCR (Paterson *et al*, 1999).

El TCR está constituido por un heterodímero. Hay dos estructuras diferentes de TCR presentes en distintas poblaciones de células T denominadas $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$, cuyo origen, distribución y funcionalidad suelen ser diferentes.

Ambos tipos de receptores se encuentran estrechamente asociados en la membrana de las células T al complejo molecular CD3, el cual es requerido para llevar a cabo el transporte del TCR a la superficie de la célula y también para la transducción de señales al interior de la célula T, o bien para la inicialización y evolución de los eventos de diferenciación de los linfocitos T (Paterson *et al*, 1999).

El TCR es una molécula de dos cadenas polipeptídicas que reconocen al complejo principal de histocompatibilidad-antígeno (MHC-Ag.) Los dos isotipos conocidos del TCR son el TCR $\alpha\beta$ y el TCR $\gamma\delta$. El TCR $\alpha\beta$ se encuentra presente en la mayoría de las células T, mientras que el TCR $\gamma\delta$ solamente se encuentra en una pequeña proporción de la población de los linfocitos T (Fainboim y Satz, 1994, Paterson *et al*, 1999).

Las células T portadoras del TCR $\alpha\beta$ constituyen alrededor del 60-70 % de los linfocitos de sangre periférica, y son también predominantes en ganglios y bazo, éstas moléculas se encuentran en la superficie de las células simples positivas (CD4+ y CD8+), su función es la de reconocer moléculas del MHC de clase I ó clase II que acarrean péptidos antigénicos en su sitio de presentación. Es necesario que se encuentren ambas cadenas $\alpha\beta$ para determinar la especificidad que será reconocida

Las células T con receptores $\gamma\delta$ constituyen una proporción menor de los linfocitos T de sangre periférica (menos del 10%), y en ganglios, bazo y timo (menos del 1%). Sin embargo, se ha visto que ésta población de células T con TCR $\gamma\delta$ predomina en piel, y epitelios intestinales y genitales; por lo que se cree que tienen un papel importante en los mecanismos primarios de defensa, aunque aún se desconoce la función exacta de éstos linfocitos, se ha reportado que éstas células con TCR $\gamma\delta$ llegan a secretar *in vitro*, una variedad de citocinas, y tienen una actividad citolítica inespecífica, lo que sugiere que pueden estar involucrados en la respuesta de tipo inflamatorio y además participar en el rechazo de tumores (Barrera-Rodríguez *et al*, 1995).

Al nivel de línea germinal, los genes que codifican para el TCR se encuentran conformados por varios segmentos, los cuales se rearreglan durante el desarrollo de linfocitos T; es decir que para las cadenas $\alpha\beta$ se encuentran los segmentos V, D, J y C; y para las cadenas $\gamma\delta$ los segmentos V, J y C (Barrera-Rodríguez *et al*, 1995).

El TCR $\gamma\delta$ es el primer TCR que se expresa durante el desarrollo de la célula T, se ha visto que éste TCR está en configuración de línea germinal, se expresa alrededor del día 13 y 14 de gestación en el ratón, lo cual corresponde a la 8a y 9a. semana de gestación en el humano. En ésta etapa se recombinan los genes del TCR afectando a los genes γ y δ (Paterson *et al*, 1999)

Para el día 14 de gestación se producen transcripciones completas del ARNm de los genes γ y δ ; entre el día 14 y 15 de gestación del ratón se produce en la superficie de las células T la proteína heterodimérica $\gamma\delta$ asociada al CD3 (Abbas *et al*, 1995; Paterson *et al*, 1999).

Estos linfocitos fetales migran del timo para colonizar la piel y los epitelios genitales donde presentan una diversidad de reconocimiento muy limitada. En ratones adultos se encuentra una población de linfocitos T $\gamma\delta$ con más diversificación, que colonizan el epitelio

intestinal y parecen desarrollarse en ambientes extratímicos (Yamada *et al*, 1998; Paterson *et al*, 1999).

Con respecto a las cadenas $\alpha\beta$ se ha visto que las recombinaciones funcionales de la cadena β y las transcripciones del ARNm son detectadas a los 16 días de gestación, y los de la cadena α en el día 17 de la vida fetal del ratón. La expresión en la superficie de los heterodímeros $\alpha\beta$ asociados a la molécula CD3 es detectada por primera vez a los 17 días de gestación, aproximadamente 2-3 días después de la expresión del TCR $\gamma\delta$. La mayor parte de los timocitos expresan CD3 –TCR $\alpha\beta$. (Fainboim y Satz, 1994; Barrera-Rodríguez *et al*, 1995; Abbas *et al* 1995).

3.3. EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS CD4 Y CD8:

Para poder determinar el proceso de diferenciación de los linfocitos T se han identificado varias moléculas de superficie como son el CD3, los correceptores CD4 y CD8, así como las cadenas α y β del TCR, entre otros.

Los linfocitos T han sido divididos en dos grupos basados en la expresión de los correceptores CD4 y CD8. La expresión de éstas moléculas es adquirida durante el desarrollo del timo, pudiendo distinguir entre dos poblaciones antigénicas diferentes.

Las células CD4 apoyan y promueven las funciones de otras células inmunitarias por lo que también se denominan células T cooperadoras (Th), funcionan como células inductoras mediante la secreción de interleucinas, en la respuesta celular a antígenos exógenos, mientras que las células CD8 tienen efectos supresores y citotóxicos y se les conoce como células T supresoras (Ts ó LTC), tienen una función citolítica y eliminan células tumorales o infectadas por virus, ya que están involucrados en la respuesta a antígenos endógenos. (Fitch *et al*, 1993; Weiss y Littman,1994 ; Barrera *et al* 1995, Santos,1995).

Las células CD4⁺ han sido subdivididas en dos distintas subpoblaciones basadas en el modelo de secreción de linfocinas: células Th₁ y Th₂. Las células Th₁ producen principalmente interleucina 2 (IL-2) e interferón gama (INF- γ) además de otras linfocinas, mientras que las células Th₂ producen IL-4, IL-5, IL-6 ó IL-10 y otras linfocinas (Fitch *et al*, 1993; Haynes *et al*, 1998).

El CD4 y el CD8 son miembros de los genes de las inmunoglobulinas, son consideradas como glicoproteínas que se expresan en la superficie de las distintas poblaciones de linfocitos T (Littman, 1987), se unen a regiones no polimórficas de las moléculas de la clase I y II del MHC. El CD4 se expresa en células restringidas por la clase II, y el CD8 en los linfocitos T citolíticos (LTC) restringidos por la clase I. (Littman, 1987; Janeway, 1992)

El CD4 y el CD8 sirven como moléculas accesorias que facilitan las interacciones de las células T con las células presentadoras de antígenos (APC) y de las células diana con los LTC respectivamente. Las funciones del CD4 y CD8 se asocian intrínsecamente a la función del TCR (Bierer *et al*, 1989).

El CD4 tiene dos funciones principales en la activación de las células T. Sirve como molécula de adhesión debido a su afinidad específica por las moléculas de clase II del MHC y puede transducir señales o facilitar la transducción de la señal mediada por el complejo TCR a unirse a las moléculas de la clase II del MHC, promoviendo las respuestas funcionales posteriores de las células T restringidas por la clase II. El CD8 básicamente tiene las mismas funciones del CD4, principalmente en la adhesión célula-célula mediante la unión de dominios no polimórficos similares a las inmunoglobulinas de las moléculas de clase I del MHC, estabilizando la interacción de una célula T restringida por la clase I del MHC (LTC) con una célula diana que lleva un antígeno asociado a la clase I del MHC (Bierer *et al* 1989, Paul, 1998, Abbas, 1995).

3.4. DESARROLLO DE LOS LINFOCITOS T:

La expresión de las moléculas CD4 y CD8 en las células T en el timo ocurre durante la etapa fetal y continúa durante toda la vida.

Los linfocitos se dividen en cuatro etapas principales basándose en la expresión del CD4 y CD8. Estas etapas son: 1) Células dobles negativas (CD4-CD8-); 2). Células dobles positivas (CD4+CD8+); y 3) células simples positivas CD4+ (CD4+CD8-) y 4) simples positivas CD8+ (CD4-CD8+). (Bierer *et al*, 1989; Aspinall *et al*, 1991 y Tsuchida *et al*, 1994).

Cabe mencionar que los linfocitos del timo además de expresar CD4 y CD8 expresan o dejan de expresar otras moléculas de superficie de acuerdo a la etapa de diferenciación y maduración en que se encuentren.

Los progenitores linfoides tímicos (van a dar origen a los tímocitos) poseen altos niveles de CD44 (PgP-1) y CD117 (receptor del factor de células "stem") así como bajos niveles de Thy-1 y HSA (antígeno estable al calor) pero no poseen CD25. Al llegar al timo las células pro-T continúan expresando CD44, CD117 y comienzan a expresar CD25.

Estas células además de expresar éstos marcadores expresan en su citoplasma la molécula cCD3 y en su superficie la molécula CD7 y CD45RO (Zúñiga-Pflücker y Leonardo, M., 1996) Se menciona que el fenotipo CD3+ CD7 CD45RO se observa en el hígado fetal y en el parénquima que envuelve al timo rudimentario entre la 7a y la 9a semana de gestación en el humano, y el día 13 y 14 de gestación en el ratón (Fainboim y Satz, 1994, Haynes *et al*, 1998).

Tras la expresión del CD7 comienzan a expresarse las moléculas CD2 y CD5 así como la enzima desoxinucleotidiltransferasa terminal (TdT) por lo que estas células son fenotipo cCD3+ CD7+ CD2+ CD5+ CD45RO+ TdT+ CD4-CD8-. Esta población también

se denomina pro-T y son caracterizados histológicamente como células grandes ó medianas con aspecto de célula blástica y además tienen gran capacidad proliferativa y alta expresión del TdT. En ésta etapa de DN comienza el rearrreglo de genes de TCR que codifican para la cadena β y representan alrededor del 1-5% del total de timocitos en el adulto (Davis, 1991; Nikolic-Zugic, 1991).

Las células pre-T tempranas dejan de expresar CD117 y CD44, e inician la expresión de CD25 además de las antes mencionadas, al llegar a células pre-T tardías dejan de expresar CD44, CD117 y CD25. En este paso las células llegan a la etapa de dobles positivas, las cuales requieren de la presencia del pre-TCR para la progresión de las células DN a dobles positivas (DP) (Anderson *et al*, 1996), esta etapa se caracteriza por la presencia en el citoplasma de la cadena β del TCR, así como de las proteínas CD1, CD4 y CD8 en su superficie. Por la expresión del CD4 y CD8 se denominan DP ó células pre-T, proliferan abundantemente, en ésta etapa se produce el rearrreglo de la cadena α del TCR, éstas células se localizan entre el día 16 y 17 de gestación en el ratón, y representan alrededor de un 80-85% del total de timocitos en el adulto, éstas células por tanto se consideran de fenotipo cCD3+ CD7+ CD2+ CD5+ CD4+ CD8+ CD1+ CD45RO+ TdT+.

Cuando los timocitos llegan a la etapa DP, estas células presentan en su superficie una expresión muy baja de las proteínas del complejo CD3/TCR. Estas células DP continúan diferenciándose, observando una etapa intermedia donde se deja de expresar el TdT nuclear y comienza la expresión de CD3 en la superficie lo cual lleva a la aparición del TCR $\alpha\beta$ en la superficie de los timocitos (Nikolic-Zugic, 1991; Zúñiga-Pflucker *et al*, 1996; Haynes *et al*, 1998)

Finalmente la última etapa de maduración es la de los timocitos DP a timocitos maduros ó simples positivos (SP), en esta etapa las células dejan de expresar CD1 y mantienen solamente el CD4 ó el CD8. La actividad de proliferación es abundante, son células que expresan altos niveles de CD3/TCR $\alpha\beta$, éstas células son capaces de reconocer moléculas propias del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC)

La expresión de la molécula de clase II del MHC de las células estromales es primero detectada en el día 13 de gestación en el ratón, y para el día 16 se expresa la molécula de clase I del MHC (Adkins *et al*, 1987 y Ewijk, 1991). Todos los linfocitos T maduros migran del timo expresando solamente CD2+CD7+CD5+ y CD45RA+ así como CD4+ ó CD8+ Estos aparecen entre el día 18 y 19 de gestación en el ratón y representan solamente del 10- 15% del total de timocitos en el adulto (Haynes *et al*, 1998)

Los timocitos CD4+CD8-CD3+ ó CD4-CD8+CD3+ se localizan predominando en la médula tímica y es posible que las células epiteliales medulares intervengan en los cambios madurativos que ocurren a éste nivel, antes de su exportación a la periferia (Fig. 5).

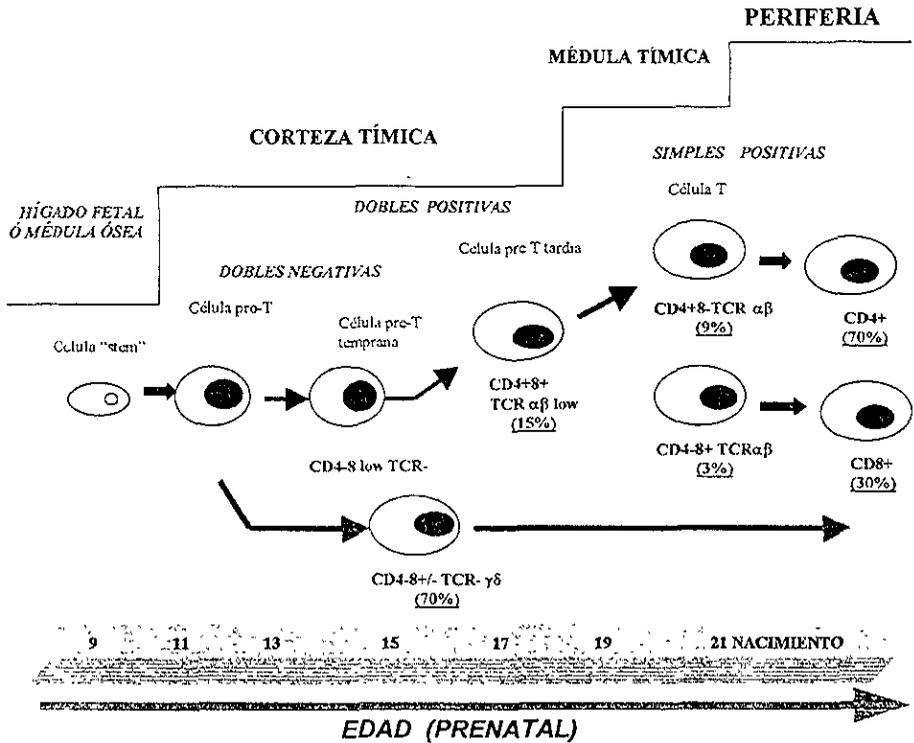


Fig.5.- Esquema simplificado de las distintas etapas de diferenciación celular en el timo en ratas. Se muestra el desarrollo de los timocitos desde los precursores de los linfocitos T (célula "stem") que pasan a través de la corteza tímica denominados dobles negativos (DN) y dobles positivos (DP), que pasan hacia la médula tímica donde se denominan simples positivos (SP), hasta llegar a la periferia. Se muestran los porcentajes de células DN (3%), DP (85%), y SP (9 y 3% de CD4+ y CD8+ respectivamente). Además se muestra el tiempo de gestación donde se van presentando las distintas etapas hasta el nacimiento. Modificado de Davis, (1990) y Zúñiga-Pflicher, (1996).

3.5. SELECCION CELULAR:

Un importante acontecimiento para la maduración de los linfocitos T intratímicos después de la expresión del TCR y los correceptores CD4 y CD8 es la selección de las células que van a formar parte del repertorio de células T maduras en la periferia.

Los procesos de selección celular son los responsables de la supervivencia de las células T que expresan solo TCR útiles, es decir que reconocen antígenos extraños asociados a las moléculas del MHC (Abbas *et al*, 1995; Paul, 1998).

La selección positiva es el proceso que permite la supervivencia de los linfocitos funcionales que no reconocen a los antígenos propios, promueve la supervivencia y expansión selectiva de los timocitos con TCR restringidos por el MHC propio (Davis, 1990, Yamada *et al*, 1998).

La selección negativa es el proceso de eliminación de los linfocitos que por tener combinaciones anormales de TCR y correceptores CD4 ó CD8 no son funcionales, ó de aquellos que son funcionales pero que reaccionan contra antígenos propios. De este modo los timocitos que llegan a reconocer estructuras propias cuando llegan a células T maduras en la periferia no desencadenan una respuesta autoagresiva y son auto-tolerantes. (Ashton-Rickardt, 1993 y Sebзда *et al*, 1994)

La interacción del TCR de timocitos inmaduros con antígenos del MHC tímicos rescatan a las células T inmaduras de la muerte celular programada y determinan la futura diferenciación a células T maduras. El compromiso del TCR $\alpha\beta$ con moléculas del MHC lleva a cabo la diferenciación de células T cooperadoras o bien células T citotóxicas. Las moléculas de clase I del MHC llevan a la diferenciación de células T citotóxicas CD8⁺, y las moléculas de clase II están comprometidas para la diferenciación de células T cooperadoras CD4⁺. (Sia *et al*, 1988, Davis, 1990; Ashton-Rickard, 1993, Yamada *et al*, 1998)

Se considera que la selección positiva precede de la selección negativa, pero no hay evidencias claras que comprueben esto, aunque se ha visto que estos dos procesos trabajan en forma paralela, es decir que la maduración de los linfocitos dentro del timo se da mas o menos al mismo tiempo que la muerte de ellas (von Boehmer, 1990)

Se menciona que la selección celular se lleva a cabo en dos etapas. La primera durante la fase de células dobles negativas, y la segunda durante la fase de células dobles positivas y simples positivas (von Boehmer, 1990).

Cuando ocurre este proceso en las células DN se efectúa en la corteza subcapsular del timo y se da en función a la expresión del pre-TCR que expresen los timocitos (von Boehmer, 1990).

El reacomodo de genes de la cadena TCR β es un pre-requisito para la maduración de las células DN a DP. Este requisito ha sido determinado por la identificación del pre-TCR, comprometiendo el heterodímero de la cadena pre-TCR α (conocido como gp33), asociado a la cadena TCR β (Owen, 1991). Este pre-TCR es parte del complejo que contiene proteínas CD3 que transduce señales en los timocitos inmaduros.

Al parecer el pre-TCR interacciona con algún ligando interno que aún no se ha identificado. La molécula CD3 inicia la transducción de señales produciendo una movilización de calcio y activando la tirosina cinasa lck. Estos eventos llevan por una parte a que el rearreglo de los genes de la cadena β del TCR se detenga asegurando la expresión de un solo alelo del TCR β , y por otra parte que la proteína gp33 deje de expresarse iniciándose así el rearreglo de los genes de la cadena α del TCR, y así mismo la proliferación celular y la maduración de los timocitos (Davis, 1990; Abbas *et al*, 1995, Paul, 1998)

Por otro lado, los timocitos que presentan un TCR β que no es funcional y fallan en la interacción con el ligando son seleccionados negativamente e inducidos a la apoptosis (Yamada *et al*, 1998, Paterson *et al*, 1999)

Cuando los procesos de selección celular se presentan en la fase de células DP y SP ocurre en la región que divide a la corteza y la médula así como en la propia médula tímica; la selección celular se lleva a cabo en función al TCR $\alpha\beta$ que presentan los timocitos, para lo cual se requiere de la interacción timocitos-células estromales (Ewijk, 1991).

La selección de los timocitos DP depende de la interacción mediada con el TCR y el MHC expresados en las células dentro del microambiente tímico. Se menciona que el TCR en éstas células DP es capaz de reconocer péptidos con el contexto del MHC propios, lo cual lleva a una futura maduración de timocitos DP a SP, o bien a la delección clonal por apoptosis (Owen, 1991).

Por lo tanto los timocitos que han conservado la expresión del correceptor “adecuado” serán capaces de interaccionar con las células estromales recibiendo señales de selección positiva; mientras que si conservaron el correceptor “inadecuado” no serán capaces de ésta interacción, lo cual llevará a no recibir señal de sobrevivencia, siendo por lo tanto eliminados por apoptosis (Davis, 1990, Abbas *et al*, 1995; Anderson *et al*, 1996; Yamada *et al*, 1998).

Es claro que la mayoría de las células que emigran del timo son células simples positivas; sin embargo existen experimentos de marcaje *in situ* de timocitos con Tiocianato de fluoresceína (3H-TDR) en los que se demuestra que una pequeña población de células DP es capaz de salir del timo y madurar de forma extratímica en el intestino, bazo e hígado, aunque toda vía no queda claro este punto (Cardarelli, 1989; Paul, 1998, Yamada *et al*, 1998).

Finalmente, cuando los timocitos son seleccionados positivamente adquieren la capacidad funcional cooperadora ó citotóxica, salen del timo y migran hacia los órganos linfoides secundarios, donde residen como células T cooperadoras y linfocitos T citotóxicos que pueden responder a antígenos extraños, restringidos por el MHC propio (Davis, 1990).

II.- OBJETIVOS

Objetivo General:

Caracterizar las poblaciones de linfocitos T del timo de ratas normales de diferentes edades (fetales, recién nacidas, puberales y adultas) de acuerdo a la expresión de los correceptores CD4 y CD8, así como caracterizar la apoptosis y proliferación celular de los timocitos mediante Citometría de Flujo.

Objetivos Particulares:

1.- Caracterizar la ontogenia del timo desde el punto de vista de masa, relación corporal, número de células y número de células por masa

2. - Caracterizar fenotípicamente la población de timocitos de ratas Fetales de 15,17 y 19 días de gestación, Recién Nacidas (RN); 7, 15, 21, 30, 60, 90 y 120 días de edad, basándose en la expresión de los antígenos CD4 y CD8

3 - Cuantificar las células apoptóticas, así como el contenido de ADN y el Ciclo Celular en timocitos de ratas de las diferentes edades, mencionadas en el punto anterior.

4. -- Caracterizar fenotípicamente distintas subpoblaciones de linfocitos T de acuerdo a su densidad.

III.- MATERIAL Y MÉTODOS

1. - Animales:

Se utilizaron fetos de ratas cepa Wistar de 15,17 y 19 días de gestación; además de ratas macho recién nacidas (RN), y de 7, 15, 21, 30, 60, 90 y 120 días de edad que fueron obtenidas del Bioterio del Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, México,D.F.

El día 0 de gestación fue determinado por lavado vaginal (Mandel y Kennedy, 1978).

Los animales fueron pesados previamente al sacrificio, para obtener el peso corporal de cada uno

2. - Aislamiento de timocitos:

Para la obtención de los timocitos, las ratas fetales y RN fueron sacrificadas por hipotermia, mientras que las de las otras edades con cloroformo y desnucadas (Ming *et al*, 1992). Inmediatamente se les realizó un corte torácico con el fin de obtener el timo. Los timos se lavaron con una solución salina con amortiguador de fosfatos (PBS pH 7.4), después de ello los timos fueron secados con papel filtro y pesados; posteriormente los timos fueron disociados haciendo pasar el tejido por una malla metálica con poro de $100\mu\text{m}^2$. Las células obtenidas fueron colocadas en PBS y centrifugadas por 10 min a 1000 r.p.m. a 4°C , se les adicionó PBS para resuspender y obtener una suspensión de células, las cuales fueron cuantificadas con una cámara de Neubauer, también se cuantificó la viabilidad de los timocitos mediante la técnica de azul de Tripán, la cual resultó ser mayor del 98%

3. - Preparación del Gradiente de Percoll:

Para la obtención de las subpoblaciones de los timocitos se prepararon dos gradientes discontinuos de Percoll (Pharmacia Fine Chemicals Ltd): de cinco capas con una concentración del 65, 60, 55, 50 y 45 % de Percoll (Salisbury *et al*, 1979). Cada capa fue de 2 ml y fueron colocadas en un tubo cónico de 15 ml con la ayuda de una Bomba Peristáltica (Peristaltic PUM P-1 Fine-Chemical), iniciando con la capa de mayor densidad. En cada gradiente se sembraron 200×10^6 de células en la parte superior del gradiente. Posteriormente se centrifugaron por 1h a 1000 rpm a 4°C (Centrífuga Beckman GPR). Las bandas fueron separadas y lavadas 2 veces adicionando 5 volúmenes de PBS y centrifugando por 10 min a 1000 rpm a 4°C.

Las células obtenidas de cada una de las capas se resuspendieron en PBS pH7.4 y se cuantificaron, calculándose el porcentaje de recuperación de la siguiente manera:

$$RECUPERACIÓN = (Células recuperadas / Células sembradas) \times 100.$$

Obteniendo como resultado cerca del 85% de recuperación.

4. - Ontogenia del timo:

Para conocer el desarrollo del timo de cada una de las ratas de distintas edades se evaluaron cuatro parámetros, que fueron

Peso del timo, cantidad de células por timo, cantidad de células por miligramo de peso del timo, y relación del peso del timo con respecto al peso corporal de las ratas estudiadas. Para conocer el peso del timo, éstos fueron disecados y lavados con PBS y secados con papel filtro, el peso se evaluó como peso húmedo con el fin de cumplir los otros objetivos planteados.

5. - Citometría de Flujo:

Para el análisis de Citometría de Flujo se utilizó un citómetro modelo Facsorter, Becton Dickinson equipado con un laser de argón que emite a 488 nm de longitud de onda.

5.1. Análisis de la expresión de los antígenos CD4 y CD8:

Para el análisis de la expresión de los antígenos CD4 y CD8 mediante citometría de dos colores se utilizaron 5×10^5 células de cada capa del gradiente de Percoll así como de la población total. Estas células fueron resuspendidas en un amortiguador de fosfatos suplementado con glucosa (PBS pH 7.2 + Glucosa 20mM y 5% de suero fetal de ratón), y posteriormente fueron incubadas simultáneamente con anticuerpos monoclonales anti rata CD4 conjugado con Isotiocianato de Fluoresceína (FITC) y anti rata CD8 conjugado con Ficoeritrina (PE) (Serotec, Oxford, GB.) (Swat *et al*, 1991), en una dilución 1:50 de cada uno en PBS y por duplicado. Se protegieron de la luz y se incubaron 1 h. a 4°C. Posteriormente fueron lavados con un amortiguador de fosfatos adicionado con glucosa y albúmina (PBS pH 7.2 + Glucosa 20 mM y Albúmina al 0.05%) centrifugando 10 min a 1000 rpm a 4°C 2 veces. Finalmente se fijaron con formaldehído al 2 % en PBS pH 7.2, manteniéndolas a 4°C hasta su análisis en el Citómetro de Flujo (Ming *et al*, 1992)

Para el análisis citofluorométrico se utilizó el software denominado LISYS II de Becton Dickinson. Se realizó un análisis simultáneo de dos colores de fluorescencia verde (518nm) y fluorescencia naranja (560nm) (FL1/FL2) respectivamente, además de medir los parámetros de tamaño contra granularidad (FSC vs SSC), en base a ello se seleccionaron en total cuatro parámetros de la población de timocitos (Darzynkiewicz *et al*, 1994). En cada muestra se analizaron un mínimo de 10,000 eventos (Fig. 6)

En cada análisis de Citometría de dos colores se utilizaron cuatro grupos control, ajustando las condiciones de voltaje de los fotomultiplicadores y los amplificadores,

utilizando células control para el análisis de autofluorescencia, células con solamente anti-CD4; y células solamente con anti-CD8 para hacer los ajustes y compensación de los colores, además se utilizaron anticuerpos monoclonales anti- IgG 1-FITC y anti-IgG 2-RPE como controles de la fluorescencia inespecífica (Swat *et al*, 1991 y Schmid, 1994).

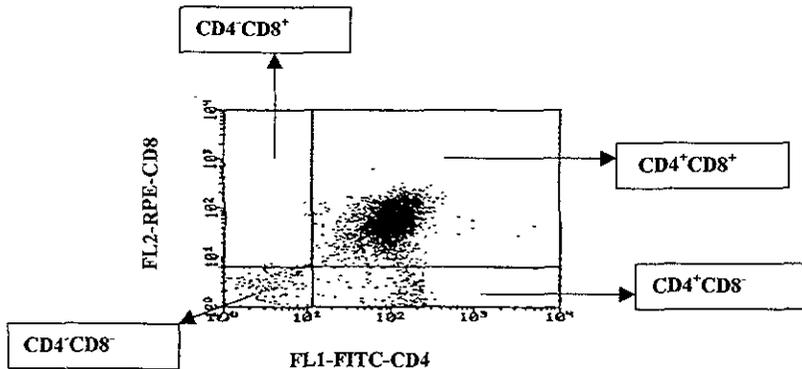


Fig.6.- Análisis de inmunofluorescencia de dos colores de timocitos de rata. En la gráfica de puntillo se muestran las cuatro poblaciones celulares (CD4-CD8-, CD4+CD8+, CD4+CD8-, CD4-CD8+). El eje de las X representa la intensidad de fluorescencia de los timocitos marcados con anticuerpo de ratón anti CD4:FITC de rata; y en el eje de las Y la intensidad de fluorescencia de timocitos marcados con anticuerpo de ratón anti CD8:RPE de rata. Se muestra que la mayor parte de las células son dobles positivas.

5.2 Análisis de ciclo celular:

Se utilizó un método de cuantificación del ADN y análisis de ciclo celular basado en la obtención de los núcleos celulares mediante la técnica de digestión enzimática y con detergente, utilizando un fluorocromo con afinidad por el ADN, el cual fue ioduro de propidio (IP). Se utilizaron 5×10^5 células, que fueron lavadas con PBS pH 7.4 dos veces, y después se incubaron con Tripsina (30 $\mu\text{g/ml}$ en amortiguador de espermina durante 10 min a temperatura ambiente, posteriormente, se agregó Inhibidor de Tripsina (277 $\mu\text{g/ml}$) y RNasa (55 $\mu\text{g/ml}$) en amortiguador de espermina durante 10 min a temperatura ambiente.

Finalmente se añadió Ioduro de Propidio (150 $\mu\text{g/ml}$) (Sigma Chemicals Co, S. Lovis Mo.), y se incubaron por 15 min a 4°C protegiéndolas de la luz. (Darzinewikz, 1994).

Inmediatamente se analizaron en el citómetro de flujo utilizando el programa Cell Fitt de Becton Dickinson. Para cada análisis se ajustaron las condiciones de voltaje de los fotomultiplicadores y los amplificadores para los parámetros de intensidad de FL2 (560 nm), duración del centelleo de fluorescencia (FL2-W) y el área bajo la curva de FL2/FL2W (FL2-A). Se analizaron un mínimo de 10,000 eventos por muestra; utilizando como controles núcleos de timocitos de ternera (BD). Para dicho análisis se realizaron histogramas de FL2-A y los porcentajes de las poblaciones en etapas G0/G1, S y G2+M fueron calculados utilizando el método matemático RFIT de Becton Dickinson (Fig. 7) (Vindelov y Chistensen, 1994).

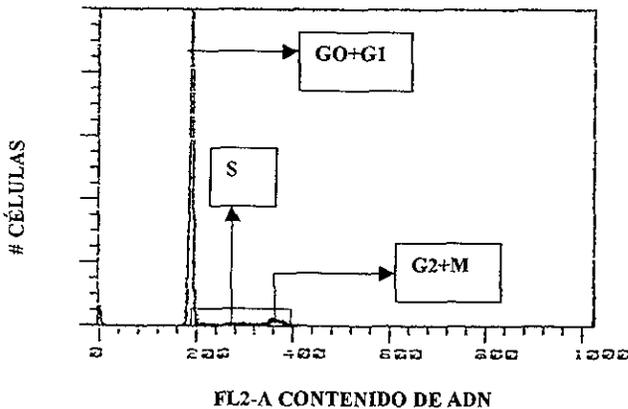


Fig. 7. - Histograma del contenido de ADN. Se muestra la distribución de las fases G0+G1/S/G2+M del ciclo celular. Los datos fueron analizados mediante el método RFIT de Becton Dickinson. En el eje de las X se representa la distribución del contenido de ADN, y en el eje de las Y se representa el número de células, las cuales fueron teñidas con IP.

5.3 Análisis de Apoptosis:

Previamente se han sido descritos diferentes métodos para la cuantificación de la muerte celular programada en células individuales por citometría de flujo. El método utilizado en éste trabajo se basó en la afinidad del colorante por el ADN, así como la capacidad de la membrana celular de excluir el colorante, el cual fue el 7- amino actinomicina D (7-AAD) que es capaz de ligarse al ADN pudiendo identificar células apoptóticas de las vivas .

Para poder identificar las células apoptóticas, se utilizaron 5×10^5 células que fueron teñidas con 7-amino-actinomicina D (7-AAD) (10 $\mu\text{g/ml}$) + Formaldehído al 1%, durante 20 min. (Calbiochem, la Jolla, C.A.) protegiéndolas de la luz (Swat, 1991). Las muestras fueron inmediatamente analizadas en el FACS, en el programa LISYS II de Becton Dickinson para su posterior análisis.

Para cada análisis se ajustaron las condiciones de voltaje de los fotomultiplicadores y amplificadores para los parámetros de intensidad de fluorescencia roja (FL3), así como FSC y SSC, la emisión del 7-AAD fue detectada en el canal FL3 (menor de 650 nm).

La población de timocitos fue seleccionada basándose en el tamaño y granularidad de los mismos (FSC vs SSC), las células que resultaron apoptóticas se identificaron en una gráfica de tamaño vs 7-AAD (FSC / FL3) (Schimid, 1994 y Lecoeur y Mougeon, 1996).

Para poder identificar ésta población de timocitos apoptóticos se utilizaron como grupos control células incubadas 24 h con Cortisona (10 $\mu\text{g/ml}$) y Azida de sodio (0.4%) así como células sin tratamiento, para identificar las células apoptóticas, necróticas, vivas y sanas respectivamente (Fig 8.).

Para la identificación de la población apoptótica se comparó la región de éstas células con las del grupo control (células con menor tamaño y con una captación de intensidad intermedia del colorante 7-AAD, la cual es mayor que la de las células vivas y sanas, y menor que las de las células necróticas) Para cada muestra se analizaron un mínimo de 10,000 eventos y se cuantificó el porcentaje de las células de cada muestra en ésta región

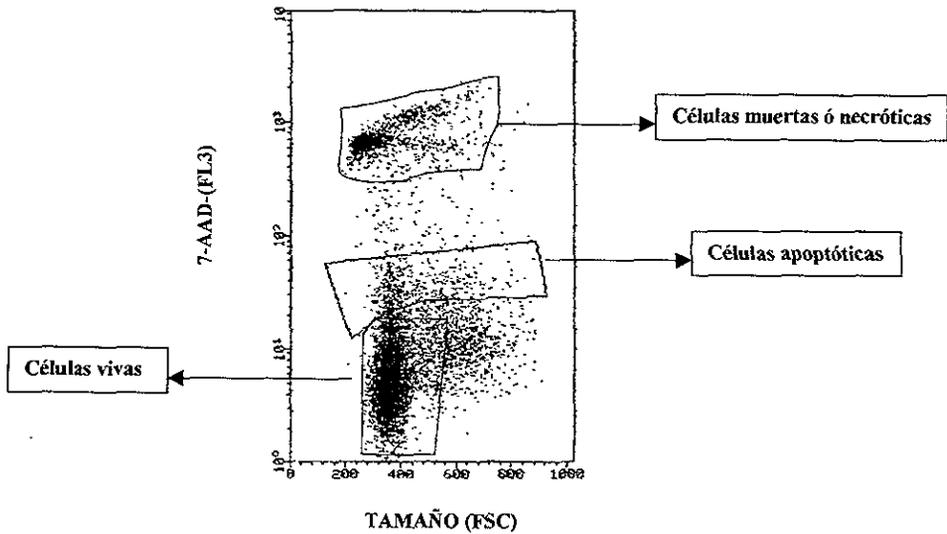
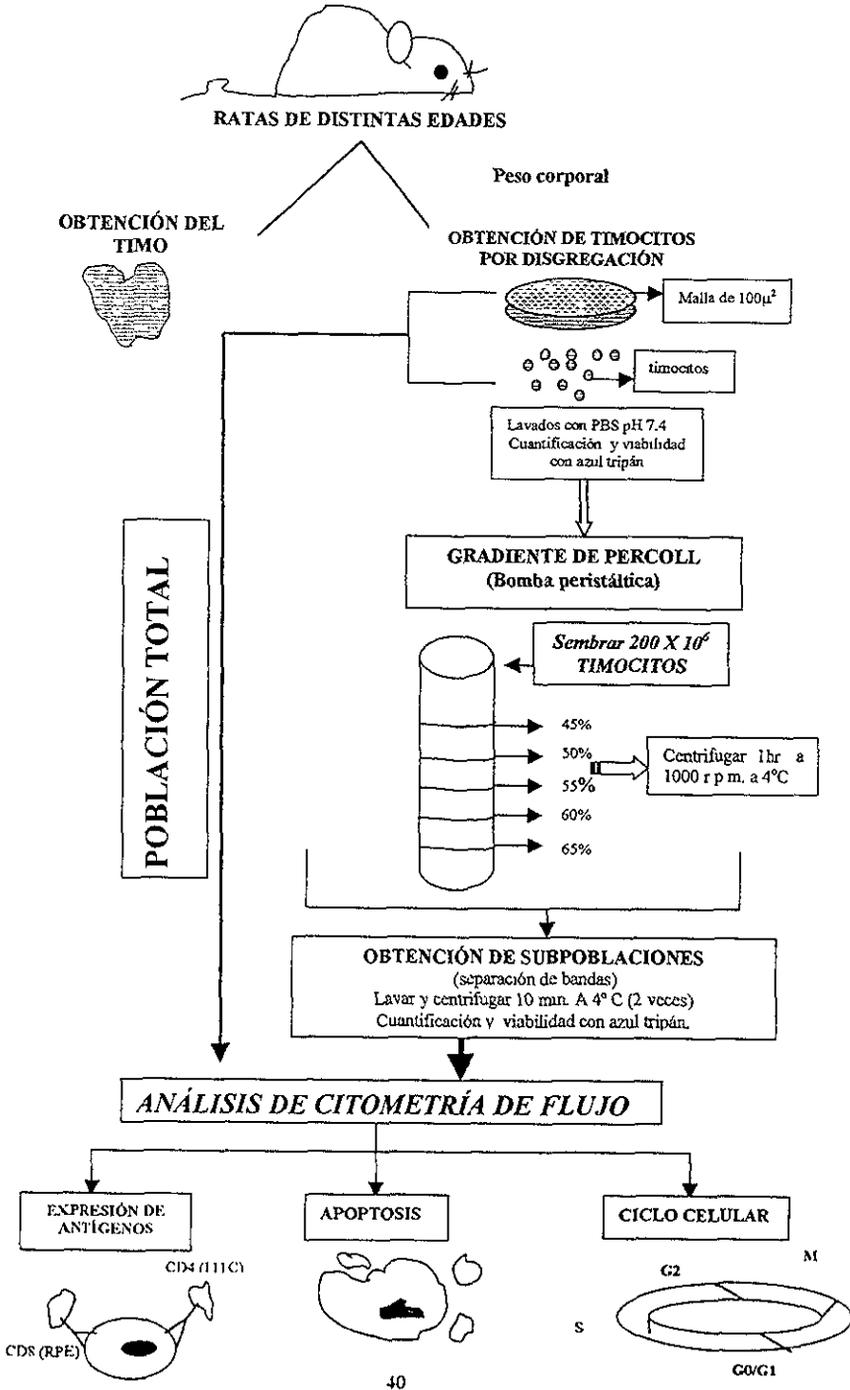


FIG. 8.- Análisis de apoptosis de timocitos de rata. En la gráfica de puntillado se muestran tres grupos de poblaciones celulares: células vivas, células apoptóticas, y células necróticas. En el eje de las X se grafica el tamaño de las células, y en el eje de las Y la fluorescencia correspondiente a 7-AAD. Todo analizado por citometría de flujo.

6. Análisis estadístico:

Se realizó un análisis de varianza para comparar los valores entre las diferentes edades de las ratas y “t” de Student a cada uno de los grupos para determinar las diferencias estadísticas de las diferentes poblaciones de timocitos obtenidos. Los grupos se consideraron diferentes cuando la probabilidad fue menor de 0.05 ($P < 0.05$).

7.- DIAGRAMA DE FLUJO



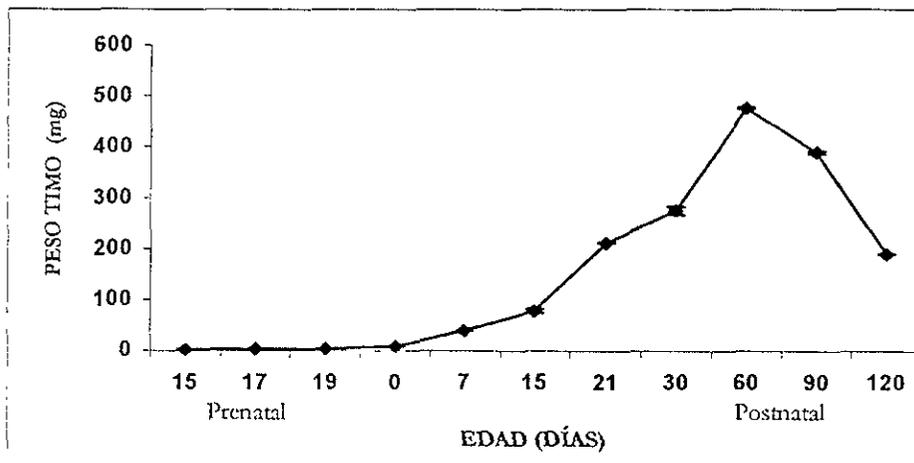
IV.- RESULTADOS

1. - Ontogenia del timo:

Es común que se tenga la idea de que el timo desaparece con la edad, o después de la pubertad. Con el propósito de corroborar esto, en el presente trabajo se realizó un estudio de la ontogenia del timo basándose en la masa del timo, cantidad de células, cantidad de células por masa y la relación de la masa del timo con el peso corporal de ratas fetales, neonatales, puberales y adultas

1.1. *Peso del timo:*

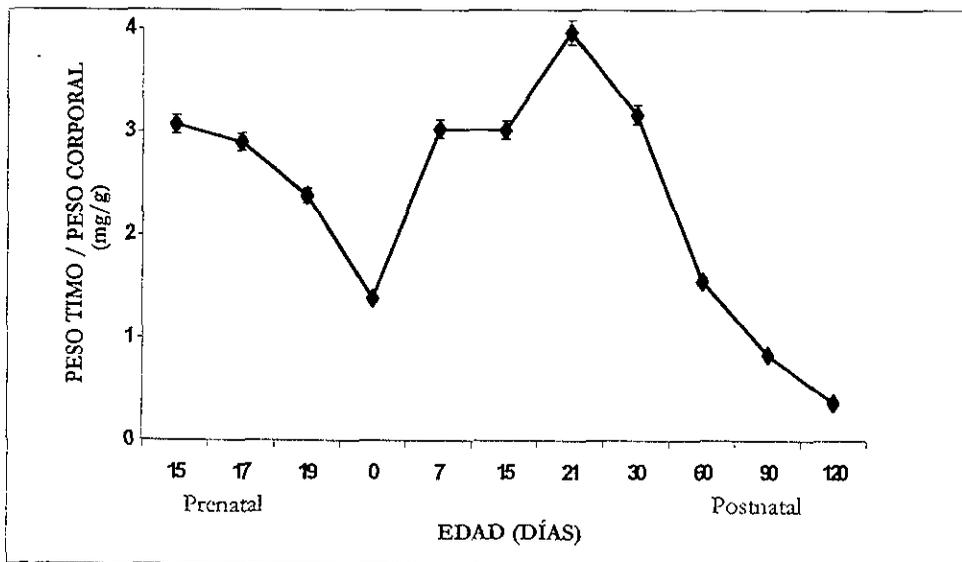
En la gráfica 1a se observa el peso del timo con respecto a las distintas edades de las ratas estudiadas. Se observa que el peso del órgano se incrementa desde la etapa fetal hasta aproximadamente los 60 días de edad y después disminuye, pero sin llegar a desaparecer a los 120 días de edad de la rata.



Gráfica 1a. - Peso del timo de rata de distintas edades. El peso del timo de 5 ratas de cada una de las distintas edades estudiadas fue evaluado. Se muestra el promedio \pm la desviación estándar respectiva (SD).

1.2. Relación peso timo / peso corporal:

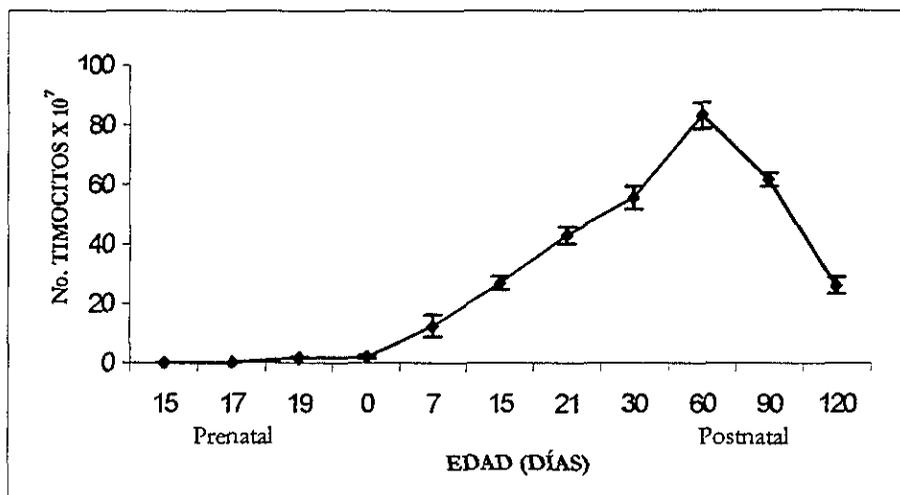
En la gráfica 1b se muestra la relación entre el peso del timo con respecto al peso corporal del animal a las distintas edades estudiadas. Llama la atención que en la etapa fetal el timo tenga un tamaño relativo mayor a los 15 días de la gestación, y que éste disminuya hasta el momento del nacimiento. El tamaño relativo máximo del timo se presenta aproximadamente a los 21 días de vida extrauterina, pero después presenta una disminución importante, incluso antes de la pubertad del animal (45-60 días)



Gráfica 1b.- Relación peso timo / peso corporal de las ratas de distintas edades. La tasa de crecimiento del timo fue evaluado con relación al peso corporal de las ratas de las distintas edades. Cada valor expresa la media \pm la desviación estándar respectiva de al menos 5 animales.

1.3. Cantidad total de timocitos:

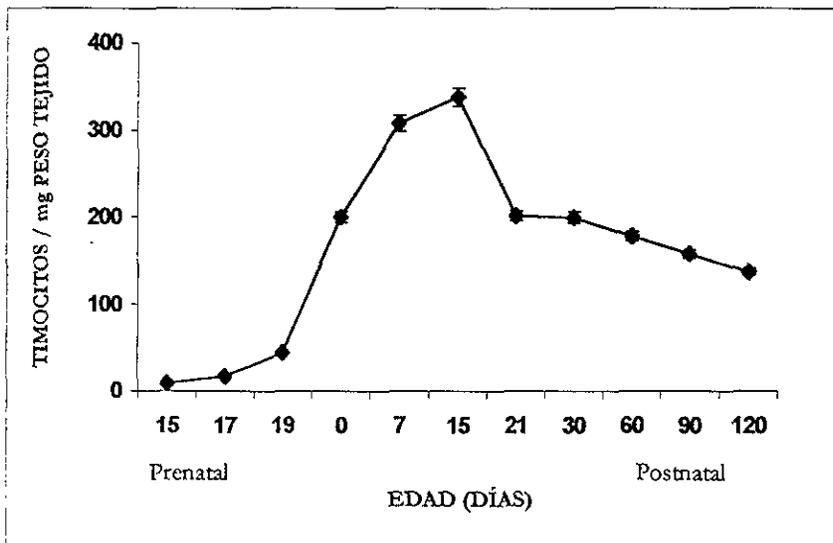
En la gráfica 1c se observa el total de células obtenidas en cada timo de las distintas ratas estudiadas, se observa básicamente el mismo comportamiento de la curva que en el peso del timo. Conforme aumenta la edad de las ratas aumenta la cantidad de células y al llegar a los 60 días de edad ésta disminuye.



Gráfica 1c.- Total de timocitos de ratas de distintas edades. Las células se obtuvieron haciendo pasar el tejido a través de una malla, se lavaron con PBS y se cuantificaron determinando viabilidad con azul tripán. Se muestra el promedio \pm la desviación estándar respectiva de 5 timos de las distintas edades estudiadas.

1.4. Timocitos por miligramo de peso de timo:

En la gráfica 1d se observa la relación de células por mg de peso de timo de las ratas de distintas edades. Se ve que la mayor densidad de células por mg de peso de timo se presenta alrededor de los 21 días de edad, observándose así mismo que la cantidad de células/mg de peso de tejido en ratas adultas es similar al de las ratas recién nacidas.



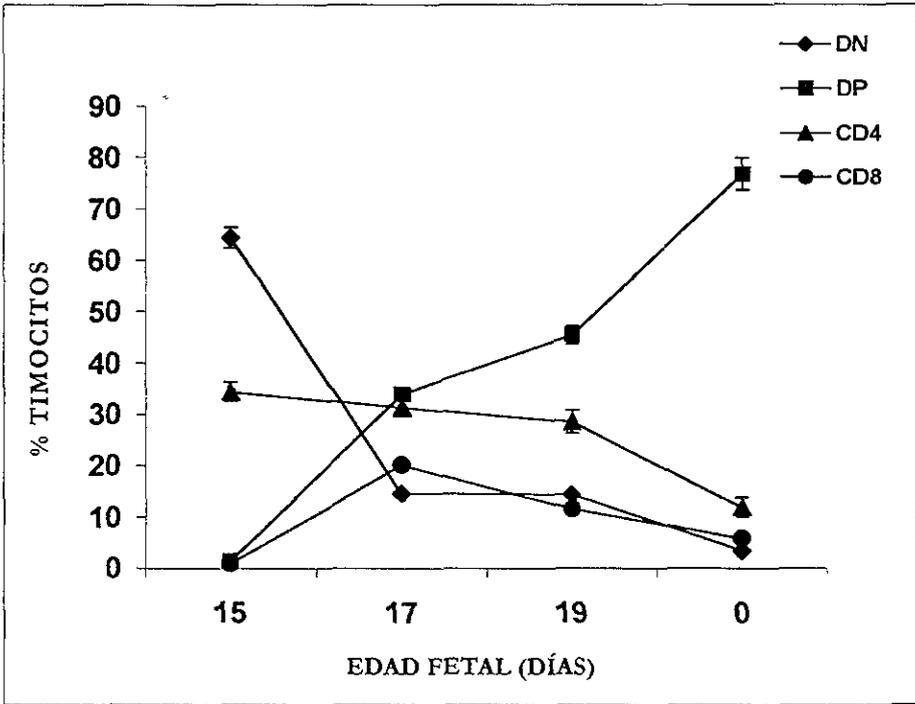
Gráfica 1d.- Timocitos por mg. de peso de tejido tímica de ratas de distintas edades. Relación timocitos / peso timo en cada una de las ratas de distintas edades estudiadas. Se muestra el promedio \pm la desviación estándar respectiva de 5 timos de las distintas edades estudiadas

2. - Caracterización fenotípica de la población de timocitos de las ratas de distintas edades:

Los timocitos fueron caracterizados fenotípicamente basándose en la expresión de los antígenos CD4 y CD8 en las ratas de las distintas edades. Los resultados obtenidos muestran como se esperaba, los cuatro grupos de poblaciones celulares como son: CD4-CD8-, CD4+CD8+, CD4+CD8- y CD4-CD8+.

2.1. Análisis fenotípico de la población total de timocitos de ratas fetales:

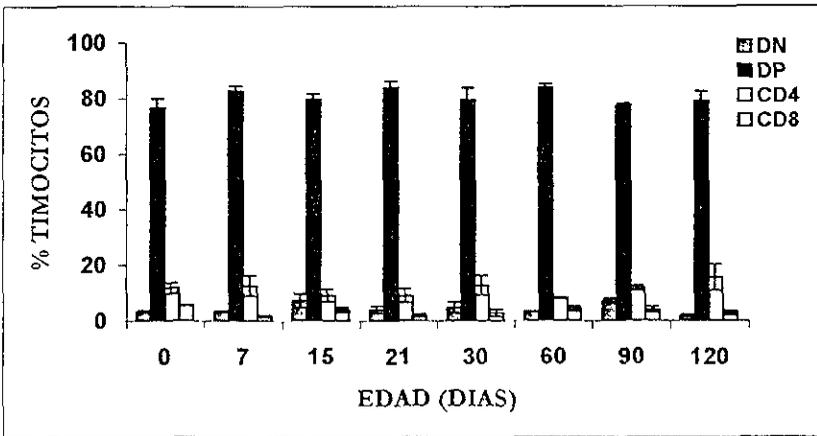
Como se puede observar en la gráfica 2a, las poblaciones de células que expresan los antígenos CD4 y CD8 durante la etapa fetal está cambiando. A los 15 días de gestación se observa una población que expresa CD4; a los 17 días se observan ya las cuatro poblaciones que se presentan en el adulto: CD4+, CD8+, DP, y DN. Al parecer las células CD4 detectadas el día 15 se convierten en DP. Al día 19 de gestación, predomina la población de células DP, mientras que la población de CD4 disminuye. En los animales recién nacidos se presenta una distribución de las poblaciones similar a la del adulto.



Gráfica 2a - Expresión de antígenos CD4 y CD8 de timocitos de ratas fetales. 5X10⁵ timocitos de ratas fetales fueron incubados simultáneamente con anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD4:FITC y CD8:RPE, fueron analizados mediante citometría de flujo de dos colores. Se muestra el promedio de tres ensayos por duplicado \pm la desviación estándar respectiva.

2.2. Análisis del fenotipo de la población total de timocitos de ratas de distintas edades:

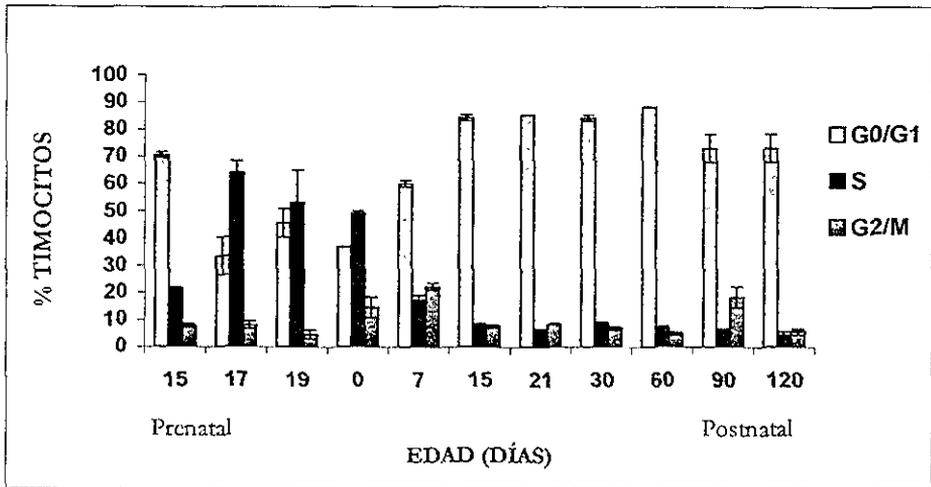
En la gráfica 2b se puede comparar la distribución de las cuatro poblaciones de timocitos que expresan los antígenos CD4 y CD8. No se observan cambios significativos a las diferentes edades postnatales estudiadas. Se observa que alrededor del 80% del total de los timocitos son DP, y menos del 5% son células DN. Alrededor del 15% del total corresponden a células SP, destacando que la población de CD4 es mayoritaria con respecto a CD8, en una relación de casi 2 a 1.



Gráfica 2b.- Poblaciones de timocitos de ratas de distintas edades que expresan los antígenos CD4 y CD8. 5×10^5 timocitos de ratas de distintas edades (post-natales) fueron teñidos con anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD4: FITC y CD8: RPE, analizadas por citometría de flujo de dos colores. Se obtuvieron los promedios de cinco ensayos oor duplicado \pm la desviación estándar respectiva.

3. - Análisis del contenido de ADN y ciclo celular:

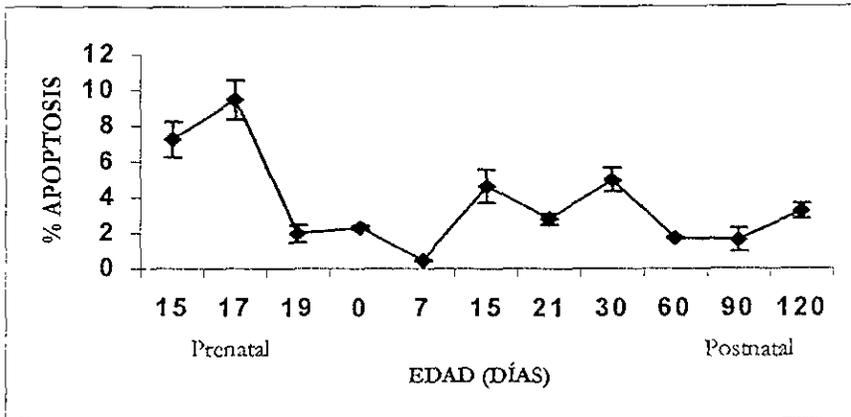
En la gráfica 3a se muestran los datos del contenido de ADN y ciclo celular obtenidos de los timocitos de la población total de ratas de distintas edades (etapa fetal-etapa adulta). Se observó que el contenido de ADN fue normal en todas las células, es decir todas fueron diploides. Se ve que en las etapas fetales se presenta una muy alta proporción de células en la fase de síntesis del ciclo celular, especialmente el día 17. Calculando la actividad proliferativa (S+G2+M) se observa que permanece cercano al 50-60% del día 17 al día del nacimiento. A los 7 días de vida postnatal la actividad proliferativa detectada fue de casi el 66% de la observada en la etapa fetal; y a los 15 días de vida postnatal se alcanzan los valores de la actividad proliferativa del adulto, la cual es alrededor del 5%.



Gráfica 3a.- Contenido de ADN de la población total de timocitos de ratas de distintas edades. 5×10^5 células de la población total de ratas de distintas edades fueron teñidas con Ioduro de Propidio y analizadas mediante citometría de flujo. Se analizó el histograma de área FL2 mediante el método matemático RFIT. Las barras muestran el promedio de cinco ensayos por duplicado \pm la desviación estándar respectiva.

4. - Análisis de apoptosis:

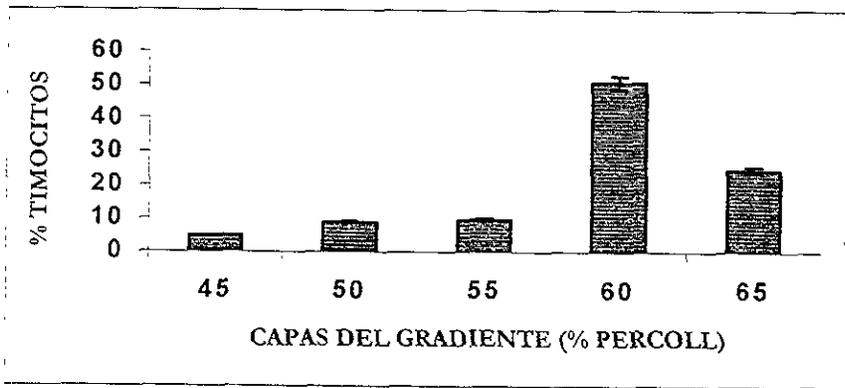
En la gráfica 4a se muestran los resultados obtenidos de la cantidad de timocitos de la población total de ratas de las distintas edades, que se encuentran en apoptosis. Se observa que en todas las edades los porcentajes son variables, se ve que el mayor porcentaje en timocitos en apoptosis es el de 17 días de gestación y en menor porcentaje las de 7 días de edad



Gráfica 4a.- Porcentaje de timocitos de la población total de ratas de distintas edades en apoptosis. 5×10^5 células de la población total de ratas de distintas edades fueron teñidos con 7-AAD y analizados por citometría de flujo. Se muestra el promedio de cinco ensayos por duplicado \pm la desviación estándar respectiva

5. - Distribución de timocitos en el gradiente de percoll:

En la gráfica 5a se observa la distribución de los timocitos de ratas de distintas edades en el gradiente discontinuo de percoll. Se ve que alrededor del 52% de los timocitos quedaron en la capa del 60% de percoll, seguido de un 25% de timocitos en la capa del 65% de percoll; se observa también que menos del 10% de los timocitos son de menor densidad.



Gráfica 5a.- Distribución de timocitos en el gradiente de Percoll : Timocitos de ratas de distintas edades fraccionados por gradiente discontinuo de percoll con una concentración del 45, 50, 55, 60, y 65% de densidad. Cada valor representa el promedio \pm la desviación estándar de los timocitos en cada una de las edades de las ratas.

En lo que se refiere a los resultados de la caracterización de los antígenos CD4 y CD8, análisis de ciclo celular y apoptosis de las subpoblaciones de timocitos obtenidos por gradiente de percoll en las ratas de las distintas edades, se describen en el Anexo, donde se muestran tablas con los datos obtenidos en cada capa del gradiente, y de cada edad de las ratas estudiadas

V.- DISCUSIÓN

El estudio del proceso de desarrollo de los linfocitos T en la rata desde la etapa fetal hasta la etapa adulta no ha sido aún bien establecido, por lo que en el presente trabajo se realizó un estudio de éstas células del timo en rata

Se estudió la ontogenia del órgano desde el punto de vista de masa, cantidad total de células, células por masa de tejido y la relación del peso del timo con respecto al peso corporal de ratas de distintas edades (fetales, neonatales, puberales y adultas); así mismo se caracterizaron fenotípicamente las poblaciones de timocitos en base a la expresión de los antígenos CD4 y CD8, se cuantificó el contenido de ADN y ciclo celular, así como la cantidad de células que mostraban apoptosis; para lo cual se utilizó una de las técnicas más modernas en inmunología como es la citometría de flujo, la que permitió medir éstos parámetros con mayor eficiencia que con las técnicas comunes.

Hasta el conocimiento actual, el timo actúa como una “caja negra” en el proceso de diferenciación y maduración de los linfocitos T. Se conoce que entran células precursoras y salen linfocitos maduros y competentes, desde el punto de vista inmune; pero aún no se conoce todo el proceso de maduración, ni los factores que lo realizan (Nicolic-Zugic, 1991)

Se conocen una serie de eventos que influyen en el resultado final de éste proceso, entre los cuales se encuentra la cantidad de células que entran, la proliferación de las células dentro del timo, las células que emigran del timo hacia los órganos linfoides secundarios y además la muerte celular programada ó apoptosis (Curnow *et al*, 1994 y Anderson *et al*, 1996)

Se sabe también que el proceso de diferenciación y maduración de los linfocitos T es complicado, ya que necesitan de la influencia de microambientes tímicos adecuados, lo que implica una serie de eventos como son proliferación celular, diferenciación celular y muerte

celular por apoptosis. La diferenciación involucra rearrreglo de los genes del TCR, cambios fenotípicos en la expresión de receptores (TCR, IL-2, etc) y correceptores (CD4 y CD8), y finalmente la adquisición de competencia inmune (Ewijk, 1991 y Hadden, 1992).

Es importante conocer más sobre el proceso de diferenciación y maduración de los linfocitos del timo así como la presencia de los marcadores de superficie que los distingue de otras células, ya que esto nos permite identificar las etapas de diferenciación a través de las cuales pasan los linfocitos hasta alcanzar su madurez ó más aún el estado funcional en el que se encuentran, además de que el caracterizar la población de timocitos en el transcurso de la vida, desde la etapa fetal hasta la senectud puede proporcionar datos que nos permiten entender el envejecimiento del sistema inmune y la presencia de enfermedades autoinmunes y/o degenerativas en las etapas seniles. Para llevar a cabo el presente trabajo, se eligió como modelo experimental a la rata debido a que la mayor parte de los estudios de los linfocitos están hechos en ratón, y es importante conocer éstos procesos en otras especies animales.

Como se mencionó anteriormente el timo es el mejor sitio de maduración de los linfocitos T, desde los progenitores hematopoyéticos hasta el producto final que son los linfocitos T maduros, los cuales son diferenciados para efectuar y permitir la expresión de receptores que dirigen la respuesta inmune así como la entrada a los órganos linfoides secundarios (Adkins *et al*, 1987); aunque también se menciona que algunos linfocitos T no requieren del timo para su desarrollo (maduración extratímica) El desarrollo extratímico se da principalmente en el intestino y el hígado, observándose una cantidad de linfocitos intestinales intraepiteliales que expresan cadenas α/α CD8, lo que demuestra el desarrollo extratímico; otros estudios más recientes revelan que los linfocitos T en desarrollo extratímico tanto en bazo como en hígado expresan IL-2R β así como niveles de CD3; aunque esto aún no ha sido bien aclarado (Yamada *et al*, 1998)

Para éste trabajo se decidió utilizar timocitos de ratas de distintas edades, desde la etapa fetal y neonatal hasta la etapa adulta, en la literatura se describe el uso de timocitos fetales y neonatales debido a que en esas etapas se lleva a cabo la mayor actividad

linfocitaria y por lo mismo la principal producción y maduración de los linfocitos T, el uso de timocitos de animales adultos ha sido aún más claro. El propósito de este trabajo era realizar un seguimiento de las distintas etapas por las cuales pasan los linfocitos del timo desde la etapa fetal hasta la etapa adulta en una sola especie que es la rata. La rata ha sido utilizada en diversos experimentos pero muy pocos sobre el estudio del proceso de maduración de los linfocitos T (Ming *et al*, 1992; Takimoto *et al*, 1992 y Tsuchida, 1994).

El timo es el primer órgano linfoide que se desarrolla en las aves y en la mayor parte de los mamíferos, se ha visto que el timo es una glándula que involuciona tanto en animales como en el humano, esta atrofia tímica está relacionada con la edad; además se conoce que el timo en el humano tiene su máximo tamaño en relación al cuerpo en la etapa neonatal y después de la pubertad disminuye su tamaño y peso. En el adulto el tejido tímico ha sido substituido en su mayor parte por grasa y se observa depleción de los linfocitos (Reyes, 1989).

Debido a que todavía se tiene la idea de que el timo desaparece con la edad ó después de la pubertad, en el presente estudio se corroboró esto, observando que el timo no desaparece aún en la etapa adulta temprana.

De acuerdo a los resultados obtenidos del estudio de la ontogenia del timo, se observó que en lo que se refiere al peso del órgano de las ratas de las distintas edades, es que conforme aumentaba la edad de las ratas el peso del timo se incrementó, durante la etapa fetal el aumento no fue tan pronunciado, pero al llegar al nacimiento el peso del timo se incrementó a casi el triple y después siguió aumentando, hasta llegar a los 60 días de edad llegó al máximo de su crecimiento y después disminuyó en las siguientes edades, pero sin desaparecer a los 120 días, ésto se atribuye a la acción de los esteroides sexuales sobre el órgano, lo cual induce al órgano a involucionar ya que éste proceso coincide con la pubertad en los animales (60-80 días)

En lo que se refiere a la relación que existe entre el peso del timo y el peso corporal, se pudo observar que al hacer la valoración de la tasa de crecimiento del timo de acuerdo al peso del cuerpo de las ratas, es que el peso relativo máximo es al día 15, y decrece hasta el día del nacimiento, después del cual se incrementa hasta el día 21, en el cual inicia su descenso. Estos resultados difieren enormemente de los reportados por el ratón y humano, en los que se describe que el órgano tiene el peso relativo máximo al nacimiento. (Cardarelli, 1989).

También se vio que el timo con respecto al cuerpo crecen a velocidades distintas, llegando a su peso máximo el timo antes de que lo haga el peso corporal. Llama la atención que el timo vaya disminuyendo su tamaño relativo con el avance de la gestación, hasta el nacimiento, donde se presenta un incremento del órgano.

En cuanto a la cantidad total de timocitos en cada una de las edades estudiadas se observó básicamente el mismo patrón que se da en el peso del timo, ya que durante la etapa fetal se encontraron pocas células.

Finalmente, en lo que se refiere al total de timocitos por miligramo de peso de tejido pudimos observar que la máxima cantidad de células por mg de timo se presentó a los 21 días de edad, lo cual se atribuye a que a esa edad el timo se encuentra en una mayor actividad y por tanto se requiere de la presencia de una mayor cantidad de células por mg de timo. Se observó además que la cantidad de células por mg de peso de tejido en las ratas adultas (120 días) la cual ha sufrido el proceso de involución es similar a la cantidad de células por mg de timo de las ratas recién nacidas, esto se debe a que en el timo de las ratas recién nacidas la mayor parte de las células que presenta son linfocitos y en el timo adulto éstos linfocitos se han ido substituyendo por tejido adiposo y fibroso, y la cantidad de linfocitos que en ésta edad se encuentran es muy poca.

Los resultados obtenidos del análisis de la ontogenia del timo de las distintas edades de las ratas estudiadas coinciden en lo general con los datos obtenidos por Tsuchida *et al*,

(1994), que utilizaron ratas de aproximadamente 322 gr (aprox. 50-60 días) y se encontró que el timo pesó alrededor de 417 mg y se obtuvieron alrededor de 1070×10^6 de células en total. Igualmente en estudios de Ming *et al*, (1992), quienes utilizaron ratas de 24 meses (viejas) y ratas de 2 meses (jóvenes), vieron que había un bajo peso significativo en ratas viejas a diferencia del de las ratas jóvenes, donde el peso del timo era mayor (en ratas jóvenes pesó alrededor de 280 mg y en ratas viejas aprox. 50 mg), lo mismo sucedió con la cantidad de células puesto que en los timos de las ratas jóvenes se encontraron 470×10^6 , mientras que en los timos de las ratas viejas se encontraron aprox. 25×10^6 de células en total, éstos resultados fueron asociados con la involución tímica. Cabe mencionar que se ha visto que a pesar de que el timo involuciona con la edad continúa funcionando incluso en la ancianidad y no desaparece.

Durante años se ha llevado a cabo el estudio bioquímico y biofísico de las células por medio de la histoquímica analizada mediante microscopía óptica y electrónica; hoy en día han cobrado importancia éstos estudios realizándose por métodos inmunohistoquímicos y análisis celulares a través de la citometría de flujo

La citometría de flujo ha surgido recientemente como una importante herramienta clínica para los oncólogos e inmunólogos, debido a que con ésta técnica se pueden analizar las propiedades de células individuales, exponiéndolas en una sola fila a un haz de luz excitador

Algunas de las medidas que se pueden hacer con el citómetro de flujo son características físicas como tamaño, volúmen, índice de refracción y fluorescencia, y características químicas como contenido de ADN y ARN, proteínas y enzimas

Algunas de las aplicaciones inmunológicas incluyen el análisis y separación de subpoblaciones de células T unidas a anticuerpos monoclonales conjugados con algún fluorocromo, se pueden separar varias clases de células linfoides por el tamaño y marcador de anticuerpo, la separación de células vivas y muertas así como identificación individual de

células en apoptosis, y se puede hacer análisis de la cinética del ciclo celular mediante diversas tinciones del ADN, entre otras más.

El citómetro de flujo se encuentra conectado a un sistema computacional el cual se utiliza para analizar los múltiples parámetros que se miden simultáneamente, incluyendo fluorescencia de dos colores; además se pueden analizar éstos parámetros mediante programas sofisticados de software. Las técnicas de citometría de flujo están basadas en el uso de fluorocromos que permiten realizar análisis y discriminación detallada de poblaciones celulares heterogéneas (Zackon, y Goolsby, 1995)

Algunos anticuerpos monoclonales se encuentran conjugados con fluorocromos y se unen a la superficie de las células en estudio, en éste trabajo se utilizaron anti-CD4 conjugado con fluoresceína (FITC) y anti-CD8 conjugado con ficoeritrina (RPE), mientras que otros fluorocromos se aplican directamente a la suspensión celular, en nuestro caso utilizamos yoduro de propidio (IP) y 7 amino-actinomicina (7-AAD) para el análisis de ciclo celular y apoptosis respectivamente

Los primeros de ellos fueron los utilizados en éste trabajo para el estudio del proceso de diferenciación y maduración de los linfocitos del timo, en donde se evaluó la expresión de los correceptores CD4 y CD8, lo cual permitió distinguir 4 poblaciones ó etapas de timocitos que fácilmente pueden ser identificadas mediante la citometría de flujo de dos colores, éstas etapas son las células dobles negativas (DN), células dobles positivas (DP), células simples positivas CD4 y células simples positivas CD8 (SP)

Para medir las proporciones de las poblaciones celulares que expresan los antígenos se realizó una gráfica de puntilleo donde se graficó la fluorescencia correspondiente a CD4 (FITC) contra la correspondiente a CD8 (RPE), lo cual permitió dividir ésta gráfica en cuatro cuadrantes en donde cada uno representó a cada una de las 4 poblaciones de timocitos descritas para el timo (CD4-CD8-, CD4+CD8+, CD4+CD8-, CD4-CD8+).

Uno de los objetivos de éste trabajo fue el de caracterizar fenotípicamente las poblaciones de timocitos de ratas de distintas edades basándose en la expresión de los antígenos CD4 y CD8.

En los resultados obtenidos de los timocitos fetales (15, 17 y 19 días de gestación) así como los de recién nacidos, pudimos observar que las proporciones de las poblaciones celulares son heterogéneas, se vió en los timocitos de ratas de 15 días de gestación que la mayor parte de ésta población son células inmaduras ó DN, pero ya se expresa el antígeno CD4, al ir aumentando la edad comienza a expresarse CD8 ó ambos antígenos, la población de células DP aumenta conforme aumenta la edad alcanzando ésta población el mayor porcentaje (80%) en los timocitos de las recién nacidas, y las células DN disminuyen hasta un 5% del total.

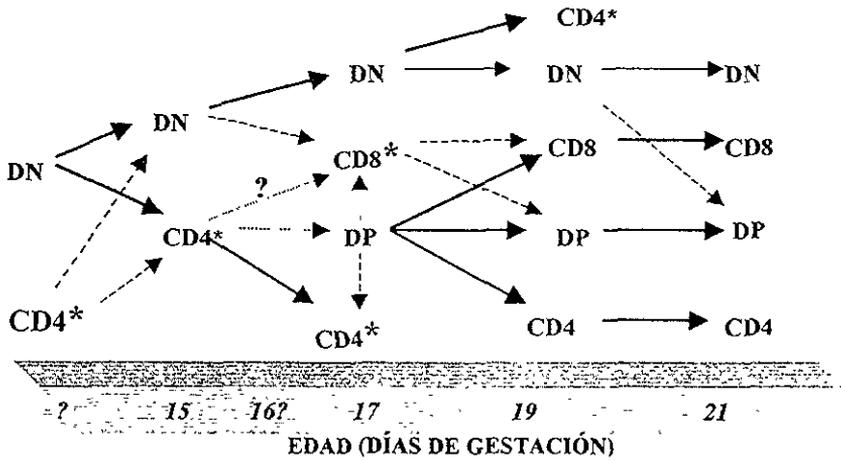


FIG. 9.- Esquema donde se muestran las etapas de diferenciación celular en el timo de ratas fetales. Se muestra como van apareciendo las distintas poblaciones celulares a lo largo de la etapa fetal en el timo de la rata, vemos como el CD4 es el primero en aparecer durante la etapa fetal (15 días), seguido de el CD8 a los 17 días. Las flechas oscuras indican la forma "establecida" por la que pasan los timocitos, y las flechas punteadas indican las posibilidades que se pueden presentar durante la maduración de los timocitos. Los asteriscos indican células maduras.

La primera de las moléculas estudiadas en expresarse es el CD4, al día 15 de la gestación en aproximadamente el 40% de la población. La molécula CD8 fue detectada a

partir del día 17 de gestación en células dobles positivas y células simples positivas, lo cual no era de esperarse, pues esperábamos que se expresara solo en células dobles positivas. Parece que la población que ya expresaba CD4 inició la expresión de CD8, pero además aparece una población que solo expresa CD8. Al llegar al nacimiento se presenta una población de las poblaciones celulares similar a la que se presenta en el adulto.

Es necesario analizar la expresión de éstos antígenos en animales de 16 días de gestación, para conocer si a esa edad sólo se detectan células dobles positivas y las células CD8 provienen de ellas (Fig 9).

Según Kampinga y Aspinall en 1990, (citado por Aspinall *et al* en 1991) en un estudio inmunohistológico en el que estudiaron las distintas etapas de la gestación de la rata observaron que el CD8 aparecía primero que el CD4 a los 17 y 18 días de gestación respectivamente, la diferencia entre éstos datos y los nuestros puede deberse al tipo de análisis realizado, o bien a la cepa de ratas utilizadas, así como las condiciones en que se mantuvieron, etc.

En otros estudios hechos en ratones está descrito que a los 16 y 17 días de gestación sólo hay niveles muy bajos de CD4 y CD8, y es hasta los días 17 y 18 de gestación donde ya se expresan altos niveles de CD4 y CD8, y representan células DP, a los 18 días de gestación el primero que deja de expresarse es el CD8 y solo se expresa el CD4, y a los 19 días de gestación solo se expresa el CD8 (Fairchild *et al*, 1995).

En lo que se refiere a los datos obtenidos de los timocitos de las ratas de las otras edades, es decir después del nacimiento (0, 7, 15, 21, 30, 60, 90 y 120 días de edad) se pudo observar que al hacer la caracterización de los antígenos CD4 y CD8 se observaron las cuatro poblaciones celulares, (Fig 6) Observamos que en todas las edades la mayor parte de la población de timocitos son DP y que junto con la población de DN alcanzaron alrededor del 85% del total, lo cual era de esperarse en base a lo descrito en la literatura y

así confirmar que en el timo la mayor parte de la población son timocitos inmaduros que se encuentran en procesos de maduración y diferenciación

En lo que se refiere a las células maduras ó SP se observó que éstos alcanzaron alrededor del 15% del total, destacando que la población de CD4 es mayoritaria con respecto a CD8, en una relación de casi 2:1, (Paul, 1998). También se vió que las cuatro poblaciones celulares se mantienen constantes durante toda la vida de la rata después del nacimiento. Estos resultados son similares a los obtenidos por Tsuchida *et al* (1994), quienes trabajaron con timocitos de ratas de aprox. 77 días de edad, y caracterizaron las cuatro poblaciones por citometría de flujo, para encontrar que la población de células DN fue de alrededor del 2.6%, el 80% para las células DP, el 10% para las células CD4 y el 7.4% de células CD8.

Por lo que se vió existen pocas diferencias entre éstos resultados y los nuestros los cuales pueden deberse también a variaciones biológicas, a la cepa de ratas mantenidas en distintas condiciones de bioterio, al manejo de las mismas, etc. En otros resultados, Ming *et al*, (1992) estudiaron timocitos de ratas viejas y jóvenes y no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de células SP dentro del timo, obtuvieron en ratas jóvenes aproximadamente el 11% de CD4 y el 5% de CD8, mientras que en ratas viejas fue de 9% de CD4 y 4.7% de CD8. Con éstos resultados queremos decir que la relación de la expresión de CD4 y CD8 se mantiene constante durante toda la vida.

Como se mencionó anteriormente dentro del proceso de diferenciación y maduración de los linfocitos T en el timo, ocurren diversos eventos que se involucran en el paso final del proceso, entre ellos se encuentran la proliferación celular y la muerte celular programada ó apoptosis, entre otros. Estos eventos ocurren durante toda la vida del animal, pero en lo que se refiere a la proliferación celular durante la etapa fetal y neonatal se presenta una mayor actividad proliferativa ya que el timo está al máximo de su capacidad para la producción de células maduras (Linfocitos T), además de que en éstas etapas el individuo va a adquirir los mecanismos que le permitirán contar con una inmunidad adecuada, tanto para su

competencia y madurez como para la eliminación de clonas autorreactivas; cubriendo todo el espectro de posibilidades en cuanto a las afinidades del TCR, y por tanto generando así una suficiente cantidad de timocitos

En animales adultos la proliferación celular en el timo es menor, debido a que en el organismo ya se cuenta con una reserva de linfocitos T maduros circulantes y/o en los órganos linfoides secundarios, y las pocas células maduras que se están produciendo son útiles para compensar el desgaste de los linfocitos T en la periferia, o bien ésta producción sirve para reponer las células que no han entrado en contacto con el antígeno, y que mueren al finalizar su ciclo biológico (Cardarelli, 1989; Nicolic-Zugic, 1991 y Anderson *et al*, 1996).

En nuestro trabajo se estudió el contenido de ADN en timocitos de ratas de distintas edades y se analizó el ciclo celular de estos. Para medir este parámetro se realizó un histograma del contenido de ADN, donde se muestra el número total de células contra la distribución de las fases (G0+G1) /S/ (G2+M) del ciclo celular

De acuerdo a los resultados obtenidos de esta manera pudimos observar que todos los timocitos fueron diploides, es decir que tuvieron un contenido de ADN normal; se vio que durante la etapa fetal y neonatal la mayor parte de la población de timocitos se encuentra en la fase de síntesis (fase proliferativa) del ciclo celular, se vio que en las ratas fetales se presentó una alta proporción de timocitos en la fase de síntesis del ciclo celular, la cual fue disminuyendo poco a poco conforme aumentó la edad de las ratas

Se calculó la actividad proliferativa (S+G2+M) observándose que esta permanece alrededor del 50-60% durante la etapa fetal, siendo similar al de la etapa neonatal, después del nacimiento la actividad proliferativa disminuye considerablemente detectando a los 7 días de vida postnatal que esta actividad proliferativa fue de casi el 50% de la observada en la etapa fetal, a los 15 días de edad se alcanzan valores muy reducidos de síntesis de ADN, y de ahí en adelante la proliferación celular es muy baja, alcanzando solamente alrededor de un

5% de total en los timocitos de ratas de 120 días de edad. Por tanto se corroboró que los timocitos están proliferando durante toda la vida pero con una mayor abundancia en la etapa fetal y neonatal en comparación con otras células; siendo ésta proliferación parte esencial de la maduración de los timocitos

Con respecto a la muerte celular programada ó apoptosis, se menciona que una parte importante de los linfocitos del timo se pierden por este mecanismo; se ha visto que las células deben perderse continuamente en muchos tejidos normales para equilibrar la división celular, pues de lo contrario cuando éste equilibrio se altera puede surgir la expansión de células tumorales.

En el sistema inmune la apoptosis lleva a cabo un papel fisiológico especial que es exclusivo de los requerimientos funcionales del sistema; en el timo, los timocitos inmaduros muestran apoptosis cuando son estimulados por el TCR en un estado crítico en la maduración, y se ha propuesto que éste mecanismo es responsable para la eliminación de clonas de células T autorreactivas durante el desarrollo de la misma tolerancia inmune celular, por lo que la muerte celular programada es esencial para el desarrollo intratímico normal de la célula T y de la tolerancia del timo (Cohen y Duke, 1992).

La apoptosis es un mecanismo importante para la eliminación selectiva de células, éste proceso es distinto al de la muerte celular patológica ó necrosis. Las características de la apoptosis son la contracción de la célula, la fragmentación del ADN en nucleosomas y la fragmentación del núcleo (cariopicuosis) La apoptosis en timocitos es a veces inducida por activación, es decir que es probable que varias enzimas como las nucleasas medien la muerte celular, y se activen por las señales generadas por el TCR (Kerr y Harmon, 1991; Vitale, *et al*, 1993; y Kerr, *et al*, 1994)

Para conocer la cantidad de células apoptóticas se realizaron gráficas de puntilleo en las que se graficó el tamaño de las células contra la fluorescencia correspondiente a 7-AAD,

las cuales permitieron marcar la región correspondiente a las células apoptóticas, que se determinó con el control de cortisona, previamente descrito en la metodología (Fig. 8)

Al hacer la cuantificación de los timocitos de las ratas de distintas edades que desarrollaron apoptosis, se pudo observar que a los 17 días de gestación se presenta el mayor porcentaje de células apoptóticas (10%), durante la etapa fetal y neonatal se presenta un porcentaje más o menos elevado de células en apoptosis, los 17 días de gestación coinciden con la aparición de la segunda fase de selección una vez que los timocitos expresan los valores α del TCR, y probablemente esto se debe a que como hay una elevada proliferación celular en ésta etapa gran parte de las células se está muriendo, si lo comparamos con los resultados de la caracterización de antígenos vemos que la mayor parte de los timocitos son inmaduros ó DN, y la muerte celular también se da en ésta etapa.

Estos resultados coinciden con lo descrito en la literatura donde se menciona que al ocurrir una intensa selección del repertorio de células T dentro del timo lleva a un alto porcentaje de muerte celular programada ó apoptosis, lo cual se ha observado dentro de la corteza donde se localizan los timocitos inmaduros; además se menciona que la etapa intratímica de las células T en desarrollo se caracteriza tanto por una tasa elevada de proliferación como de muerte celular (von Bohemer, 1990)

Otro resultado que nos llamó la atención es el porcentaje de células apoptóticas en el timo de ratas de 15, 21 y 30 días de edad, donde se presenta también un porcentaje más o menos elevado, ésto puede deberse a que durante éstas etapas todavía aún no se ha completado totalmente el desarrollo del timo, ya que como se había mencionado anteriormente el timo en la rata termina su desarrollo después de la etapa neonatal, y probablemente la muerte celular que se presenta en éstas células de éstas edades puede deberse a que todavía se está llevando a cabo una proliferación celular aunque en menor intensidad.

Otro dato es el obtenido en las ratas de 120 días de edad donde también se presenta un porcentaje más o menos elevado de células en apoptosis, debido tal vez al proceso de involución del timo, y por tanto se ha llevado a cabo la pérdida crítica de los linfocitos corticales, sustituyéndose por células adiposas y fibrosas, además éste proceso se debe a la acción de los esteroides sexuales sobre el timo; y esto es lo que hace que la muerte celular programada se lleve a cabo en ésta edad de la rata con éste porcentaje.

Se menciona en la literatura que más del 95% de los timocitos que se encuentran en la corteza mueren antes de alcanzar la médula, y por tanto menos del 5% de los timocitos salen del timo como linfocitos T maduros (Sebzda *et al*, 1994).

Finalmente al hacer la comparación de los distintos métodos medidos en el trabajo llama la atención que a los 60 días de edad de la rata, donde se encuentra el máximo tamaño del timo y la mayor cantidad de timocitos, exista una actividad proliferativa muy baja así mismo de células apoptóticas, esto probablemente se deba a que como en esa etapa ocurre el proceso de involución la síntesis celular se ve disminuida por el reemplazamiento de los timocitos por otro tipo de células, ya que comienza a contraerse el parénquima y se va reemplazando por tejido adiposo y fibroso.

Si lo comparamos con los datos obtenidos en la etapa fetal se observa lo contrario, es decir que a los 17 días de gestación hay una mayor actividad proliferativa y por tanto una mayor muerte celular, siendo que el tamaño del timo y la cantidad de células producidas en esta etapa es mucho menor, esto se puede deber a en esa etapa el individuo va a adquirir los mecanismos necesarios para llevar a cabo la maduración tímica que le servirán en la etapa adulta o bien después del proceso de involución.

Por otra parte Gatic *et al* (1975), Salisbury *et al* (1979) sugieren que la población de linfocitos T se puede dividir en dos categorías, las células grandes que constituyen aproximadamente del 15 al 20% del total de todas las células de rata de 1 a 2 semanas de edad, y las pequeñas del 70 al 80% del total

En nuestros resultados del análisis de tamaño contra granularidad en el citómetro de flujo de los timocitos de ratas de distintas edades pudimos observar básicamente lo mismo, ya que los timocitos de menor tamaño y granularidad representaron alrededor del 77% del total, mientras que los timocitos de mayor tamaño y mayor complejidad alcanzaron alrededor del 16% del total.

Se ha mencionado que en el timo los linfocitos que se encuentran en la corteza son mayoritarios y por lo tanto son células más inmaduras, más pequeñas y menos complejas; mientras que los linfocitos de la médula están en menor proporción, siendo éstas células maduras y por tanto con un mayor tamaño y una mayor complejidad.

Para la separación de los linfocitos en base a su densidad se han utilizado diversos métodos como son los gradientes de Ficoll, albúmina sérica bovina (BSA), o de suero fetal de ternera (FCS) que han mostrado relativamente buenos resultados; nosotros hemos hecho uso del gradiente de Percoll para la separación de timocitos y de acuerdo a nuestros resultados se ha visto que es una herramienta útil para la separación de éstas células así como la obtención de subpoblaciones enriquecidas de algunos subtipos de linfocitos.

Salisbury *et al* (1979) han utilizado el gradiente de percoll con éste fin, solo que ellos utilizaron dos concentraciones del mismo, mientras que nosotros utilizamos cinco, lo cual nos ha permitido tener una separación más fina de éstas células.

En los resultados obtenidos por éste método pudimos observar que la mayor parte de las células son muy densas ya que quedaron sedimentadas en las capas de mayor densidad (60 y 65% de percoll) mientras que un menor porcentaje quedaron en la capa del 45% de percoll, y en las capas restantes no se observó enriquecimiento de las células sino que se mostraron heterogéneas.

Los timocitos obtenidos de cada una de las capas del gradiente de percoll en cada una de las edades de las ratas estudiadas fueron tratados de igual manera que los timocitos

de la población total, es decir que fueron caracterizados fenotípicamente en base a los marcadores de superficie CD4 y CD8, se analizó el contenido de ADN y ciclo celular, y se cuantificó la cantidad de células en apoptosis, analizándose todos por citometría de flujo con los parámetros descritos.

Al hacer la caracterización de los antígenos CD4 y CD8 de éstas subpoblaciones se observó que los timocitos con mayor densidad, es decir los que se encontraron en la capa del 60 y 65% de percoll fueron timocitos dobles positivos (DP), y ésto podría deberse a que como son células que están en procesos de maduración tal vez se encuentran en etapas de división celular y es lo que las hace ser células más densas.

En lo que se refiere a las células DN se vió que el mayor porcentaje de éstas células se encontró en la capa del 45 y 50 % de percoll y por lo tanto son células menos densas, ésto se debe tal vez a que como son células inmaduras son células que tienen por tanto una menor densidad ya que aún no han adquirido las características que les permitan una mayor complejidad.

Con respecto a las células maduras ó simples positivas (SP) pudimos observar que ésta población se encuentra “dispersa” en todas las capas del gradiente de percoll sin observarse algún enriquecimiento en alguna de las capas. Estos resultados se observaron en todas las ratas estudiadas, y al hacer el análisis en cada una no se observaron diferencias significativas unas con respecto de otras (Ver ANEXO).

En lo que se refiere al análisis del ciclo celular de éstas células obtenidas por gradiente de percoll pudimos observar que la mayor parte de las células en etapa G0/G1 se encontraron en las capas de menor densidad, es decir entre la capa del 45 y 50% de percoll, ésto puede deberse tal vez a que como todavía no han cambiado ó duplicado su contenido de ADN es lo que las hace ser células menos densas, en cuanto a los timocitos que se encuentran en etapa de síntesis (S) y en etapa G2+M se encontraron en mayor proporción en las capas de mayor densidad 55, 60, y 65% de percoll, lo cual puede deberse a que como las

células que están en síntesis están comenzando a duplicar su contenido de ADN y además están proliferando, y los timocitos que están en G2+M ya han duplicado su contenido de ADN, y ésto es probablemente lo que las hace ser células más densas (Ver ANEXO).

Finalmente en lo que se refiere a la cantidad de células que se encuentran en apoptosis, con el gradiente de percoll se pudo observar que la mayor parte de la población de timocitos apoptóticos se encontraron conjuntadas en la capa de menor densidad, es decir en la del 45% de percoll, su baja densidad se debe al proceso de apoptosis que están experimentando, en donde se está condensando el citoplasma, se ha compactado la cromatina nuclear, se reduce el contenido de ADN y por lo mismo se reduce el tamaño y volúmen de la célula (Ver ANEXO).

VI.- CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos durante el estudio nos permiten concluir lo siguiente:

- El timo no desaparece después de la pubertad, cambia su histología ya que se observa menor cantidad de timocitos, el parénquima se reduce y se transforma en su mayoría en tejido adiposo, pero se sigue conservando aún en la etapa adulta.
- El peso máximo relativo del timo en la rata no se da en el nacimiento como está descrito para el ratón y el humano, es decir en este mamífero se alcanza a los 21 días después del nacimiento.
- La cantidad de timocitos disminuye después de los 60 días de nacimiento, momento en el cual comienza a disminuir el tamaño del timo
- El timo con respecto al peso corporal de la rata crece a velocidades distintas llegando a su peso máximo el timo antes de que lo haga el peso corporal.
- En las ratas adultas la cantidad de timocitos por miligramo de peso de timo es similar a la que se presenta en las ratas recién nacidas.
- Se mostró que en los timocitos de ratas fetales la presencia de la molécula CD4 es la primera de las estudiadas en expresarse a los 15 días de gestación, seguida de la expresión de CD8 a los 17 días de gestación
- Después del nacimiento se presentan las cuatro poblaciones celulares (CD4-CD8-, CD4+CD8+, CD4+CD8-, y CD4-CD8+), siendo la mayoría timocitos inmaduros que se encuentran en procesos de maduración y diferenciación.
- Las poblaciones celulares en el timo se mantienen constantes durante toda la vida de la rata, después del nacimiento.
- Durante la etapa fetal y neonatal se presenta una mayor actividad proliferativa, ya que el timo está al máximo de su capacidad para la producción de linfocitos T.
- La proliferación de timocitos en el adulto es baja debido a que en el organismo ya se cuenta con una reserva de linfocitos T maduros circulantes y/o en los órganos linfoides secundarios.
- En la etapa fetal se presenta una mayor cantidad de células apoptóticas, mientras que después del nacimiento éstas células son menores.

VII.- ANEXO.

TABLAS DONDE SE MUESTRAN LOS PORCENTAJES DE LAS CÉLULAS OBTENIDAS POR GRADIENTE DISCONTÍNUO DE PERCOLL EN LAS DISTINTAS EDADES DE LAS RATAS ESTUDIADAS, DE CADA UNO DE LOS MÉTODOS REALIZADOS EN ÉSTE TRABAJO.

(A). - Subpoblaciones de timocitos (CD4-CD8-, CD4+CD8+, CD4+CD8-, CD4-CD8+) de las ratas de distintas edades (etapa fetal – etapa adulta).

(B). - Distribución del contenido de ADN (Fases del ciclo celular en timocitos obtenidos por gradiente de percoll: G0/G1, S, G2+M), en cada una de las ratas estudiadas.

(C). - Análisis de apoptosis de las distintas subpoblaciones de timocitos obtenidos por gradiente discontinuo de percoll de ratas de distintas edades.

***Todos Los datos están representados en porcentaje de células (%). Y se muestran datos de al menos tres ensayos por duplicado \pm su desviación estándar respectiva.**

(A).- DISTRIBUCIÓN DE LOS DISTINTOS FENOTIPOS EN SUBPOBLACIONES DE TIMOCITOS OBTENIDOS POR GRADIENTE DISCONTÍNUO DE PERCOLL DE RATAS DE DISTINTAS EDADES.

EDAD: 15 DÍAS DE GESTACIÓN

% PERCOLL	CD8- CD4-	CD8+CD4+	CD4+CD8-	CD8+CD4
45	5,165±0,425	69,77±0,07	23,76±0,545	1,30±0,05
50	8,970±0,640	61,05±1,13	27,02±2,34	2,96±0,57
55	3,840±0,320	68,06±0,34	26,23±1,20	1,87±0,54
60	2,735±0,015	68,83±0,60	27,55±0,84	0,88±0,22
65	2,170±0,100	75,83±0,14	21,46±0,38	0,53±0,14

*Los valores promedio representan 3 ensayos diferentes por duplicado ± la desviación estándar respectiva.

EDAD: 17 DÍAS DE GESTACIÓN.

% PERCOLL	CD8- CD4-	CD8+CD4+	CD4+CD8-	CD8+CD4
45	15,525±1,45	64,990±1,06	16,29 ± 3,07	3,195±0,55
50	14,490±1,74	53,965±0,62	28,00 ± 1,67	3,525±0,55
55	8,760±0,90	63,285±0,49	23,26 ± 2,38	4,700±0,98
60	3,705±0,76	62,795±8,41	30,92 ± 7,23	2,580±0,42
65	24,730±7,75	59,885±6,65	13,75 ± 1,06	1,590±0,08

*Los valores promedio representan 3 ensayos diferentes por duplicado ± la desviación estándar respectiva.

EDAD: 19 DÍAS DE GESTACIÓN.

% PERCOLL	CD8- CD4-	CD8+CD4+	CD4+CD8-	CD8+CD4
45	9,715±0,995	76,69±1,76	4,170±0,175	9,415±0,935
50	5,020±0,000	84,95±0,08	2,090±0,050	7,945±0,250
55	1,995±0,091	89,55±0,50	1,175±0,025	7,290±0,390
60	2,275±0,075	85,32±0,08	2,205±0,205	10,195±0,045
65	4,245±0,21	78,96±0,72	3,065±0,085	13,735±0,425

*Los valores promedio representan 3 ensayos diferentes por duplicado ± la desviación estándar respectiva.

EDAD: RECIÉN NACIDAS.

% PERCOLL	CD8- CD4-	CD8+CD4+	CD4+CD8-	CD8+CD4
45	21 ± 0,52	53 ± 1,01	14 ± 1,83	12 ± 0,09
50	19 ± 0,02	49 ± 0,91	18 ± 0,77	13 ± 0,10
55	30 ± 0,50	38 ± 1,67	19 ± 1,28	13 ± 0,10
60	27 ± 0,05	40 ± 0,64	12 ± 0,15	20 ± 0,43
65	13 ± 0,59	60 ± 0,65	20 ± 1,35	7 ± 0,11

*Los valores promedio representan 3 ensayos diferentes por duplicado ± la desviación estándar respectiva.

EDAD: 7 DÍAS.

% PERCOLL	CD8- CD4-	CD8+CD4+	CD4+CD8-	CD8+CD4
45	7,11 ± 1,71	68,78 ± 3,16	21,58 ± 4,67	0,93 ± 0,07
50	10,77 ± 0,35	72,67 ± 0,36	14,52 ± 0,95	3,68 ± 1,17
55	12,81 ± 3,41	63,58 ± 0,51	16,69 ± 3,69	6,74 ± 0,25
60	5,17 ± 1,87	82,14 ± 5,93	8,59 ± 2,83	7,02 ± 2,76
65	2,20 ± 0,31	82,60 ± 3,64	7,19 ± 3,97	2,50 ± 0,76

*Los valores promedio representan 3 ensayos diferentes por duplicado ± la desviación estándar respectiva.

EDAD: 15 DÍAS

% PERCOLL	CD8- CD4-	CD8+CD4+	CD4+CD8-	CD8+CD4-
45	15.731 ± 8.56	64.23 ±13.88	14.396 ± 7.273	5.638±0.719
50	22.968 ± 10.41	54.69 ±16.50	13.036 ± 6.266	9.305±0.775
55	30.041 ± 12.58	41.96 ±15.09	18.695 ± 3.343	14.570±2.95
60	10.115 ± 4.40	70.24 ± 7.17	13.273 ± 6.433	6.376 ±3.36
65	9.228 ± 6.05	76.17 ± 6.22	12.168 ± 4.910	2.430±0.840

*Los valores promedio representan 3 ensayos diferentes por duplicado ± la desviación estándar respectiva.

EDAD: 21 DÍAS

% PERCOLL	CD8- CD4-	CD8+CD4+	CD4+CD8-	CD8+CD4
45	10.67 ± 4.25	3.29 ± 1.29	75.23 ± 14.1	10.68 ± 1.26
50	3.75 ± 6.59	22.35 ± 12.07	49.66 ± 8.13	4.22 ± 2.64
55	21.31 ± 6.48	28.63 ± 9.45	40.22 ± 7.37	9.82 ± 3.35
60	6.12 ± 0.3	71.51 ± 1.53	17.40 ± 0.64	4.94 ± 0.74
65	6.06 ± 2.20	72.29 ± 11.94	20.73 ± 9.87	4.54 ± 1.15

*Los valores promedio representan 3 ensayos diferentes por duplicado ± la desviación estándar respectiva.

EDAD: 30 DÍAS

% PERCOLL	CD8- CD4-	CD8+CD4+	CD4+CD8-	CD8+CD4
45	15.560 ± 7.64	63.345 ± 15.05	17.56 ± 7.95	3.52 ± 1.53
50	31.413 ± 2.20	28.415 ± 6.43	24.44 ± 6.60	15.73 ± 6.08
55	8.516 ± 4.08	67.871 ± 10.22	15.12 ± 2.52	10.65 ± 3.82
60	5.475 ± 2.94	80.798 ± 6.75	10.19 ± 2.95	3.53 ± 1.96
65	4.265 ± 1.00	86.930 ± 4.42	5.92 ± 1.51	4.03 ± 1.33

*Los valores promedio representan 3 ensayos diferentes por duplicado ± la desviación estándar respectiva.

EDAD: 60 DÍAS

% PERCOLL	CD8- CD4-	CD8+CD4+	CD4+CD8-	CD8+CD4
45	19.81 ± 2.23	61.75 ± 5.03	15.55 ± 4.54	2.878 ± 1.83
50	18.96 ± 4.53	50.09 ± 2.82	25.20 ± 3.07	5.730 ± 1.80
55	14.13 ± 2.89	43.65 ± 3.125	35.39 ± 5.19	6.821 ± 0.87
60	9.63 ± 2.10	49.97 ± 5.42	37.12 ± 4.91	3.273 ± 1.15
65	12.50 ± 3.03	42.86 ± 7.18	40.33 ± 5.24	4.213 ± 1.10

*Los valores promedio representan 3 ensayos diferentes por duplicado ± la desviación estándar respectiva.

EDAD: 90 DÍAS.

% PERCOLL	CD8- CD4-	CD8+CD4+	CD4+CD8-	CD8+CD4
45	6.38 ± 1.66	71.12 ± 0.73	20.61 ± 1.85	1.880 ± 0.44
50	11.66 ± 0.96	45.43 ± 6.49	38.21 ± 4.79	7.036 ± 0.683
55	3.62 ± 0.93	66.20 ± 4.65	23.85 ± 3.95	6.315 ± 0.240
60	1.50 ± 0.09	88.67 ± 2.73	7.19 ± 2.89	2.620 ± 0.24
65	2.50 ± 0.18	87.93 ± 2.70	7.77 ± 1.94	1.790 ± 0.70

*Los valores promedio representan 3 ensayos diferentes por duplicado ± la desviación estándar respectiva.

EDAD: 120 DÍAS.

% PERCOLL	CD8- CD4-	CD8+CD4+	CD4+CD8-	CD8+CD4
45	2.56 ± 2.20	89.64 ± 4.43	5.44 ± 2.20	1.97 ± 0.61
50	3.83 ± 1.50	79.65 ± 6.88	12.32 ± 4.74	4.19 ± 1.85
55	7.92 ± 2.03	50.61 ± 10.86	37.71 ± 17.39	7.06 ± 3.13
60	16.65 ± 5.60	39.87 ± 5.03	29.29 ± 1.79	15.33 ± 3.83
65	7.03 ± 2.63	76.15 ± 4.83	12.51 ± 4.07	4.29 ± 2.11

*Los valores promedio representan 3 ensayos diferentes por duplicado ± la desviación estándar respectiva.

(B).- ANÁLISIS DEL CONTENIDO DE ADN DE LAS DISTINTAS SUBPOBLACIONES DE TIMOCITOS OBTENIDOS POR GRADIENTE DISCONTÍNUO DE PERCOLL EN RATAS DE DISTINTAS EDADES.

EDAD: 17 DÍAS DE GESTACIÓN.

%Percoll	G0/G1	S	G2/M
45	70.25±1.75	25.70±4.10	7.56±0.98
50	59.00±0.0	37.00±0.02	2.40±0.00
55	51.20±2.3	41.95±4.55	6.85±2.15
60	63.55±3.75	27.90±2.6	8.50±1.10
65	58.45±4.95	33.70±5.8	7.85±1.20

*Los valores promedio representan 3 ensayos diferentes por duplicado ± la desviación estándar respectiva.

EDAD: 19 DÍAS DE GESTACIÓN.

%Percoll	G0/G1	S	G2/M
45	62.37±1.61	32.45±3.39	5.15±2.10
50	51.20±4.38	43.75±6.96	6.43±1.27
55	41.55±1.49	52.00±5.82	6.35±3.55
60	35.26±4.00	57.55±7.00	8.23±2.64
65	42.55±3.75	51.35±9.55	6.10±0.00

*Los valores promedio representan 3 ensayos diferentes por duplicado ± la desviación estándar respectiva.

****NOTA: Debido a la poca cantidad de timocitos obtenidos de las ratas de 15 días de gestación no se pudieron teñir con ioduro de Propidio para el análisis de ciclo celular.**

EDAD: RECIÉN NACIDAS.

%Percoll	G0/G1	S	G2/M
45	7,5 ± 0,71	88 ± 0,16	4,7 ± 0,67
50	42,0 ± 0,35	56 ± 0,36	1,3 ± 0,05
55	38,0 ± 0,41	58 ± 0,51	3,2 ± 0,69
60	33,0 ± 0,87	47 ± 0,93	19,0 ± 0,83
65	29,0 ± 0,31	32 ± 0,64	39,0 ± 0,97

*Los valores promedio representan 3 ensayos diferentes por duplicado ± la desviación estándar respectiva.

EDAD: 7 DÍAS.

%Percoll	G0/G1	S	G2/M
45	70.20 ± 0,40	12.80 ± 0,70	16.75 ± 3,6
50	75.30 ± 0,56	14.55 ± 1,48	13.10 ± 1,69
55	65.50 ± 0,42	22.65 ± 0,63	11.85 ± 1,06
60	72.40 ± 3,11	18.85 ± 0,21	5.85 ± 0,35
65	70.40 ± 2,97	12.90 ± 0,15	16.90 ± 0,25

*Los valores promedio representan 3 ensayos diferentes por duplicado ± la desviación estándar respectiva.

EDAD: 15 DÍAS.

%Percoll	G0/G1	S	G2/M
45	93.90 ± 0.30	4.00 ± 0.30	2.10 ± 0.0
50	88.30 ± 0.20	7.15 ± 0.55	4.55 ± 0.35
55	79.20 ± 0.50	11.95 ± 0.50	8.85 ± 0.55
60	79.95 ± 0.50	13.40 ± 0.20	6.65 ± 0.25
65	73.45 ± 5.55	17.55 ± 5.45	9.00 ± 0.23

*Los valores promedio representan 3 ensayos diferentes por duplicado ± la desviación estándar respectiva.

EDAD: 21 DÍAS.

%Percoll	G0/G1	S	G2/M
45	91.10 ± 0.60	3.45 ± 0.45	5.45 ± 1.05
50	85.15 ± 0.35	8.15 ± 0.55	6.75 ± 0.15
55	81.25 ± 0.65	10.70 ± 0.40	8.05 ± 0.25
60	80.90 ± 1.50	8.60 ± 2.0	10.40 ± 0.60
65	84.45 ± 0.05	10.30 ± 0.40	5.25 ± 0.45

*Los valores promedio representan 3 ensayos diferentes por duplicado ± la desviación estándar respectiva.

EDAD: 30 DÍAS.

%Percoll	G0/G1	S	G2/M
45	92,0 ± 0,1	4,10 ± 0,80	4,00 ± 0,7
50	88,5 ± 0,75	7,10 ± 0,8	4,35 ± 1,55
55	84,2 ± 0,1	7,25 ± 0,85	8,60 ± 0,8
60	86,4 ± 0,2	4,45 ± 0,35	9,15 ± 0,15
65	85,8 ± 1,13	3,70 ± 0,70	10,45 ± 0,05

*Los valores promedio representan 3 ensayos diferentes por duplicado ± la desviación estándar respectiva.

EDAD: 60 DÍAS.

%Percoll	G0/G1	S	G2/M
45	86.35 ± 1.15	12.10 ± 1.80	1.65 ± 0.6
50	87.55 ± 0.45	8.80 ± 0.3	3.70 ± 0.2
55	86.40 ± 0.80	9.00 ± 1.50	4.60 ± 2.30
60	86.15 ± 0.05	10.80 ± 0.50	3.05 ± 0.4
65	87.75 ± 0.45	7.55 ± 0.35	4.70 ± 0.10

*Los valores promedio representan 3 ensayos diferentes por duplicado ± la desviación estándar respectiva.

EDAD: 90 DÍAS.

%Percoll	G0/G1	S	G2/M
45	86.50±1.13	4.76±1.33	8.73±0.78
50	83.37±2.66	5.15±0.36	8.80±1.00
55	76.33±1.79	4.66±0.16	12.80±1.20
60	79.85±6.05	8.57±4.59	11.57±2.31
65	82.27±2.86	5.12±0.81	12.57±2.18

*Los valores promedio representan 3 ensayos diferentes por duplicado ± la desviación estándar respectiva.

EDAD: 120 DÍAS.

%Percoll	G0/G1	S	G2/M
45	80.75±2.05	6.45±0.85	2.42±0.00
50	78.65±2.95	7.75±2.15	2.48±0.02
55	62.25±0.55	28.75±2.35	9.00±2.90
60	62.80±0.00	31.10±0.00	6.10±0.00
65	70.20±2.00	25.45±0.35	4.35±1.65

*Los valores promedio representan 3 ensayos diferentes por duplicado ± la desviación estándar respectiva.

(C).- ANÁLISIS DE APOPTOSIS DE LAS DISTINTAS SUBPOBLACIONES DE TIMOCITOS OBTENIDOS POR GRADIENTE DISCONTINUO DE PERCOLL EN RATA DE DISTINTAS EDADES.

EDAD: RECIÉN NACIDAS.

<u>%PERCOLL</u>	<u>%APOPTOSIS</u>
45	2.88 ± 0.65
50	1.50 ± 0.15
55	1.35 ± 0.075
60	1.33 ± 0.65
65	0.89 ± 0.00

*Los valores promedio representan 3 ensayos diferentes por duplicado ± la desviación estándar respectiva.

EDAD: 7 DÍAS.

<u>%PERCOLL</u>	<u>%APOPTOSIS</u>
45	8.57±1.5
50	4.91±0,5
55	1.27±0.01
60	1.63±0.10
65	1.41±0.15

*Los valores promedio representan 3 ensayos diferentes por duplicado ± la desviación estándar respectiva.

EDAD: 15 DÍAS.

<u>%PERCOLL</u>	<u>%APOPTOSIS</u>
45	5.00±1.67
50	12.35±4.1
55	1.19±0.0
60	1.17±0.64
65	1.05±0.15

*Los valores promedio representan 3 ensayos diferentes por duplicado ± la desviación estándar respectiva.

EDAD: 21 DÍAS.

<u>%PERCOLL</u>	<u>%APOPTOSIS</u>
45	27.90 ± 1.27
50	5.84 ± 2.98
55	2.76 ± 0.41
60	2.76 ± 0.41
65	2.15 ± 0.13

*Los valores promedio representan 3 ensayos diferentes por duplicado ± la desviación estándar respectiva.

EDAD: 30 DÍAS.

<u>%PERCOLL</u>	<u>%APOPTOSIS</u>
45	8.54 ± 0.89
50	16.65 ± 0.86
55	6.50 ± 0.49
60	7.87 ± 1.36
65	7.19 ± 0.64

*Los valores promedio representan 3 ensayos diferentes por duplicado ± la desviación estándar respectiva.

EDAD:60 DÍAS.

<u>%PERCOLL</u>	<u>%APOPTOSIS</u>
45	25.40 ± 1.0
50	34.21 ± 1.3
55	9.10 ± 2.4
60	29.38 ± 5.5
65	34.91 ± 8.0

*Los valores promedio representan 3 ensayos diferentes por duplicado ± la desviación estándar respectiva.

EDAD: 90 DÍAS.

<u>%PERCOLL</u>	<u>%APOPTOSIS</u>
45	16.06 ± 2.5
50	19.29 ± 6.13
55	6.19 ± 2.72
60	1.67 ± 0.10
65	1.71 ± 0.15

*Los valores promedio representan 3 ensayos diferentes por duplicado ± la desviación estándar respectiva.

EDAD. 120 DÍAS.

<u>%PERCOLL</u>	<u>%APOPTOSIS</u>
45	17.83 ± 1.11
50	4.77 ± 0.26
55	1.92 ± 0.25
60	0.65 ± 0.18
65	0.60 ± 0.05

*Los valores promedio representan 3 ensayos diferentes por duplicado ± la desviación estándar respectiva.

******NOTA: Debido a la poca cantidad de timocitos de las ratas fetales, obtenidos por gradiente de percoll no fue posible teñir las células con 7-AAD para el análisis de apoptosis en estas edades.***

VIII.- BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, A. K; Litchman, A H and Pober, J S. 1995. Cellular and Molecular Immunology. second edith. Interamerican. 517pp
- Adkins, B; Mueller, Ch; Okada, C Y, Reichert, R. A; Weissman, I. L, and Spangrude, G. J. 1987 Early events in T-cell maturation *Ann. Rev. Immunol.* 5: 325-365.
- Aguilera, G. and Romano, M. C. 1989. Influence of the thymus on steroidogenesis by rat ovarian cell *in vitro*. *J. Endocrinology.* 123:367-373
- Anderson, G; Moore, N C; Owen, J J T and Jenkinson, E. J. 1996. Cellular Interactions in Thymocyte Development. *Annu. Rev. Immunol*, 14:73-99.
- Ashton-Rickardt, P. G; Van Kaer, L; Schumacher, T.N.M; Ploegh, H L. and Tonegawas. 1993. Peptide contributes to the specificity of positive selection of CD8+ T cells in the thymus. *Cell.* 73.1041-1049
- Aspinall, R.; Kampinga, J; and van den Bogaerde, J. 1991. T- cell development in the fetus and the invariant series hypothesis. *Immunology Today.* 12 (1): 7-10.
- Barrera-Rodríguez, R; Peralta-Zaragoza, O and Madrid-Marina, V. 1995 Molecular basis of cancer immunology *Salud Pública de Mex.*, 37:344-353.
- Bierer, B. E ; Sleckman, B. P, Ratnofsky, S. E. and Burakoff, S J. 1989. The biologic roles of CD2, CD4, and CD8 in T- cell activation 7: 579-599
- Boyd, R. L and Hugo, P. 1991. Towards an integrated view of thymopoiesis. *Immunology Today.* 12(2).71-74.
- Burnet, S. M. 1962. The Thymus Gland. *Scientific American* 88-95p.
- Cardarelli, N. F. 1989. The Thymus in Health and Senescence. Vol. I Thymus and Immunity. CRC press 293pp.
- Cohen, J. J and Duke, R C. 1992 Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol.* 10:267-293.
- Cormack, D.H. 1988 *Histología de Ham* 9a. ed. Harla, México. pp299 a 303.
- Craps, L and Basle, M. 1993. *Immunology a primer* Sandoz Pharma, 96 p

Curnow, S. J; Barad, M; Roubercau, N.B and Verhulst, M.S. 1994. Flow Cytometric Analysis of Apoptotic and Nonapoptotic T-cell Receptor Transgenic Thymocytes Following In Vitro Presentation of antigen. *Cytometry* 16 41-48.

Darzynkiewicz, Z; Robinson, J.P and Crissman, H.A. 1994. *Methods in cell Biology Flow Cytometry*. Vol.41-42. second edition, part A y B. 697pp.

Davis, M. M. 1990. T cell receptor gene diversity and selection. *Annu. Rev. Biochem* 59:475-496.

Ewijk, W.V. 1991. T-Cell Differentiation is Influenced by Thymic Microenvironments. *Annu. Rev. Immunol.* 9:591-615.

Fainboim, L, y Satz, M. L. 1994. *Introducción a la inmunología humana*. Mosby / Doyma. Libros. España. 180pp.

Fairchild, P. J. and Austyn, J. M. 1995. Developmental changes predispose the fetal thymus to positive selection of CD4+CD8- T cells. *Immunology* 85:292-298.

Fitch, F. W.; Mckisic, M. D; Lancki, D. W. and Gajewski, T. F. 1993. Differential regulation of murine T lymphocyte subsets. *Annu. Rev. Immunol*, 11:29-48.

Fitzpatrick, F. T. A.; Kendall, M. D.; Wheeler, M. J; Adcock, I. M. and Greenstein, B. D. 1985. Reappearance of thymus of ageing rats after orchidectomy. *J. Endocrinology*. 106: R17-R19.

Gatien, J. G.; Schneeberger, E. E. and Merler, E. 1975. Analysis of human thymocyte subpopulations using discontinuous gradients of albumin. *Eur. J Immunol*, 5:312-317.

Greenstein, B. D, Fitzpatrick, F. T. A; Adcock, I. M.; Kendall, M. D. and Weeler, M. J 1986. Reappearance of the thymus in old rats after achidectomy: inhibition of regeneration by testosterone *J. Endocr.* 110:417-422.

Grey, H.M., Sette, A and Buus, S. 1986. Así reconocen las células T a los antígenos. *Scientific American*

Hadden, J.W. 1992. Thymic endocrinology. *Int. J. Immunopharmac.* 14(3):345-352.

Haynes, B. F. and Hale, L. P. 1998. The Human Thymus. *Immunologic Research*, 18/3: 175-192.

Janeway, Ch. A. 1992 The T cell receptor as a multicomponent signalling machine: CD4/CD8 coreceptors and CD45 in T cell activation. *Ann Rev. Immunol.* 10:645-674.

Kerr, J. F. R. and Harmon, B.V. 1991. Definition and incidence of apoptosis: an historical perspective. *Apoptosis: The molecular basis of cell death.* Laboratory 55-29 pp.

Kerr, J.F.R.; Winterford, C. M, and Harmon, B. V. 1994 Apoptosis: Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73 (8): 2013-2026.

Lecoeur, H. and Gougeon, M. L 1996. Comparative analysis of flow cytometric methods for apoptosis quantitation in murine thymocytes and human peripheral lymphocytes from controls and HIV- infected persons Evidence for interference by granulocytes and erythrocytes. *J Immunological. Methods.* 198:87-99

Littman, D. R. 1987. The structure of the CD4 and CD8 genes. *Ann. Rev. Immunol.* 5:561-584.

Mandel, T.E and Kennedy, M.M. 1978 The differentiation of murine thymocytes in vivo and in vitro. *Immunology.* 35:317-331.

Ming, Y; Brunke, D. L.; Dantzer, R and Weller, K. W. 1992. Pituitary epithelial cell implants reverse the accumulation of CD4-CD8- lymphocytes in thymus glands of age rats. *J. Endocrinol.* 130(5):2703-2708.

Nicolic-Zugic, J. 1991. Phenotypic and functional stage in the intrathymic development of $\alpha\beta$ T cells. *Immunology Today.* 12(2):65-70

Owen, J. J. T. and Moore, N C. 1995. Thymocytes- stromal-cell interactions and T cell- selection. *Immunology Today* 16(7):336-337

Paterson, R. K; Bluethmann, H; Tseng, P; Dunlap, A and Finkel, T. H. 1999. Development and function of autospecific dual TCR+ T lymphocytes. *International Immunology,* 11(1):113-119.

Paul, W.E 1999. *Fundamental immunology*, Fourth Edition. Raven Press, Ltd, Philadelphia.

Pearce, P.; Khalid, B. A. K. and Funder, J. W. 1981. Androgens and the thymus. *Endocrinology.* 109(4):1073-1077.

- Reyes, E J A. 1991. Influencia del Timo en la función Testicular. Tesis Doctoral. CINVESTAV. IPN 142pp.
- Santos, A.L. 1995. Vida y muerte del linfocito B (La biología del linfocito B). Ciencia y desarrollo. Nov / Dic. 23-29pp.
- Salisbury, J. G, Graham, J. M and Pasternak, C. 1979. A rapid method for the separation of large and small thymocytes from rats and mice. J. Biochemical and Biophysical Methods. 1:341-347
- Schmid, I.; Uittenbogaart, C. H.; Keld, B.; and Giorgi, J.V. 1994. A rapid method for measuring apoptosis and dual-color immunofluorescence by single laser flow cytometry. Journal of Immunological Methods. 170: 145-157.
- Scollary, R. and Godfrey, D. I. 1995. Thymic emigration: conveyor belts or lucky dips? Immunology Today. 16 (6):268-272.
- Sebzda, E.; Wallace, V. A.; Mayer, J.; Yeung, R. S M; Mak, T.W. and Ohashi, P. S. 1994. Positive and negative thymocyte selection induced by different concentrations of a single peptide. Science. 263:1615-1618.
- Sia, T. H., Kisielow, P.; Scott, B.; Kishi, H.; Vematsu, Y; Blüthmann, H. and von Bohemer, H. 1988. Nature 335:229-233.
- Shapiro, H. M. 1995. Practical Flow Cytometry. Third edition. Wiley. 542pp.
- Stites D. P. Terr, A. I. y Parslow T. G. 1996. Inmunología Básica y Clínica 8ª ed. Edit. Manual Moderno, México 1099p.
- Swat, W.; Ignatowicz, L. and Kisielow, P. 1991. Detection of apoptosis of immature CD4+8+ thymocytes by flow cytometry. J. of Immunological Methods. 137:79-87.
- Takimoto, H, Nakamura, T; Takeuchi, M; Sumi, Y; Tanaka, T; Nomoto, K.; and Yoshikai, Y. 1992. Age-associated increase in number of CD4+CD8+ intestinal intraepithelial lymphocytes in rats.
- Tortora, G.J y Anagnostakos, N. P. 1981. Principios de Anatomía y Fisiología, 5a. ed. Edit. Harla, México, 993pp.
- Tsuchida, M. Konishi, M; Takai, K. Naito, K.; Fujikora, Y. and Fukumoto, T, 1994. Effects of irradiation, glucocorticoid and FK506 on cell-surface antigen expression by rat thymocytes: a three-colour flow cytometric analysis. Immunology. 83: 469-475.

Vindelov, L.L. and Chistensen, J. 1994. *Methods in Biology*. Chapter 15. Flow Cytometry. Part A. Vol.41: 219-229.

Vitale, M.; Zamai, L.; Mazzotti, G; Cataldi, A. and Falcieri, E. 1993. Differential kinetics of propidium iodide uptake in apoptotic and necrotic thymocytes. *Histochemistry*. 100:223-229.

Von Bohemer, H. 1990. Developmental biology of T cells in T cell- receptor transgenic mice. *Annu. Rev. Immunol.* 8:531-556.

• Watanabe, Y; Mazda, O; Aiba, Y; Iwai, K; Gystoku, J. I, Ideyama, Miyazaki, and Tatsura, Y. 1992. A murine Thymic Stromal Cell Line Which May Support the Differentiation of CD4-8- Thymocytes into CD4+8- $\alpha\beta$ T cell Receptor positive T cell. *Cellular Immunology*. 142:385-397.

Weiss, A and Littman, D. R. 1994. Signal Transduction by Lymphocyte Antigen Receptors. Review. *Cell*. 76: 263-274.

Weissman, I.L and Cooper, M.D. 1993 How the immune system develops. *Scientific American*. pp 63-71.

Yamada, H.; Ninomiya, T; Hashimoto, A.; Tamada, k.; Takimoto, H and Nomoto, K. 1998. Positive selection of extrathymically developed T cells by self-antigens. *J. Exp. Med.* 188(4): 779-784.

Zackon, I L y Goolsby, Ch.L. 1995. Guía Clínica para la Citometría de Flujo. *Contemporary Oncology*. Julio /Agosto.

Zambrano, S.A. 1994. *Inmunología*. Interamericana, McGraw Hill, México, 300pp

Zúñiga-Pflücker, J. and Leonardo, M J, 1996. Regulation of thymocyte development from immature progenitors. *Current Opinion in immunology*, 8: 215-224.