



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

"EFECTO DE DOS INMUNOMODULADORES SOBRE
LOS LINFOCITOS DEL TIMO DE RATONES
BALB/c"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A
SOCORRO SANDRA MARTINEZ ROBLES
DIRECTOR: DR. FERNANDO GARCÍA TAMAYO

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE 2009



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.

Índice General

Tema	No. Página
1. introducción.	1
1.1 El Timo.	1
1.2 Células.1
1.3 Organogénesis del timo.1
1.4 Diferenciación de linaje en los linfocitos.	3
1.5 Proporción de linfocitos en el timo de ratones.	3
1.6 Selección.3
1.7 Instrucción.4
1.8 Incorporación de los linfocitos T a la periferia.	4
1.9 Homeostasis de las células T	5
1.10 Los linfocitos T reguladores CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺	5
1.11 Involución del timo.	9
1.12 Inmunomoduladores.	11
2. Justificación.	13
3. Hipótesis.	15
4. Objetivo general.	16
4.1Objetivos particulares.	16
5. Materiales y Métodos.	17
5.1 Animales.	17
5.2. Obtención de la TMA.	17
5.3. Obtención de la HC.	17
5.4. Anticuerpos.	17
5.5. Grupos experimentales y diseño experimental.	18
5.6 Metodología.	20
5.7 Protocolo de tinción para citometría de flujo.	20
5.8 Modelo estadístico utilizado.	23
6. Resultados.	24
6.1 Citometría de flujo.	24
6.2 Determinación de la población de linfocitos CD3 ⁺	24

6.3. Determinación de la población de linfocitos Dobles Negativos (DN) y Dobles Positivos (DP).	26
6.4. Determinación de la población de linfocitos CD4 ⁺ y CD8 ⁺	27
6.5. Determinación de la población de linfocitos T reguladores.	32
6.6 Pesos e índices.	38
6.7 Histología.	42
7. Discusión.	44
7.1 Reducción en las poblaciones del timo por efecto de la HC.	44
7.2 Efecto de la timalfasina α -1 (Zadaxín®).	46
7.3 Efecto de la HC sobre la población Tregs.	47
8. Conclusiones.	49
9 Referencias Bibliográficas.	51

Índice de tablas y Figuras

Tabla I Diferencias entre Tregs naturales y adaptativas.	7
Tabla II Grupos experimentales y tratamiento recibido.	19
Tabla III Tratamientos y dosis recibidas.	19
Tabla IV Calendario del tratamiento de los subgrupos.	19
Tabla V Anticuerpos y La Marca Fluorescente.	21
Tabla VI promedios de pesos e índices.	38
Figura 1. Gráfica de puntos de tamaño contra granularidad de linfocitos T. . .	24
Figura 2. Histogramas sobrepuestos de células CD3 ⁻ y linfocitos CD3 ⁺	25
Figura 3. Comparación de grupos de la población de linfocitos CD3 ⁺	26
Figura 4. Histogramas de la población CD3 ⁺	26
Figura 5. Gráficas de puntos e histogramas DN y DP	27
Figura 6. Linfocitos CD4 ⁺ y CD8 ⁺ de los grupos Diluyente y Blanco	28
Figura 7. Comparación de poblaciones CD4 ⁺ y CD8 ⁺ entre los grupos Diluyente y HC	29
Figura 8. Comparación de las poblaciones CD4 ⁺ y CD8 entre los grupos HC, HC-TMA y TMA.	29
Figura 9. Grupos Blanco y Diluyente de las poblaciones CD4 ⁺ y CD8 ⁺	31
Figura 10. Comparación de los valores de la IMF entre los grupos HC, HC-TMA y TMA.	32
Figura 11. Gráfica de puntos de tamaño contra granularidad.	33
Figura 12. Histogramas sobrepuestos con el anticuerpo anti- CD25 ⁺ , y el control de isotipo, CD25.	33
Figura 13. Histogramas sobrepuestos de la detección de Foxp3 ⁺ intracelular.	34
Figura 14. Gráfica de puntos de linfocitos Tregs comparando el grupo Blanco contra Diluyente.	34
Figura 15. Gráfica de puntos de linfocitos Tregs de los grupos Diluyente y HC.	35
Figura 16. Gráficas de los grupos HC, HC-TMA y TMA de los linfocitos Treg.	36

Figura 17. Expresión citoplásmica de Foxp3 y de CD25+ en las muestras del Diluyente y HC.	37
Figura 18. Gráfica de barras se observa el IMF en rosa de la expresión de CD25+ y en azul de Foxp3.	38
Figura 19. Gráfica de barras del peso de los ratones de los 5 grupos.	39
Figura 20. Comparación entre grupos de pesos del timo y el bazo.	40
Figura 21. Índice tímico e índice esplénico	41
Figura 22. Millones de células que conforman el timo	42
Figura 23. Timo H-E 4X, ratones BALB/c de 8 semanas de edad	43
Figura 24. H-E 40X corte histológico del timo del grupo TMA y HC-TMA.	43

Glosario

- ANOVA.- Análisis de varianza
- CMV.- citomegalovirus
- CPA o APC.- Célula presentadora de antígeno
- DC.- célula dendrítica
- DN.- timocitos dobles negativos
- DP.- timocitos dobles positivos
- HC.- Hidrocortisona
- HHA.- hipotálamo-hipófisis-adrenales
- IDO.- indolamida 2,3-dioxienasa
- IE.- índice esplénico
- IL-12R β 2.- Fracción beta 2 del receptor de la interleucina 12
- IMF.- Intensidad media de fluorescencia (nivel de expresión de la molécula)
- IT.- índice tímico
- LPS.- Lipopolisacárido
- MHC.- Complejo principal de histocompatibilidad
- NK.- citotóxico natural
- NKT.- linfocitos T citotóxico natural
- NNC.- células de la cresta neural
- RTE.- linfocitos Tímicos Migratorios Recién Formados
- SP.- timocitos únicos positivos
- TEC.- células epiteliales del timo
- TGF- β .- factor beta transformador del crecimiento
- TMA.- timalfasina α -1

RESUMEN

Con el objetivo de comprobar que la hidrocortisona involuciona al timo y sus poblaciones de linfocitos T CD3⁺ CD4⁺, CD3⁺CD8⁺ y T reguladoras naturales (CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺) y que esta involución puede ser revertida específicamente por el inmunomodulador timalfasina α 1 (TMA) al incrementar la celularidad de las poblaciones antes mencionadas. En ratones machos de ocho semanas BALB/c se indujo experimentalmente la involución del timo con una inyección subcutánea de 10mg. de hidrocortisona (HC), este efecto se contrarrestó con la inyección subcutánea de 0.20 μ g del inmunomodulador Timalfasina α 1 (TMA), compuesto sintético de 28 aminoácidos que tiene el efecto de la timosina α 1 cuya principal función es restablecer la celularidad del timo. Se establecieron 5 grupos de estudio:

HC en donde se observó la involución del timo.

HC-TMA en donde se involucionó el timo con hidrocortisona y posteriormente se restableció la celularidad con timalfasina α 1

TMA en donde se observó el efecto único de la timalfasina α 1 sobre el timo.

Diluyente grupo control negativo al que se administró agua inyectable estéril.

Blanco, grupo testigo al que no se hizo tratamiento alguno.

Se comprobó que la hidrocortisona a dosis de 10mg. involuciona al timo y que la timlafasina α 1 tiene un efecto positivo en la recuperación de la celularidad del timo, se encontró además que la timalfasina α 1 no tiene efecto alguno sobre el timo si este no ha sufrido antes un proceso de involución.

La hidrocortisona no tiene efecto en la población de linfocitos T reguladores naturales. pero la timalfasina α 1 si tiene efecto sobre los Tregs previamente tratados con HC particularmente les aumenta la expresión de CD25.

SUMMARY

Thymalfasin (TMA) is a 28 amino acid synthetic peptide with the same biological effects as the thymosine α -1. Hydrocortisone (HC) is a steroid hormone that reduces the thymus size and decreases the T lymphocytes number. However, some studies report that HC has not effect neither the amount of T lymphocytes regulators (Treg) nor it suppressor activities. On the other hand, the effect of the TMA on Treg cells is not known. This work study whether after HC administration, four doses of TMA revert the effects of the steroid on both the size of the thymus and thymocytes subpopulations, including the Treg.

Male BALB/c mice eight weeks separated into five groups were used. In the first group (1) the animals only received HC (10 mg, SC) to measure the impact of steroid on the thymus. The animals from second group (2) received the same dose of HC and later 4 doses of TMA (0.20 μ g, SC), to know if the administration of the peptide reverts the effect of the HC. Animals from the third group (3) only received TMA to the same dose, to know the effect of the peptide on the cellularity of the thymus. Mice from the fourth group (4) were negative controls that only were injected with the commercial sterile distilled water used as diluent. Animals from the fifth group (5) were the blank because it did not receive any injection. The thymus from each animal was separated by dissection and weighted; cells were isolated by disgregation of tissue. Different conjugated antibodies against membrane CD3, CD4, CD8 and CD25 antigens, and antibodies anti-transcription factor Foxp3 were used in the cellular staining for flow cytometry analysis.

Results show that both thymus involution and decreased amounts of T lymphocytes subpopulations persist ten days after the HC administration. HC did not affect Treg population. In animals previously treated with HC, the TMA normalizes the Treg lymphocytes population, particularly increasing the CD25 expression. The TMA has no effect on normal thymus or cells of mice that have not been treated with HC. Results suggest that TMA could be used for the treatment of diseases linked to a depression of Treg cells activities.

1. Introducción

1.1 El Timo.

El timo es un órgano linfoide donde maduran los linfocitos T que provienen de la médula ósea y, además, donde se eliminan los linfocitos T autorreactivos. Estas dos funciones lo convierten en un órgano esencial para mantener la salud y las funciones del sistema inmune. Numerosos factores, como la edad, el estado de nutrición, la administración de diversos fármacos, las infecciones, el embarazo, el estrés entre otros, influyen sobre el tamaño, la celularidad y las funciones del timo[1]. Esos cambios generalmente son temporales y representan procesos de adaptación del sistema inmune a condiciones adversas, pero en otros casos los cambios en las funciones del timo pueden facilitar la aparición de enfermedades o puede ser atacado por agentes infecciosos que promueven la apoptosis del timo, por ejemplo E. coli, S. aureus y M. tuberculosis[2]. Por esta razón, en los últimos años se ha observado un interés particular por encontrar agentes moduladores que puedan revertir las alteraciones causadas por la disminución en las poblaciones de células del timo y estimular las funciones que ellas desempeñan[3].

1.2 Células.

El timo contiene varias poblaciones de células, cada una de ellas con funciones específicas[4].

- 1) Las células epiteliales (TEC), que pueden ser :
 - a) Células nodrizas
 - b) Células cortico-epiteliales
 - c) Células medulares epiteliales
- 2) Las células dendríticas interdigitantes,
- 3) Los macrófagos con una localización principalmente medular
- 4) Los linfocitos T, más abundantes en la corteza.

1.3 Organogénesis del timo.

La organogénesis del timo se relaciona íntimamente con la de la paratiroides, ya que las dos glándulas provienen del tercer saco faríngeo del endodermo. En

los ratones, alrededor del día 11 del desarrollo embrionario (E11) cada primordio contiene los precursores de los lóbulos del timo y de la glándula paratiroides, cada primordio es rodeado de una cápsula mesenquimatosa derivada de las células de la cresta neural (NCCs) las cuales mantienen el crecimiento y desarrollo de los primordios y la diferenciación de células epiteliales del timo (TEC). Alrededor del día E12.5, el primordio se separa de la faringe y migra hacia la parte anterior del tórax posiblemente bajo la guía de las NCCs. Para el día E13.5 el timo y la paratiroides se han separado y se ubican en los sitios que ocuparan permanentemente [5, 6].

En un análisis molecular sobre la existencia de progenitores comunes de células epiteliales corticales y medulares se encontró que todos ellos expresan el factor de transcripción Foxn1 [5-7]. Además los progenitores inmaduros de las TECs en ratones expresan los marcadores de superficie MTS20 y MTS24 [8]. Estas células constituyen el 50% de los timocitos población en el día E12.5. del primordio tímico. En el día E15.5 las células MTS24⁺ expresan moléculas de MHC-II y las TECs inmaduras expresan K8⁺K5⁺. Por su parte la médula del timo se genera por clonación de isletas que se unen a medida que el timo madura y en relación directa con los vasos sanguíneos[5, 6, 9].

La regulación genética es una red de cinco factores que se pueden enlistar en orden de sus tiempos de acción:

- Homeobox A3 (Hoxa3)
- gene 1 en par (Pax1)
- (pax9)
- El homólogo 1 ojos ausentes (Eya1)
- El homólogo 1 relación ojos-sanos (Six1).

En *Drosophila* estos cinco genes se relacionan con la formación de los ojos, pero en los ratones sólo se expresan en el endodermo faríngeo. Una vez que la organogénesis ocurrió, dos procesos más deben ocurrir: la separación del rudimento en los dominios de timo y paratiroides y la diferenciación de las células TEC aquí actúan dos factores de transcripción Foxn1 y el homólogo 2 carente en las células gliales (Gcm2); Gcm2 se expresa primero a partir del día E9.5 y hasta E11.25 Foxn1 se expresa después del día E10.5[6, 7, 9].

1.4 Diferenciación de linaje en los linfocitos.

La timopoyesis se compone de tres eventos fundamentales:

- a) Eventos tempranos en los cuales los genes de TCR se activan y codifican la expresión de proteínas que van a permitir reconocer antígenos.
- b) Selección tímica en donde los timocitos dobles positivos (DP) $CD4^+ CD8^+$ pasan por selección negativa y positiva para diferenciarse en $TCR^+ CD4^+ CD8^-$ y $TCR^+ CD4^- CD8^+$ o únicas positivas (SP).
- c) Eventos tardíos de aquellas células únicas positivas que sobreviven a la selección y que migran de la unión córticomedular a la médula para terminar de madurar funcionalmente [10].

Posteriormente, las células T dan origen a las subpoblaciones de linfocitos $CD4^+$ o $CD8^+$ dependiendo de las señales que reciben de otras células que las rodean. Estos procesos de desarrollo se llevan a cabo en ausencia de antígenos extraños [10].

1.5 Proporción de linfocitos en el timo de ratones.

Se ha demostrado que en ratones de 8 semanas de edad, la proporción de linfocitos inmaduros DN es de $3.5 \pm 2 \%$ y que el 37% de esta población expresan el receptor para la interleucina-2 (IL-2R). La población DP en el timo normal es predominante $\geq 80\%$ y expresan $CD3^{+lo}$ e IL-2R. La población $CD4^+$ es 8-12% en la población normal y $\geq 95\%$ son $CD3^+$. La población de células $CD8^+$ es menor a la población $CD4^+$, se encuentra 4-9% y solo del 30-37% son $CD3^+$ [11].

1.6 Selección.

Las células T con receptores que reconocen antígenos o las células dendríticas que los presentan en asociación con los productos del complejo principal de histocompatibilidad (MHC), son seleccionadas para su expansión clonal y diferenciación. Las células T se seleccionan de acuerdo a si el antígeno es

presentado en asociación con el MHC II para las células CD4⁺ o MHC I para las células CD8⁺ [10].

1.7 Instrucción.

El mecanismo para generar linajes CD4⁺ y CD8⁺ a partir de los precursores T de las células dobles positivas CD4⁺CD8⁺, está unido a la especificidad del receptor de antígeno de la célula T. Este proceso fue inicialmente considerado una selección estocástica que generaba células únicas positivas CD4⁺ y CD8⁺ mediante la unión de sus precursores a los productos del MHC clase II y clase I respectivamente[12]. Estudios más recientes sustentan dos modelos de instrucción en la ontogenia del timo: el modelo de mosaico que mantiene la selección estocástica y el modelo de instrucción Terminal, este último es el más aceptado y señala que funciona a través de un operador maestro que regula el compromiso de linaje, el cual ha sido identificado como el factor de transcripción Th-POK (Th-factor inductor POZ-Kruppel). La idea es que la fuerza o duración de la señal del TCR actúa activando a Th-POK, que entonces determina el linaje al cual la célula se comprometerá, resultando en un cambio en la expresión genética mutuamente excluyente hacia CD4⁺ o CD8⁺[12, 13].

1.8 Incorporación de los linfocitos a la periferia.

En los ratones, los linfocitos Tímicos Migratorios Recién Formados (RTE por sus siglas en inglés) comienzan a abandonar el timo y pasan a la sangre periférica durante la embriogénesis tardía y continúan presentes en una proporción de 1-2% a lo largo de la vida manteniendo este equilibrio. Los RTE dejan el timo con la capacidad de reconocer y responder a cualquier patógeno que encuentre en el hospedero [14].

1.9 Homeostasis de las células T.

Desde hace mucho tiempo se sabe que la cantidad de células T en la periferia se regula para mantenerse constante en individuos normales. Se ha comprobado que al transplantar grandes cantidades de timos en ratones normales solo se ocasiona un ligero incremento en el conteo total de células T[14]. En el otro caso, cuando un gran número de células T son eliminadas, aquellas que permanecen inician una proliferación espontánea [15].

Recientemente se ha demostrado que en ratones inmunodeficientes mantenidos en condiciones libres de patógenos específicos a los que se han transferido células T, éstas proliferan lentamente y lo hacen a expensas de las células de memoria y las células vírgenes. Sin embargo, en estos casos la multiplicación de los linfocitos no es suficiente para restablecer la normalidad en la periferia especialmente en el compartimento de los linfocitos T vírgenes,[16].

Existen varios factores que regulan la supervivencia de las células T vírgenes:

- 1) Las moléculas del MHC clase I y MHC clase II expresadas por las CPA intratímicas Para la sobrevivencia a largo plazo de las células T CD8⁺ y CD4⁺ respectivamente.
- 2) Las citocinas.- Para que las células T vírgenes sobrevivan es necesaria la presencia de IL-2, IL-4, IL-6 y, fundamentalmente, de la IL-7 la cual favorece la maduración de las células T.

1.10 Los linfocitos T reguladores CD4⁺CD25⁺ Foxp3⁺. Los linfocitos T reguladores (Treg) constituyen una subpoblación de linfocitos T que también madura en el timo[17]. Una vez que abandonan el órgano, los linfocitos Treg tienen la función de modular negativamente o suprimir las respuestas del sistema inmune. Los linfocitos Treg tienen el fenotipo CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, aunque es posible encontrar CD25⁺ en células CD3⁺CD8⁺. CD4⁺ y CD25⁺ son moléculas localizadas en la membrana que pueden ser utilizados como marcadores de una población de linfocitos (reguladores). El Foxp3⁺ es un factor de transcripción presente solo en el citoplasma de los linfocitos Treg.

La eliminación experimental de los linfocitos con el fenotipo CD4⁺CD25⁺ causa la aparición de enfermedades autoinmunes graves[18]. La mutación de Foxp3 en las células del estroma del timo provoca enfermedades autoinmunes en ratones que son conocidos como "escamosos o despellejados" (Scurfy). Estos animales tienen una reducción significativa en la celularidad tímica debido a una proliferación reducida de los linfocitos T inmaduros, particularmente los "doble negativos" (DN). De todos modos conviene señalar que los defectos por mutación en el gene Foxp3 solo se observan en las células del estroma y no en los linfocitos T[19]. Las personas que carecen del factor Foxp3⁺ viven poco [20], víctimas de enfermedades autoinmunes y de la diabetes mellitus tipo II. Estudios "in vitro" demuestran que cuando se restablece Foxp3⁺ en las células CD25⁽⁻⁾ se recupera la función reguladora. Las Tregs controlan la eliminación de células tumorales, así como las respuestas contra alérgenos y microorganismos patógenos o comensales, los trasplantes de órganos alogénicos y la transferencia de células maternas al feto durante el embarazo. Por todas estas razones, en los últimos años, los ensayos terapéuticos sobre la involución del timo se han orientado en lo particular a la reconstitución de las poblaciones T y algunas otras subpoblaciones de células tímicas, las Treg entre ellas [21].

Cuando los linfocitos Treg se encuentran ausentes o en cantidad menor al 5% entonces otras células del timo proliferan, principalmente las células dendríticas de la línea mieloide. Existen reportes de que existen varias poblaciones de linfocitos Tregs que son diferentes en desarrollo, función o fenotipo, por ejemplo los linfocitos Treg naturales y los linfocitos Treg adaptativos [22].

Los linfocitos Treg naturales.- Estas células funcionalmente expresan la cadena α del receptor de la IL-2, son producidas en el timo normal como una población madura funcionalmente diferente y su desarrollo y función dependen de la expresión del factor de transcripción Foxp3⁺ ; los Treg naturales requieren del contacto célula-célula para ejercer su acción supresora.

La condición de Foxp3⁽⁻⁾ puede ser inducida en animales neonatos y adultos mediante "knock in" (eliminación de poblaciones celulares introduciendo un receptor de toxina diftérica en una construcción genética acoplada al genoma murino, de tal modo que cuando se introduce la toxina diftérica se elimina la población Treg). Se ha visto que en animales adultos la presentación de autoinmunidad es más grave y aguda que en neonatos. Al quitar la toxina hay una recuperación de la población de Treg la cual para mantener la homeostasis debe ser tanto en ratón como humano del 5-15% en timo y en la periferia[23, 24].

Los linfocitos Treg adaptativos.- Derivan de linfocitos T vírgenes CD25⁽⁻⁾, inducidos por modos específicos de estimulación antigénica, especialmente en un ambiente de citocinas específicas incluyendo IL-10 secretada por T reguladoras 1 (Tr1)[23] [25]. Los linfocitos TH3 secretan TGF- β y grandes cantidades de IL-10. Las Tregs generadas de manera extratímica realizan su acción reguladora al secretar sus citocinas ver tabla I [26].

Tabla I Diferencias entre Tregs naturales y adaptativas

Características	Células T naturales	Células T adaptativas
Sitio de inducción	Timo	Periferia
Dependencia de CD28- CD80/CD86	Si	No
IL-2 dependiente	Si	Si
Expresión de CD25 ⁺	Si (elevado)	Variable
Especificidad	Antígenos propios en el timo	Antígenos específicos de tejido y antígenos extraños
Mecanismos de supresión en las efectoras	Célula T-Célula T/contacto APC independiente de citocinas	Célula T-Célula T/contacto APC dependiente de citocinas

Los linfocitos Foxp3^+ se encuentra específicamente en poblaciones naturales $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ en roedores y su expresión facilita su desarrollo y función reguladora en el timo. La expresión del factor de transcripción Foxp3^+ se inicia al final del estadio de las células DP. Los linfocitos $\text{CD4}^+\text{Foxp3}^+$ pueden ser detectados desde el día tres después del nacimiento en ratones de modo que si se lleva a cabo una timectomía en el día tres se produce una enfermedad autoinmune órgano-específica, la cual se puede remediar al inocular células $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ [21].

Es fundamental la expresión de Foxp3^+ para que las células T obtengan su característica de Tregs, experimentalmente las mutaciones en el Foxp3^+ de las Tregs conducen a una deficiencia o disfunción en la actividad reguladora del sistema inmune. La expresión ectópica de Foxp3^+ en células vírgenes es suficiente para convertirlas fenotípicamente y funcionalmente en Tregs al menos en ratones. Foxp3^+ suprime efectivamente la transcripción de IL-2, IL-4 e $\text{IFN-}\gamma$ a través de interacciones físicas directas con el factor nuclear κB y NF-AT (NF- κB). Cuando este último factor se une con Foxp3^+ forman un complejo que se requiere para la actividad supresora y la sobreexpresión de CD25^+ y CTLA-4[22].

En cuanto a la actividad supresora, las Tregs naturales impiden la activación y la proliferación de las células efectoras, la formación de citocinas como IL-1, IL-4 e $\text{IFN-}\gamma$ aún en ausencia de células presentadoras de antígeno, además inhiben la proliferación de las células B y la producción de anticuerpos y el cambio de isotipo, inhiben la función citotóxica de las células natural killer (NK), NKT y la maduración de las células dendríticas [27].

Para que se lleve a cabo toda esa actividad supresora de las Tregs in vivo es necesaria la presencia de dos citocinas, la IL-10 y el TGF- β . Un 80% de las células T $\text{CD4}^+\text{CD25}^+$ cuando son activadas con anti-CD3 en dosis a partir de 5mg hasta 20 μg [28] expresan en su membrana TGF- β y son capaces de inhibir células NK. TGF- β se requiere para el mantenimiento de las Tregs naturales. Se puede inducir la expresión de Foxp3 , TGF- β e IL-2 por una estimulación antigénica a partir de linfocitos T vírgenes; estas Foxp3^+ de novo

tiene actividad supresora igual que los linfocitos T CD4⁺CD25⁺naturales [29, 30].

También la IL-2 es indispensable para el mantenimiento de las Tregs naturales en la periferia, ya que las células que expresan el receptor alfa de la IL-2 de alta afinidad (CD25) también expresan Foxp3⁺. La IL-2 que requieren las Tregs es sintetizada por otras células T como las Th1. Dentro de sus mecanismos de supresión, las Tregs pueden eliminar a los linfocitos T y B efectores por apoptosis de una manera perforina-independiente y perforina-dependiente respectivamente[31]. Demasiada actividad de las Treg puede conducir a una inmunosupresión y muy poca supresión puede conducir a la autoinmunidad y las alergias.

En la involución del timo, sobre todo si se relaciona con la edad, están involucradas la disminución de la población y de la función de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, es de esperar que también suceda lo mismo con los linfocitos Treg, al parecer si se disminuye la población del timo en un 2% aproximadamente pero la función supresora mantiene su efectividad[32], en la periferia al parecer se incrementan los porcentajes de Tregs pero la efectividad es similar a los Treg de individuos que no presentan involución por su edad, esto es una pieza clave para evitar la presencia de enfermedades relacionadas con hipersensibilidad o inmunodeficiencia[33].

1.11 Involución del timo.

El timo en humanos pesa alrededor de 100-150 g al momento del nacimiento, 30-40 g en la pubertad y 10-15 mg a los 60 años de edad. Este proceso se conoce como involución o hipoplasia fisiológica del timo. En un ratón macho C57BL/10 el timo pesa 50mg a los 3 meses de edad, reduciéndose en aproximadamente 20 mg a los 20 meses. La involución fisiológica del timo se inicia muy temprano, tanto en el hombre como en el ratón y, aparentemente, es más rápida en machos que en hembras [34], lo cual sugiere la existencia de

factores hormonales en la involución. Después de la pubertad la influencia de las hormonas sexuales, particularmente cuando se producen en exceso durante el embarazo, inhiben la producción y expresión de las principales hormonas del timo (timulina y timosina α 1) causando alteraciones fisiológicas y transitorias en la morfología del timo [35].

La involución fisiológica reduce dramáticamente el tamaño y la estructura del timo de modo que en los individuos de edad avanzada, el timo queda convertido en unos cuantos lóbulos linfoides dispersos y rodeados de tejido fibroso y grasa [11]. A medida que aumenta la edad de los ratones, los linfocitos T vírgenes disminuyen paulatinamente su proporción en la periferia a medida que disminuye su maduración en un timo cada vez más atrofiado. Proporcionalmente, a medida que los linfocitos T vírgenes disminuyen, las células de memoria expanden su número [36, 37].

Además de la edad y de las hormonas sexuales, otras hormonas como los glucocorticoides también pueden provocar la involución de la glándula tímica [38], lo cual ha sido observado particularmente en situaciones de estrés experimental, en animales que, por una sobreestimulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenales, se les provoca el aumento en la secreción y en los niveles sanguíneos de glucocorticoides y una involución simultánea del timo[34].

Es de interés para este trabajo la función de los glucocorticoides en la respuesta de estrés. Cuando un organismo es expuesto a un estímulo nocivo, irritante o que provoca daño tisular, ocurre un incremento en la producción de glucocorticoides y catecolaminas circulantes, con la consiguiente elevación de sus niveles sanguíneos[39]. Las catecolaminas estimulan una respuesta neurovegetativa, mientras que los glucocorticoides estimulan la movilización del glucógeno hepático que contribuye a elevar los niveles de glucosa en la sangre y, además, aumentan la disposición de los ácidos grasos libres que son una fuente importante de energía en casos de urgencia[39]. En el curso del estrés también disminuye la cuenta de linfocitos circulantes y el tamaño de los ganglios linfáticos y del timo, porque los glucocorticoides inhiben la actividad mitótica linfocitaria. La acción primaria de los glucocorticoides consiste en

inhibir la producción de IL-1 e IL-2 por las células epiteliales y los linfocitos T intratímicos.

1.12 Inmunomoduladores.

Los inmunomoduladores son sustancias que se utilizan para aumentar o disminuir la respuesta del sistema inmune cuando éste se encuentra comprometido por condiciones de estrés o enfermedad [40]. Existe una gran variedad de ellos, sin embargo para los propósitos de este trabajo solo se mencionará la timalfasina α -1, homólogo sintético de la timosina α -1 producida en el timo.

La timalfasina (Zadaxin, Sci-Clone Pharmaceuticals, San Mateo, CA., distribuido en México por Laboratorios Columbia SA. de CV) es un polipéptido sintético de 28 aminoácidos idéntico a la timosina α 1, que es una hormona producida en el timo. La timalfasina (TMA) pertenece a los productos conocidos como modificadores de la respuesta biológica primeramente estudiados *in Vitro*, en el organismo promueve la maduración y la diferenciación de los linfocitos T. En estudios realizados sobre pacientes inmunocomprometidos, la TMA incrementa la actividad de los linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, la producción de interferón α y γ , la producción de IL-2 y la expresión de su receptor (IL-2R). Además, la TMA incrementa la respuesta de los linfocitos Th1 y disminuye la respuesta de los linfocitos Th2 [41-43]. La TMA se utiliza en la terapia de pacientes con citomegalovirus (CMV), una infección que por lo general cursa con un síndrome respiratorio agudo generalmente posterior a un trasplante renal, en donde el tratamiento incrementan las cuentas *in situ* y circulantes de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺, al mismo tiempo que coadyuva en la disminución de la tasa de mortalidad de estos pacientes [44, 45]. La TMA también disminuye la actividad de la enzima deoxinucleotidil terminal transferasa (TdT) [44].

Por inmunofluorescencia indirecta se han encontrado receptores para la timosina α 1 solamente en los timocitos inmaduros. Durante el proceso de apoptosis que sufren estos timocitos por causa de glucocorticoides sintéticos como la

dexametasona, la TMA presenta un efecto antagónico dosis y tiempo dependiente sobre la población de timocitos dobles positivos ($CD4^+CD8^+$) pero no muestra efecto sobre los timocitos dobles negativos ($CD4^-CD8^-$), $CD4^+CD^0$, $CD4^0 CD8^+$ ni en las células únicas positivas $CD4^+$ y $CD8^+$; de la misma manera disminuye el consumo de glutathion oxidasa intracelular el cual se utiliza para la inducción de la apoptosis en los timocitos[44].

Originalmente Zadaxin se ha utilizado para el tratamiento paliativo de la hepatitis C. Actualmente en el Instituto Mexicano del Seguro Social se establecen protocolos terapéuticos de rivavirina más peginterferón más zadaxin [41]. El uso de la timalfasina se ha implementado recientemente no solo en hepatitis C, sino también en pacientes con SIDA y en varias otras afecciones en donde la inmunidad esté comprometida. Sin embargo, el efecto de este medicamento sobre las poblaciones de linfocitos Treg no ha sido estudiado. Además, los resultados obtenidos sobre animales estresados y/o inyectados con hidrocortisona no son definitivos [46].

2. Justificación.

Desde hace años está comprobado experimentalmente [1, 10, 14, 47, 48] que la administración de hidrocortisona causa una involución del timo de los ratones. La hidrocortisona disminuye las cantidades intra-tímicas de los linfocitos T $CD3^+ CD4^+$ y $CD3^+ CD8^+$, lo que en el ambiente extratímico repercute en las poblaciones periféricas de linfocitos T vírgenes y de memoria. Sin embargo, no está completamente aclarado el efecto de la hidrocortisona sobre los linfocitos T reguladores (Treg) los cuales se definen como linfocitos T $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$ y forman una pequeña proporción (5-9%) de los linfocitos T totales. Algunos autores afirman que, de acuerdo a sus experimentos, la hidrocortisona no provoca cambios en la celularidad de los timos de algunas cepas de ratones, aunque su actividad supresora se ve incrementada [21]. En cambio, cuando la hidrocortisona se administra a ratones BALB/c se observa un incremento en la celularidad del timo, pero la actividad supresora de los linfocitos Treg se ve disminuida frente a los linfocitos $CD4^+ CD25^-$ [32].

Como estos ejemplos hay muchos otros en los que no se llega a un consenso sobre los efectos que tiene la hidrocortisona en la celularidad y la actividad de los linfocitos Tregs del timo de animales de laboratorio [21, 26].

La situación anterior plantea un problema, ya que actualmente son frecuentes el estrés y los tratamientos anti-inflamatorios e inmunosupresores que aumentan la concentración de los glucocorticoides en el suero y los tejidos [11, 42]. Por otra parte, cada vez existe más evidencia de que los niveles elevados de glucocorticoides influyen sobre la cantidad y la actividad de los linfocitos Treg, que son supresores de reacciones alérgicas y de autoinmunidad [21, 23].

Diversos trabajos [16, 44] de inmunólogos clínicos han mostrado que la actividad inmunomoduladora de algunos extractos u hormonas del timo, como la timosina $\alpha 1$ ($T\alpha 1$) solo se observa cuando actúa de manera sinérgica con otras moléculas como el $IFN-\gamma$ y mezclas de citocinas como el IRX-2 que contiene IL-1, IL-2, IL-6, IL-8, $IFN-\gamma$ y $TNF-\alpha$ [46], concluyen que la timalfasina

no tiene efecto directo sobre el timo. Pero otros afirman que la $T\alpha 1$ activa a las células dendríticas mieloides a través de sus TLRs 2 y 9 y que éstas, por contacto directo, y por la vía de la indolamida 2,3-dioxienasa (IDO) aumentan la actividad supresora de los linfocitos Treg [29]. Como se puede observar, por la literatura mencionada, lo mismo que en el caso de la relación hidrocortisona/Treg, en esta otra relación timalfasina/timo/Treg, los resultados publicados a un nivel internacional discrepan en el sitio y modo de acción de estos inmunomoduladores. Por consiguiente, ya que la timalfasina es un producto comercial que se expende y se administra como tratamiento contra hepatitis B, C, V.I.H. se justifican nuevas investigaciones al respecto.

Este trabajo pretende primero disminuir la celularidad del timo, en ratones BALB/c de 8 semanas con 10mg de hidrocortisona[38] posteriormente, reconstituir la normalidad mediante la administración de timalfasina que tiene un efecto sobre las poblaciones del timo incrementado sus celularidad, y ver si también sobre los linfocitos T reg hay un efecto positivo Para ello se estudiaron por citometría de flujo las siguientes tres subpoblaciones $CD3^+ CD4^+$, $CD3^+ CD8^+$ y $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$, así como las proporciones en las que se encuentran sus células precursoras.

2. Hipótesis.

La timalfasina α -1 induce recuperación de la subpoblación de timocitos $CD4^+CD25^+Foxp3^+$ después de la administración de 10mg de hidrocortisona en ratones BLALB/C de 8 semanas de edad.

2. Objetivo general.

Evaluar el efecto de la timalfasina $\alpha 1$ como un inmunomodulador que ayuda a mejorar la involución experimental del timo.

2.1 Objetivos particulares.

1. Confirmar que la administración de hidrocortisona altera la expresión de antígenos en la membrana de los timocitos y la maduración de los mismos.
2. Conocer si la timalfasina acelera la recuperación de las alteraciones anteriores.
3. Conocer el efecto de la hidrocortisona y de la timalfasina sobre los linfocitos T reguladores.

5. Materiales y Métodos.

5.1. Animales. Ratones machos BALB/c de 8 semanas de edad, que desde el momento de nacer y durante el curso de todos los experimentos fueron alojados en el bioterio Harlan™ de la Facultad de Química, UNAM, en un ambiente libre de patógenos, con ciclos luz-oscuridad de 12 horas, alimentados con dieta comercial Harlan™ para ratones y agua potable ad libitum. Los animales se pesaron cada 8 días, fueron inyectados en campana de flujo laminar y, finalmente, fueron sacrificados de acuerdo a las normas de las guías de procedimientos éticos vigentes aprobados por el programa de Posgrado de Ciencias Biológicas de la UNAM.

5.2. Obtención de la Timalfasina $\alpha 1$ (TMA). Es fabricada por SciClone Farmacéuticals internacional, su nombre comercial es Zadaxin y es distribuida en la República Mexicana por los Laboratorios Columbia con Matriz en el Distrito Federal. Se adquirió directamente del laboratorio.

5.3. Obtención de la hidrocortisona (HC). Con el nombre comercial de Flebocortid® soluble en agua, inyectable y presentada en frascos de 100mg es fabricada por Janssen-Cilag y se obtuvo de la compañía proveedora.

5.4. Anticuerpos. Los anticuerpos utilizados fueron comprados:

- BioLegend® 11080 Roselle Street San Diego, CA 92121. (controles de isotipo, CD3 y Foxp3).
- ID Labs Biotechnology inc.(abCD8).
- Abcam™(abCD4, abCD25).

Todos ellos se disolvieron en PBS al momento de hacer el experimento y se hicieron alícuotas de concentrado.

- PE Rat IgM, k Isotype ctrl.
- PE/Cy5 anti-mouse CD3
- Alexa Fluor® 647 anti-mouse/rat/human FOXP3
- Alexa Fluor® 647 Mouse IgG1, isotype ctrl (ICFC)

- Rat Monoclonal Antibody to Mouse CD8a PE
- Rat Monoclonal Antibody to Mouse CD4 FITC
- Rat Monoclonal Antibody to mouse CD25

5.5. Grupos experimentales y diseño experimental. Los ratones machos BALB/c fueron distribuidos en 5 grupos, de 5 animales cada uno, de acuerdo al tratamiento que recibieron ya sea HC o TMA. Dentro de cada grupo, 3 ratones se utilizaron para citometría de flujo y 2 para histología. Se propuso trabajar con 25 animales. Todos los tratamientos fueron administrados vía subcutánea. Los grupos se clasificaron utilizando abreviaciones del tratamiento que recibieron (HC, HC-TMA, TMA,).

Grupo HC.

Los 5 ratones de este grupo recibieron 2 inyecciones de 5mg/0.1ml de hidrocortisona, durante 2 días, recibieron 10mg en total. Según lo recomiendan [38] como la dosis adecuada para provocar la involución del timo.

Grupo HC-TMA.

Los 5 ratones de este grupo primero recibieron la HC a las mismas dosis que los animales del grupo anterior, y, dos días después, fueron tratados con TMA a dosis de 0.5µg/ratón de TMA cada 4 días recibiendo en total 2µg distribuidos en 4 inyecciones ver tabla IV.

Grupo TMA.

Los 5 ratones de este grupo recibieron cuatro dosis de 0.5µg/ratón de TMA, cada 4º día. Recibieron en total 2µg distribuidos en 4 inyecciones ver tabla IV.

Grupo Diluyente.

Los 5 ratones de este grupo (control) recibieron 100 µl de agua inyectable estéril marca PISA® con el mismo calendario de administración que el grupo HC-TMA ver tabla IV.

Grupo Blanco.

Los 5 ratones de este grupo (Blanco) no recibieron ningún tratamiento.

TABLA II. Grupos experimentales y tratamiento recibido.

Grupo	HC	HC-TMA	TMA	Diluyente	Blanco
Tratamiento	hidrocortisona	hidrocortisona + timalfasina	timalfasina	Agua inyectable estéril	ninguno

TABLA III. Tratamientos y dosis recibidas.

Grupo	N=	Tratamiento	Vía de admon.	Dosis /día
HC-TMA	5	Hidrocortisona timalfasina	SC	5mg/0.1ml (2 dosis) 0.5µg/día (2 dosis)
TMA	5	timalfasina	SC	0.5µg/día.
HC	5	hidrocortisona	SC	5mg/0.1ml
Diluyente	5	SSF	SC	0.1ml/día.
Blanco	5	ninguno	-----	-----

Tabla IV Calendario del tratamiento de los subgrupos

Grupos	Días de Tratamiento																							
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Blanco	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
Diluyente	X	X	-	X	-	-	X	-	-	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
HC	X	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
HC-TMA	X	X	-	X	-	-	X	-	-	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
TMA	X	-	-	X	-	-	X	-	-	X	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-

La "X" indica el día en que se administra fármaco, la "S" indica Sacrificio y los guiones indican que no se administra nada.

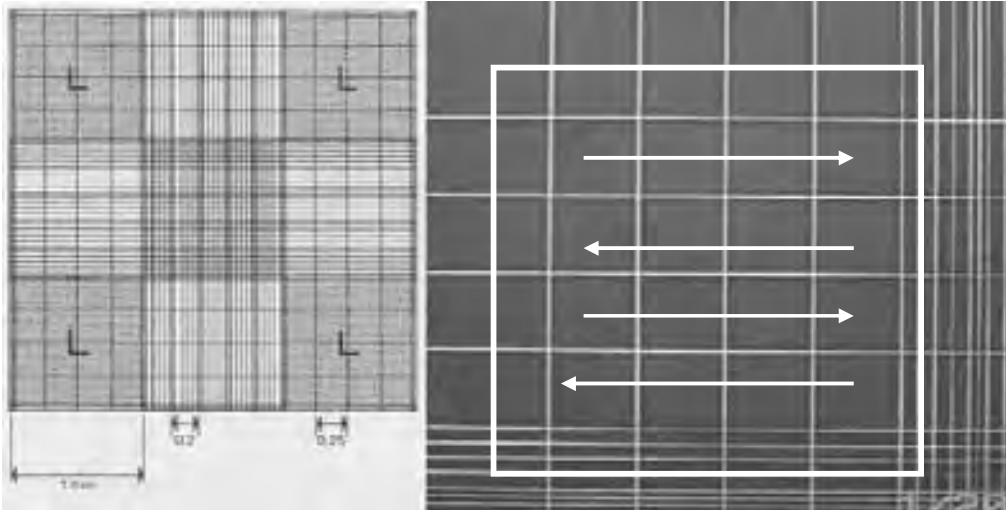
5.6 Metodología. Una vez terminado el experimento, los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical. Se retiró el bazo para ser pesado y obtener el índice esplénico[49]. Se obtuvo el timo para disgregar sus células y los timocitos separados fueron suspendidos en 2ml de amortiguador de fosfatos (PBS) y utilizados para revelar por citometría de flujo (FACS) la expresión de cuatro marcadores de superficie: CD3⁺, CD8⁺, CD4⁺, CD25⁺ y, además, del marcador intracelular del factor de transcripción "Fork head" (foxp3⁺). Al identificar estos marcadores por medio de anticuerpos conjugados, se observó la celularidad del timo en los diferentes grupos de tratamiento. Los timocitos se tiñeron en un tubo CD3⁺,CD4⁺,CD8⁺ para observar la celularidad del órgano, en otro tubo se tiñeron CD4⁺,CD25⁺,Foxp3⁺ para ver la expresión de células T reguladoras.

Se realizó una gráfica de puntos (dot plot) de tamaño contra granularidad para delimitar la mayor parte de las células del timo formando la región 1 a partir de la región 1 se realizó un histograma para identificar a las células CD3⁺ formando la región 2; de la combinación de estas dos regiones se analizó en una gráfica de puntos CD4⁺ contra CD8⁺ las subpoblaciones dobles negativas, dobles positivas y únicas positivas

5.7 Protocolo de tinción para citometría de flujo.

1. El timo se extrajo, se colocó en un portaobjetos estéril, con navaja de bisturí se disecó cada uno de los lóbulos retirando grasa y tejido conectivo, durante este procedimiento el órgano se enjuagaba con PBS de esta forma se eliminó la sangre que rodeaba al órgano.
2. El órgano fue pesado, medido y fotografiado.
3. El tejido se disgregó en un tamiz de organza con una punta roma o émbolo de jeringa y se adicionó PBS para evitar que las células se deshidrataran
4. Se recuperaron las células y se suspendieron en 2ml de PBS.
5. Las alícuotas de 2ml se centrifugaron a 300g/10min.
6. Se decantó de un solo golpe.

7. Se resuspendió en 2ml de PBS.
8. Se hizo una dilución de células 1:50, con azul de tripán para contar células.
9. Se tomaron 10 μ l para hacer un conteo en la cámara de Neubauer, se contaron las células contenidas en los 4 campos de los extremos de la cámara y se obtuvo un promedio de los mismos, este promedio se multiplicó por el factor de dilución y por 10,000.



10. La operación matemática proporcionó el número de células que tiene el órgano.
11. De esta suspensión de células se ajustó el volumen para que en 50 μ l quedaran 500,000 células, mismas que se tiñeron para citometría.
12. Directamente en los tubos de poliestireno, para leer en el citómetro, se agregaron 5 μ l por tubo de una dilución estandarizada del anticuerpo conjugado a un fluorocromo para tinción de superficie.

Tabla V. Anticuerpos y la marca fluorescente.

Anticuerpo	Dilución	Fluorocromo	FL
CD3 ⁺	1/2	PE Cy5	3
CD8 ⁺	1/8	PE	2
CD4 ⁺	1/4	FITC	1
CD25 ⁺	1/10	PE	2
Foxp3 ⁺	1/2	ALEXA 647	4

FL es el canal del citómetro en el que se detecta la fluorescencia emitida por los fluorocromos de los anticuerpos

13. Se añadió 50 μ l de la suspensión celular
14. Se agitó la suspensión celular
15. Se incubó 30 min. A 4°C
16. Se añadió 500 μ l de PBS se agitó y centrifugó a 400g/5min
17. Se decantó y agitó la suspensión celular
18. Se adicionaron 400 μ l de paraformaldehído al 1% para las tinciones de superficie (CD3⁺, CD8⁺ y CD4⁺), para la tinción intracelular (CD4⁺, CD25⁺, Foxp3⁺) se agregaron 500 μ l de paraformaldehído al 1% y se tomaron 20 minutos de reposo para que la tinción quedara fija en la membrana.
19. Se agitaron los tubos de tinción de superficie únicamente.
20. Se refrigeró en la oscuridad los tubos de la tinción de superficie hasta el momento en que se hizo la lectura en el citómetro.
21. Pasados los 20 minutos se centrifugaron los tubos de tinción intracelular a 400 g/5min/4°C
22. Se decantó
23. Se agregó 500 μ l de PBS-Saponina 0.1%
24. Se centrifugó a 400 g/5min/4°C
25. la muestra se bloqueó con 50 μ l de PBS-Saponina 0.1%-Skim milk 5% y se incubó 30 minutos a 4°C.
26. Pasado el tiempo de incubación, se agregaron 500 μ l de PBS-Saponina
27. Se Centrifugó a 400 g/5min/4°C y se decantó.
28. Se Agitó la pastilla de células y se adicionaron 5 μ l por tubo del anticuerpo intracelular anti-foxp3⁺ y se incubó en la oscuridad a 4°C por 30 min.
29. Pasado el tiempo se adicionaron 500 μ l de PBS-Saponina 0.1%
30. Se centrifugó a 400 g/5min/4°C y se decantó.
31. Finalmente se adicionaron 400 μ l de paraformaldehído 1% al tubo para la tinción intracelular y los tubos se almacenaron en la oscuridad a 4°C hasta el momento de leerlos 24 horas después.

Las muestras fueron leídas en el citómetro de flujo de cuatro colores FACSCalibur con el programa Cell Quest 10 y en el citómetro Dako CyAn ADP, con el programa Summit v 4.3 y fueron analizadas con el programa Flowjo 7.2.4 (treeStar, Ashland, OR, USA).

5.8 Modelo estadístico utilizado

Los resultados obtenidos en el transcurso del experimento fueron analizados estadísticamente, por una prueba de T no paramétrica de una cola, con un valor de P exacto y la diferencia en la media de <0.05 , la corrección se hizo por una U de Mann-Whitney, para comparar tres grupos simultáneamente se hizo un análisis de varianza de una cola sin distribución de Gauss con 95% de intervalo de confianza y comparación de Tukey. Ambos modelos estadísticos se realizaron con el programa GraphPad Prisma 5.

6. Resultados

6.1 Citometría de flujo.

Al realizar el análisis por Citometría de flujo se tomaron en cuenta dos parámetros que, aunque son relativos matemáticamente, permiten explicar el comportamiento de las células que se analizaron.

El primero fue el cálculo del porcentaje de células que indica la cantidad de células que fueron positivas al marcador deseado, en nuestro caso $CD3^+$, $CD4^+$ $CD8^+$ y $CD4^+$ $CD25^+$ $Foxp3^+$. El segundo parámetro fue la Intensidad Media de Fluorescencia (IMF) que es una medida de la mayor o menor cantidad de un marcador en particular que expresa una determinada población de células en su membrana.

6.2 Determinación de la población de linfocitos $CD3^+$

Una vez que se adquirió la suspensión de células del timo, se obtuvo la gráfica de puntos de tamaño contra granularidad para definir la población de células para analizar siendo un porcentaje entre 95-98% en los diferentes experimentos realizados (Región 1) Ver la Figura 1. Usando un control de autofluorescencia se determinó la posición de los marcadores para definir a las células $CD3^-$ que son todas las células que no son linfocitos T y las células preT recién ingresadas al timo, y $CD3^+$ que son linfocitos T. Ver la Figura 2.

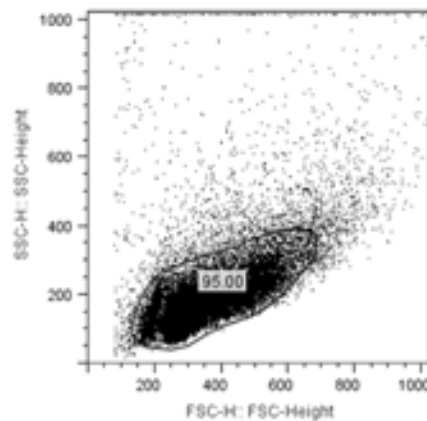


Figura 1. Gráfica de puntos de tamaño contra granularidad de linfocitos T

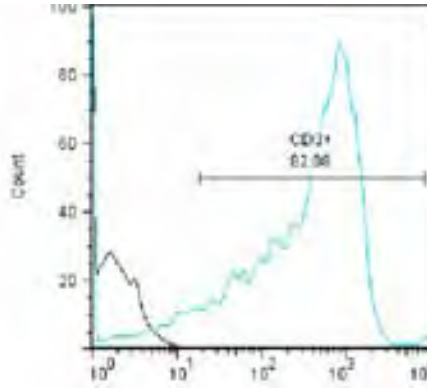


Figura 2. Histogramas sobrepuestos de células CD3- y linfocitos CD3+

A continuación, en tres repeticiones en las que se adquirieron 15,000 eventos de cada muestra a partir de región 1 se obtuvieron los porcentajes de la población de linfocitos T CD3⁺, se observó que no hubo diferencias estadísticamente significativas al comparar la población de linfocitos CD3⁺ que se encontró en cada grupo, como se puede observar en la Figura 3.

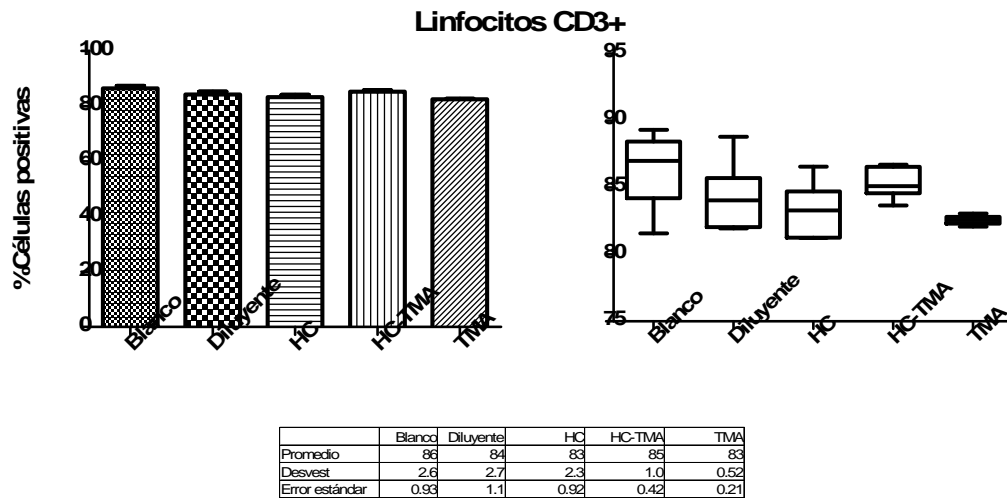


Figura 3. Comparación por percentil 75 en donde no se observan eventos extraordinarios y prueba no paramétrica ANOVA de una vía con comparación de Tukey entre grupos de la población de linfocitos CD3⁺ en donde no se observan diferencias estadísticamente significativas.

Al comparar al grupo Blanco y el Diluyente, estadísticamente resultaron muy similares y la comparación en percentiles permite conocer que no existieron eventos extraordinarios en el parámetro de comparación entre poblaciones. Ver la Figura 4.

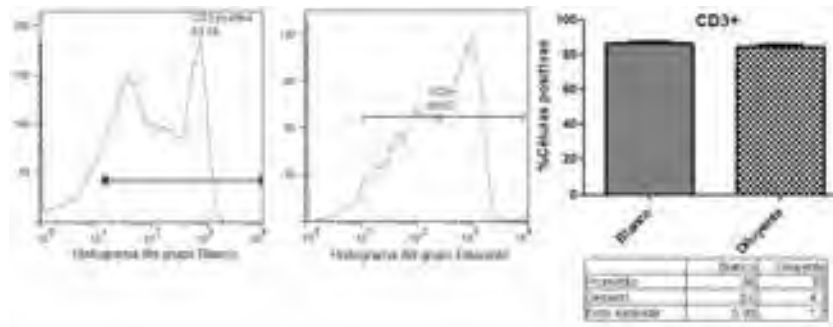


Figura 4. Histogramas de la población CD3+ del grupo Blanco contra Diluyente, y gráfica de barras con prueba de T no paramétrica con comprobación de Mann Whitney sin presentar diferencias estadísticamente significativas

6.3. Determinación de la población de linfocitos Dobles Negativos (DN) y Dobles Positivos (DP).

A partir de la región o gate 2 positiva a CD3⁺ se realizó el análisis de las poblaciones CD4⁺ y CD8⁺. La región se dividió en cuatro cuadrantes, que recuerdan a un pájaro o paloma, en el cuadrante 1 se encontró la población de linfocitos CD4⁺, en el cuadrante 2 se ubicó la región de las células dobles positivas (CD4⁺ CD8⁺), en la región 3 se encontró la población de linfocitos dobles negativos (CD4⁻ CD8⁻) y en la región 4 quedó la población de linfocitos CD8⁺. Es notable que la imagen mejor definida se encuentra en el grupo Blanco como se observa en la Figura 5.

La población DN, mostró ser ligeramente mayor en el grupo de ratones Blanco (7.4%) esta diferencia es estadísticamente significativa cuando se le compara con el grupo HC (4.5%) véase la Figura 5A. En una forma inversamente proporcional, la población de células DP resultó inferior en el grupo blanco (53%), pero no hay significancia estadística, ver la Figura 5B.

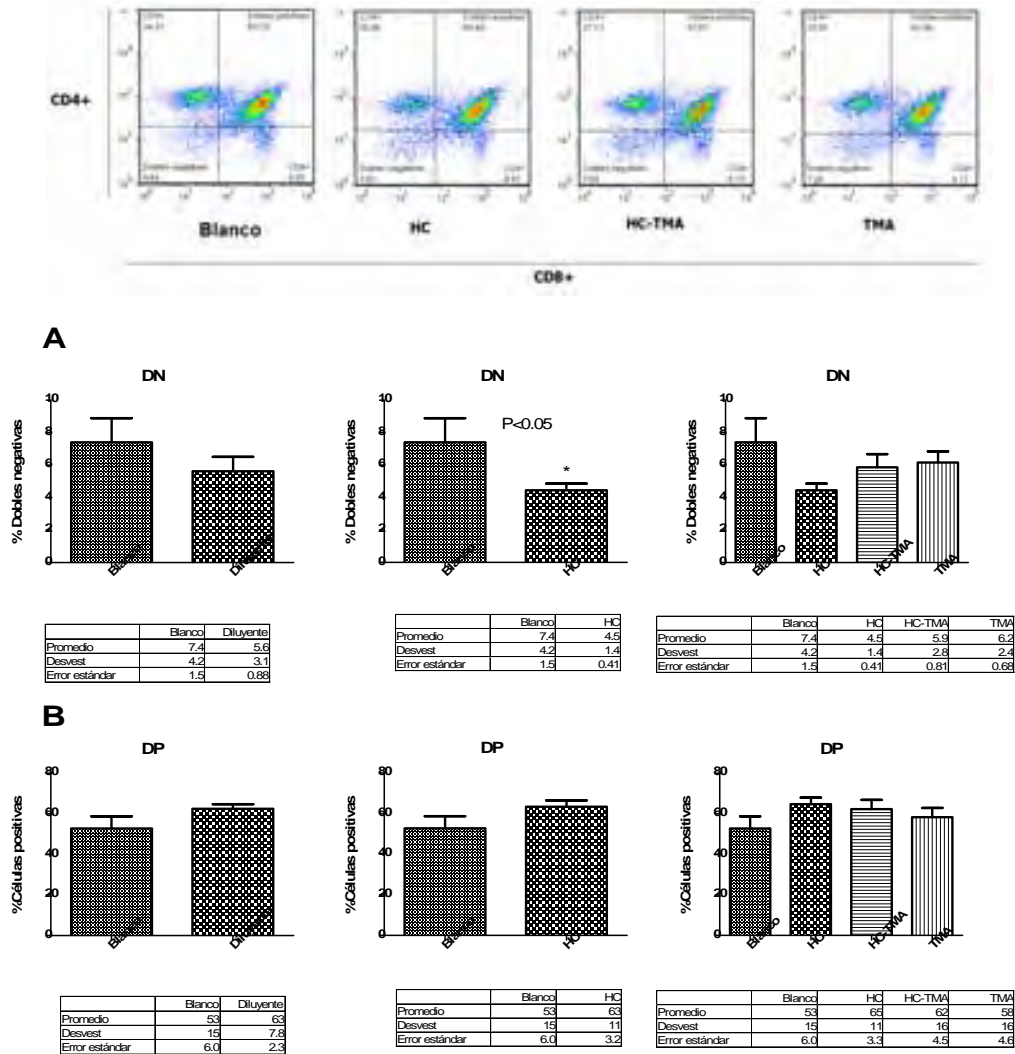


Figura 5. Graficas de barras de los linfocitos dobles negativos y dobles positivos, en el análisis se utilizó la prueba de T no paramétrica con comprobación por Mann Whitney y una ANOVA de una vía con comparación por Tukey, se observa en: A) dobles negativos (DN) hay disminución estadísticamente significativa solo en la población HC contra el grupo Blanco, y B) Dobles positivos (DP) en donde no se observan diferencias estadísticas significativas, el grupo Blanco es menor con respecto a los demás.

6.4. Determinación de la población de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺.

A partir de la población de linfocitos CD3⁺ y dentro de esta población se realizó una región para analizar las poblaciones de linfocitos CD4⁺ y CD8⁺. En esta población si hubo diferencias entre grupos (P<0.05), por lo que en primer lugar se compararon entre si los grupos Blanco (ratones que no tuvieron tratamiento alguno) y Diluyente (ratones a los que se les administró agua inyectable) figura 6.

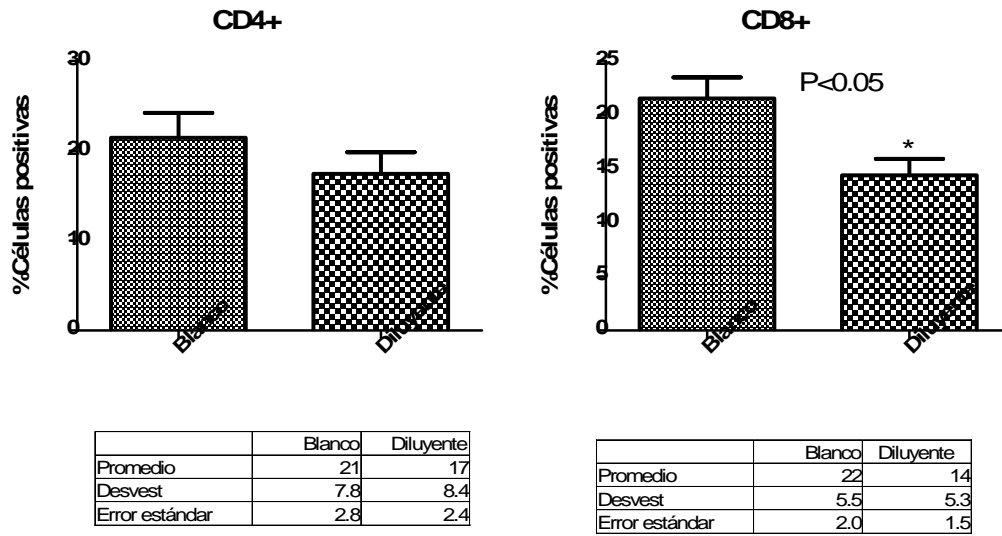


Figura 6. Poblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+, ambas por la prueba T no paramétrica. Con comprobación de Man Whitney, el grupo diluyente es menor, y muestra una diferencia estadísticamente significativa entre los linfocitos CD8+ del grupo Diluyente con respecto al Blanco.

En la población CD4⁺ se observó una disminución del Diluyente (17%) al respecto del Blanco (21%) en los linfocitos en la población CD8⁺ hubo un comportamiento semejante, Diluyente (14%) Blanco (22%) en ésta última si hay diferencia estadística significativa P<0.05.

Al hacer una comparación entre el grupo Blanco e hidrocortisona (HC) para inducir la involución del timo, se observó una disminución en el número de linfocitos CD4+ (21 sobre 19%) y CD8+ (22 sobre 17%) en el grupo de animales tratados con hidrocortisona, como se observa en la Figura 7. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la disminución de ambas poblaciones.

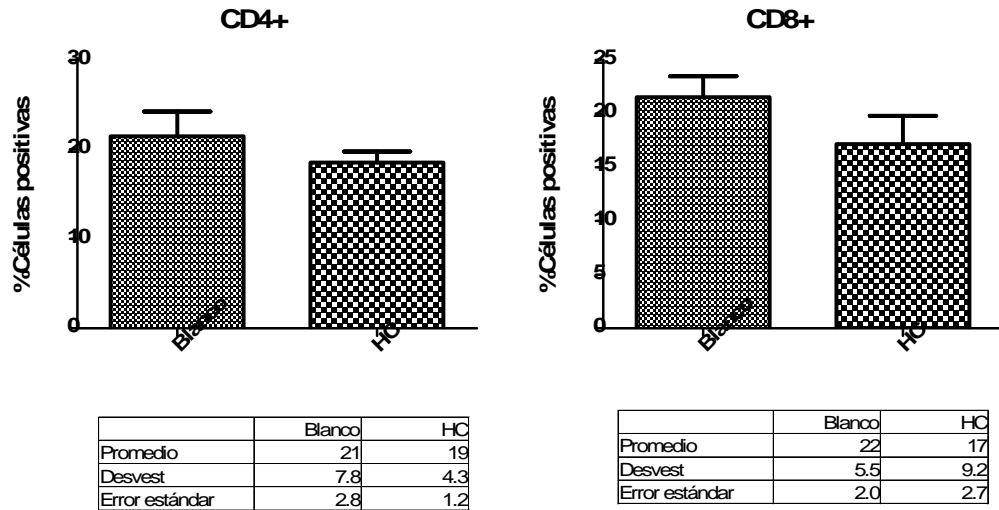


Figura 7. Comparación de poblaciones CD4+ y CD8+ entre los grupos Blanco y HC por la prueba T no paramétrica con comprobación de Mann Whitney, en donde las poblaciones CD4+ y CD8+ son menores en el grupo HC.

Las mismas poblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+ se estudiaron en los grupos de ratones identificados como HC, HC-TMA y TMA. Al compararlos entre si y contra el grupo Blanco, como se puede observar en la Figura 8 se observa que la población de linfocitos T CD4+ del grupo HC es significativamente más pequeño que los demás ($P < 0.05$) (19%) y los grupos HC-TMA y TMA fueron similares entre ellos y mayores al Blanco; mientras que en los linfocitos CD8+ se observa que el grupo Blanco es superior a todos los demás (22%), en esta población el grupo HC-TMA es el menor de todos ellos (15%) pero esto no es significativo.

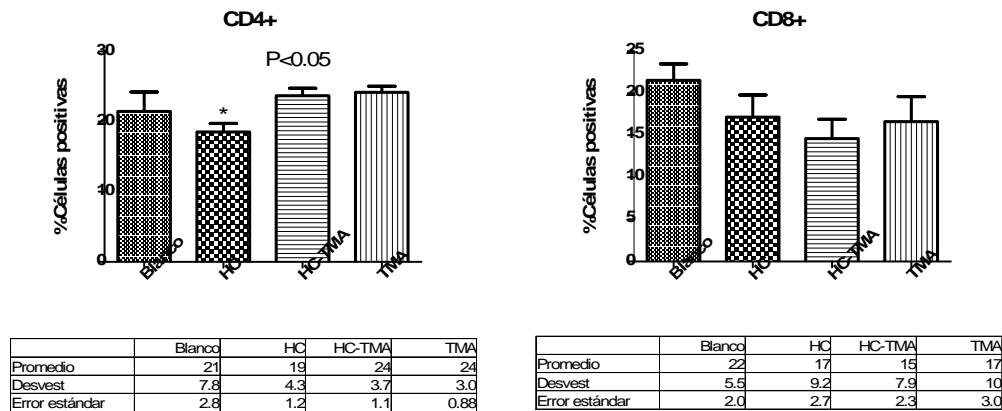


Figura 8. Comparación de las poblaciones CD4+ y CD8+ entre los grupos Blanco, HC-TMA y TMA en donde se muestran diferencias estadísticas significativas en el grupo HC por ANOVA y comparación de Tukey.

En cuanto a las medidas de la IMF o sea la medida relativa de la expresión de moléculas CD3⁺, CD4⁺ y CD8⁺ en la superficie de los linfocitos, la población de células DN resultó muy pequeña por lo que no se le dio valor estadístico. Los valores de IMF en los porcentajes de linfocitos CD3⁺ muestran que en el promedio todos los grupos son idénticos (IMF 110) esto se observa en la Figura 10A. Al igual que en el análisis porcentual se compara al grupo Diluyente contra el Blanco, en la población CD4⁺ se manifiesta una diferencia estadística significativa ($P < 0.04$) (IMF 25) para el grupo diluyente, el cual es muy superior (IMF 64) Figura 9A, los linfocitos T CD8⁺ también presentan diferencias estadísticas significativas ($P < 0.05$) ya que hay un gran aumento en el grupo Diluyente (IMF 360), contra el Blanco (IMF 97), nótese que la expresión de CD8⁺ es mucho mayor que la de CD4⁺, Figura 9B. Al comparar al grupo HC con el grupo Blanco se vuelve a observar una diferencia estadística significativa $P < 0.05$, en la población CD4⁺ el grupo HC es superior (IMF 67), comparado con el grupo Blanco (IMF 25) Figura 9C, la población CD8⁺ en su grupo HC es muy superior (IMF 390) comparada con el grupo Blanco (IMF 97), la expresión de moléculas en la membrana de los linfocitos es más para la población CD8⁺ Figura 9D.

En todas las repeticiones del experimento se observó que la IMF de la molécula CD4⁺ se expresa mucho menos en la superficie de los linfocitos de manera significativa ($P < 0.05$) especialmente en el grupo Blanco (IMF 25) Figura 10B, mientras que CD8⁺ presenta una IMF 500 veces mayor y es altamente significativa ($P < 0.0001$), aunque también en el grupo Blanco es muy pequeña (IMF 97) Figura 10C.

La molécula CD4⁺ de los linfocitos DP se expresa más en el grupo HC (IMF 54) seguida por HC-TMA (IMF 53), la molécula CD8⁺ se expresa más en los grupos HC-TMA y TMA (IMF 540) Figura 10D.

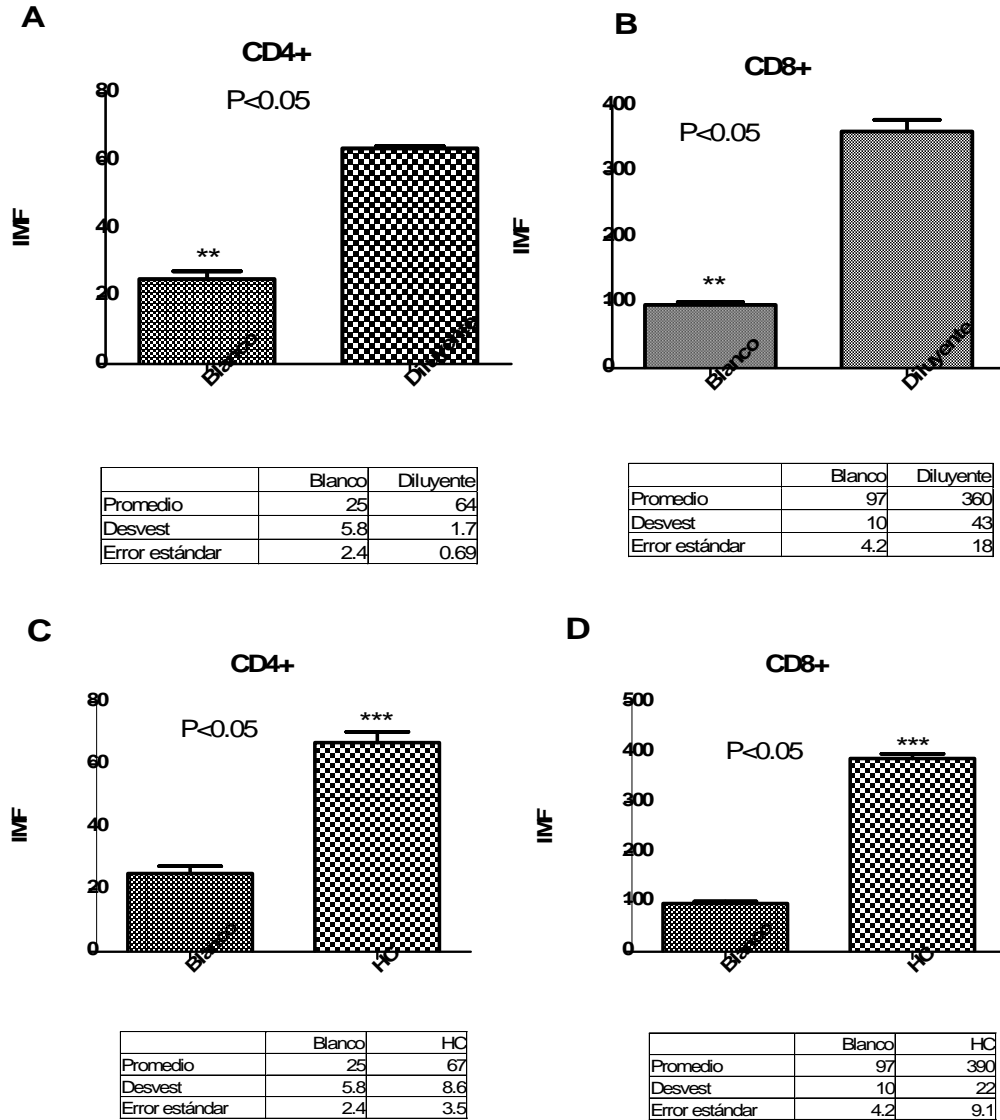


Figura 9. Gráficas de barras en donde se comparan los grupos Blanco y diluyente de CD4+ (A) y CD8+(B), en ambas poblaciones la IMF es mayor en el grupo Diluyente, este aumento es significativo estadísticamente por una prueba de T no paramétrica con comprobación de Mann Whitney. En la comparación entre Blanco e Hidrocortisona de CD4+ (C) y CD8+(D), la expresión de las moléculas comparadas con el grupo Blanco en CD4+ es menor a 100 entre ambos grupos, mientras que la expresión de CD8+ es muy superior principalmente en HC, muestran diferencias estadísticas por prueba de T no paramétrica y comprobación de Mann Whitney .

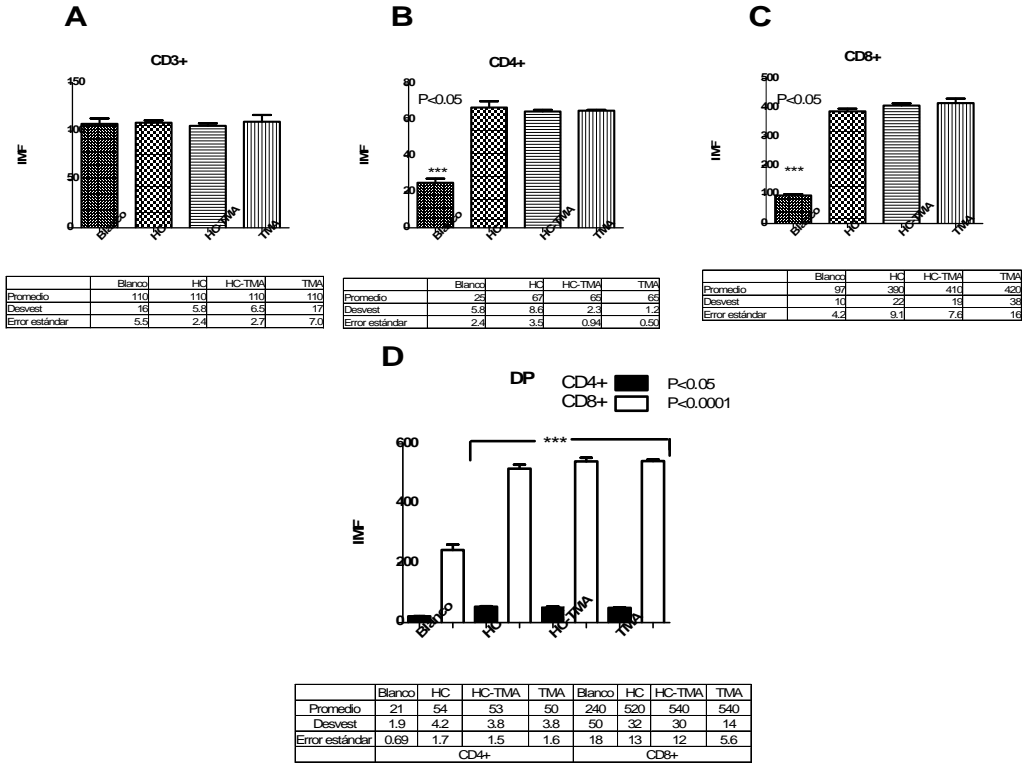


Figura 10. Comparación de los valores de la IMF entre los grupos Blanco HC, HC-TMA y TMA por ANOVA con comparación de Tukey. En la imagen A no se observan diferencias en la expresión de CD3+, mientras que en la imagen B hay una gran diferencia en la expresión de linfocitos CD4+ en el grupo Blanco en relación al los demás grupos. En la figura C se observa que ocurre un lo mismo en la expresión de moléculas CD8+. Finalmente, en la figura D, los valores de la IMF revelan que la expresión de CD4+ y de CD8+ en el grupo blanco también es menor con respecto a los otros grupos, es notoria la gran expresión de moléculas CD8+.

6.5. Determinación de la población de linfocitos T reguladores.

Debido a que la población de linfocitos T reguladores es muy pequeña (4-10% del total de células linfoides), los anticuerpos utilizados para definirlos fueron los marcadores de superficie CD4⁺ y CD25⁺ y el marcador intracelular Foxp3⁺.

Se realizaron tres repeticiones, de cada muestra se adquirieron 25,000 eventos. Al adquirir se hizo una primera región de tamaño contra granularidad y esta región se tomó otra región en donde se ubico a la población de linfocitos CD4⁺. Cabe mencionar que el porcentaje de esta población fue por arriba del 92%
Figura 11

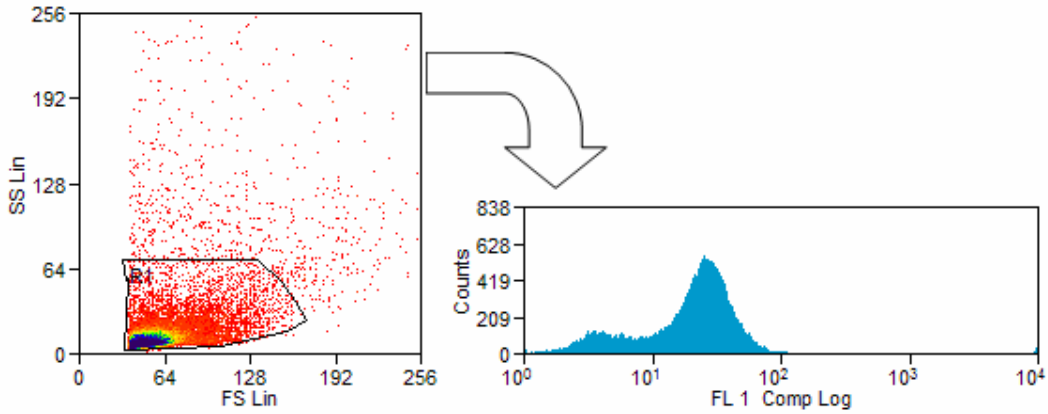


Figura 11. Gráfica de puntos de tamaño contra granularidad en donde se define la región 1-gate 1 y el histograma en donde se observa la población de linfocitos CD4+, a partir de la primera década en la escala de fluorescencia

Como la población de linfocitos Tregs es muy particular por sus características de identificación ya que se utiliza un marcador intracelular y otro de membrana, además de que es muy pequeña, fue necesario utilizar controles de isotipo para eliminar en el análisis de la población la tinción inespecífica y considerar únicamente el porcentaje de células realmente positivas al marcador Figuras 12 y 13.

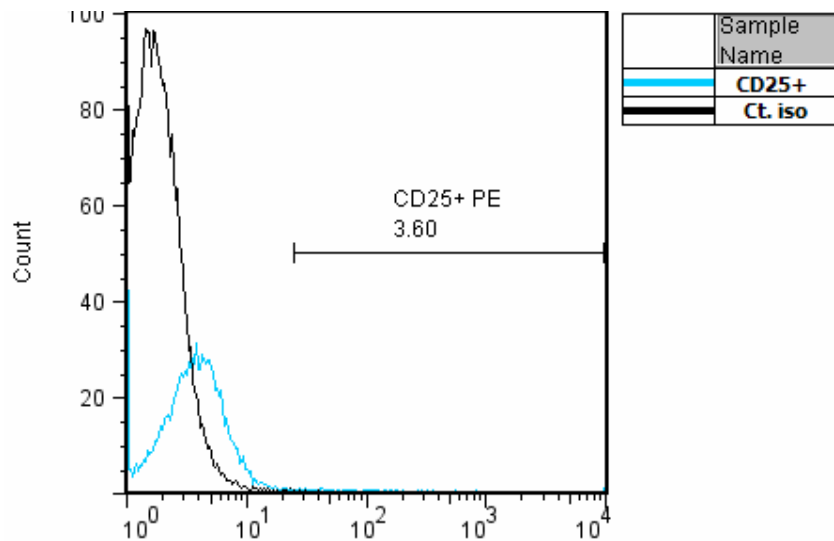


Figura 12 Histogramas sobrepuestos, que muestran el patrón de tinción de los linfocitos con el anticuerpo anti-CD25+, se muestra en color azul el control de isotipo, CD25 se ve en color negro.

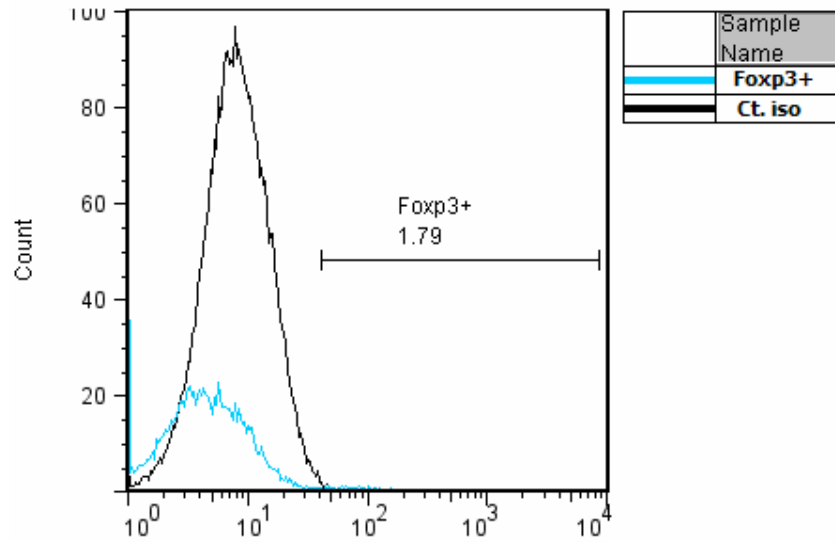


Figura 13. Histogramas sobrepuestos, que muestran el patrón de tinción de los linfocitos para la detección de Foxp3 intracelular. En negro se encuentra el control de isotipo y en azul el anticuerpo anti- Foxp3.

A partir de los linfocitos CD4+ se analizó la población de Tregs en las gráficas CD25+ contra Foxp3+ en ellas se observó que había una diferencia significativa ($P < 0.05$) en la expresión de CD25 y Foxp3 entre el grupo blanco y el grupo diluyente, como se puede apreciar en la Figura 14.

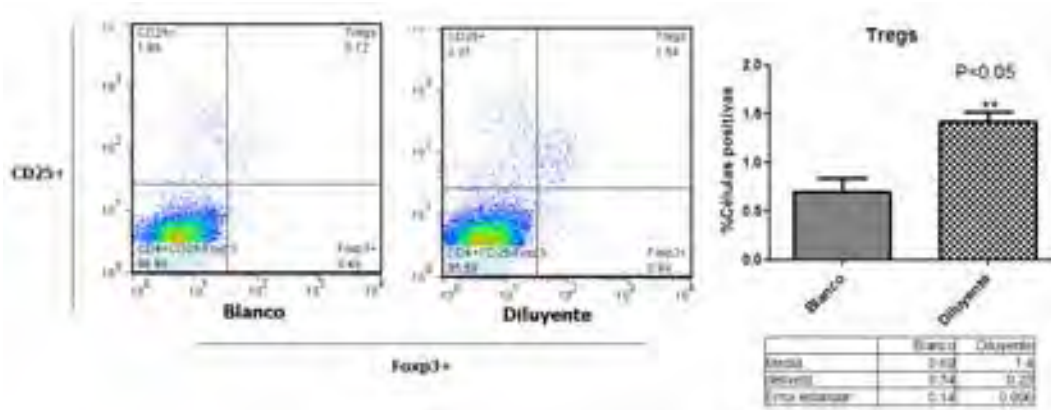


Figura 14. Gráfica de puntos para el análisis de linfocitos Tregs comparando el grupo Blanco contra Diluyente. Mediante la prueba T no paramétrica con comprobación de Mann Whitney se encontró una diferencia significativa entre ambos grupos.

Al comparar las poblaciones de linfocitos Tregs entre los grupos Blanco Diluyente y HC, como se observa en la Figura 15, se encontró incremento significativo ($P < 0.05$) de Tregs en el grupo Diluyente.

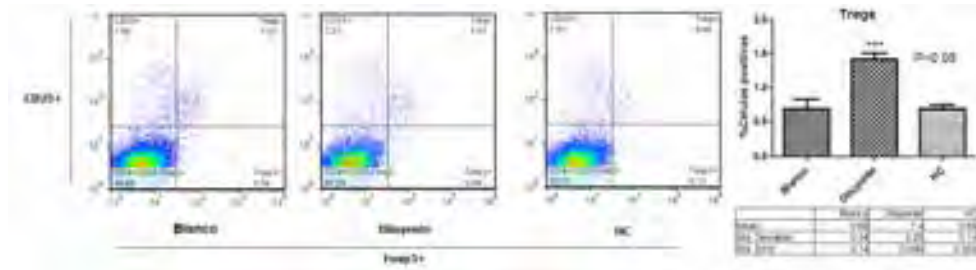


Figura 15. Gráfica de puntos de la población de linfocitos Tregs de los grupos Blanco, Diluyente y HC. Al compararlos por prueba de T no paramétrica con comprobación por la prueba de Mann Whitney se encontró una diferencia significativa en la población diluyente

El grupo Blanco y HC tienen un promedio idéntico (0.69%). Al observar que la hidrocortisona no tiene efecto en la población de Tregs era necesario saber que efecto tenía la timalfasina 1α sobre ratones cuyo timo había involucionado después de la inyección con hidrocortisona y en aquellos que no fueron inyectados para conocer el efecto directo de la timalfasina sobre ratones clínicamente sanos.

Los resultados indican que hay un aumento significativo ($P < 0.05$) de Tregs, por encima del grupo Blanco inclusive, en aquellos animales que recibieron primero la inyección de HC y después la de TMA (0.97%). En cambio, en el grupo de animales que solo fueron inyectados con timalfasina $\alpha 1$ no hay aumento (0.68%) Figura 16.

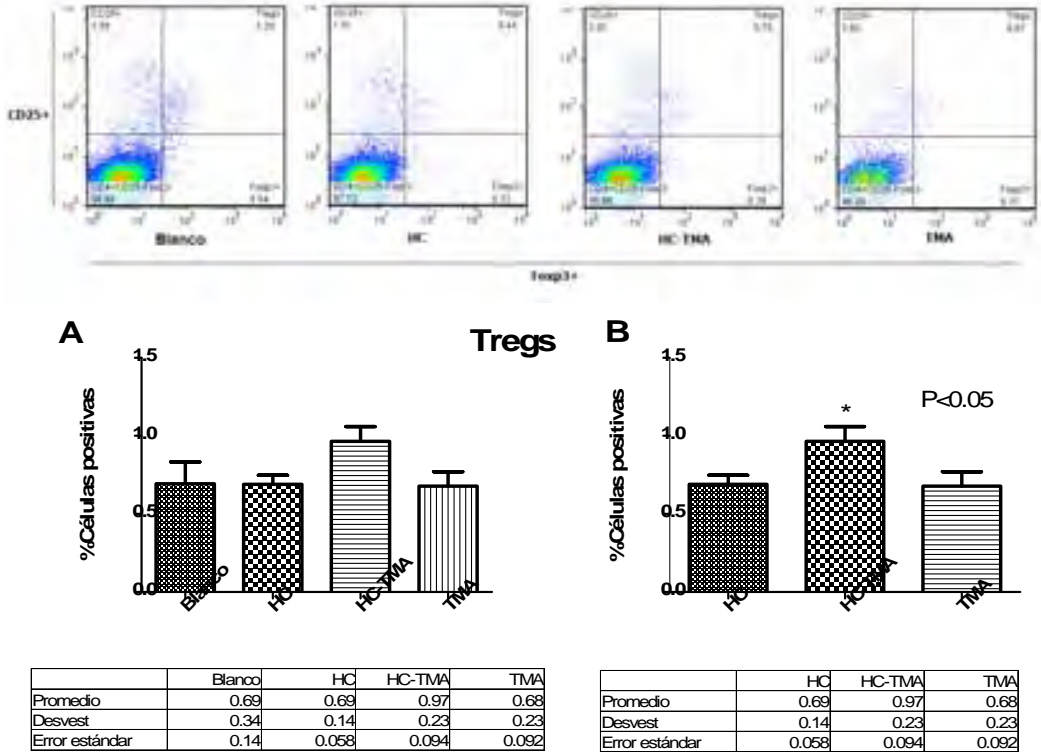


Figura 16. Gráficas de puntos de los grupos Blanco, HC, HC-TMA y TMA en donde se muestran los linfocitos Treg nótese que la población Blanco posee más Tregs. El ANOVA realizado con la comparación de Tukey, revela en A) que las poblaciones Blanco y HC estadísticamente son idénticas y B) el grupo HC-TMA es estadísticamente significativa con respecto a los demás.

Como se ha visto hasta ahora, el porcentaje de células positivas difiere de la cantidad de marcadores expresados en los linfocitos, por ello es necesario tomar en cuenta la IMF de las Tregs ya que el marcador Foxp3+ indica una activación intracelular en el proceso de transcripción. Por ello se cuantificó la expresión de moléculas (CD25+ en la membrana y Foxp3+ intracelular) en los Tregs y los resultados se muestran en la Figura 17.

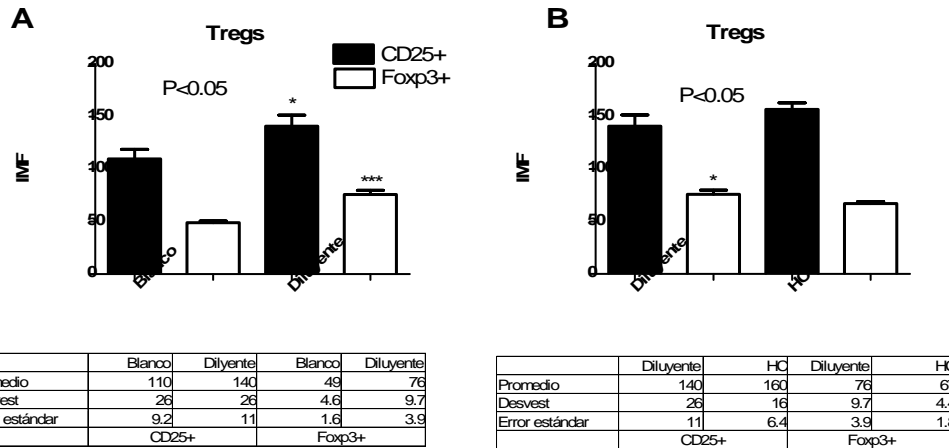
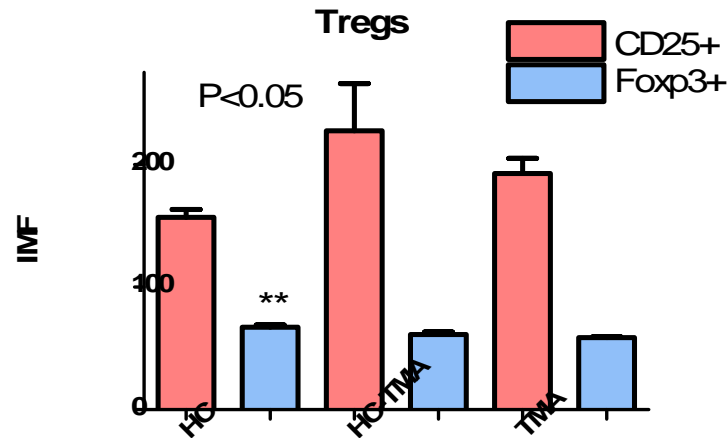


Figura 17. Grafica de barras en donde se compara la expresión citoplásmica de Foxp3 y la de membrana de CD25+ en las muestras del Blanco vs. Diluyente (A) en donde se observa diferencia significativa para el diluyente por una prueba de T con comprobación de Mann Whitney. y en Diluyente vs. HC. (B), aquí se encontró diferencia significativa solo en el Foxp3+ del grupo Diluyente por la misma prueba estadística.

Debe notarse que la expresión de CD25+ de todos los grupos que a continuación veremos es mucho mayor en un rango de 110 hasta 275 de IMF, mientras que Foxp3+ no llega a 80, esto es debido a que la actividad de estas moléculas es diferente aunque coordinada.

Comparando el grupo Blanco contra Diluyente Figura 17A se observa un aumento en la expresión de ambos marcadores en el Diluyente este aumento es estadísticamente significativo ($P < 0.05$) En la comparación entre grupo Diluyente y HC se observa un aumento estadísticamente significativo ($P < 0.05$) en la expresión de Foxp3+ en el grupo Diluyente (IMF 76), en la comparación de CD25+ es el grupo HC (IMF 160) el que es mayor Figura 17B.

En la comparación entre los grupos HC, HC-TMA y TMA, la expresión de CD25+ es mayor en el grupo HC-TMA (IMF 230). Por otra parte, los resultados también revelan que la expresión de Foxp3+ es mayor en el grupo HC (IMF 67) y resulta ser estadísticamente significativa ($P < 0.05$) Figura 18.



	HC	HC-TMA	TMA	HC	HC-TMA	TMA
Mean	160	230	190	67	61	59
Std. Deviation	16	95	30	4.4	5.0	1.9
Std. Error	6.4	39	12	1.8	2.1	0.76
	CD25+			Foxp3+		

Figura 18. En esta gráfica de barras se observa el IMF en rosa de la expresión de CD25+ y en azul de Foxp3. Los valores más altos de CD25+ corresponden a los grupos tratados con TMA, especialmente el grupo HC-TMA. En cambio, con el marcador Foxp3 sucede al contrario, ya que la expresión es mayor en el grupo HC, mientras disminuye en los grupos tratados con TMA. Esta última diferencia es estadísticamente significativa por un ANOVA comparado por Tukey.

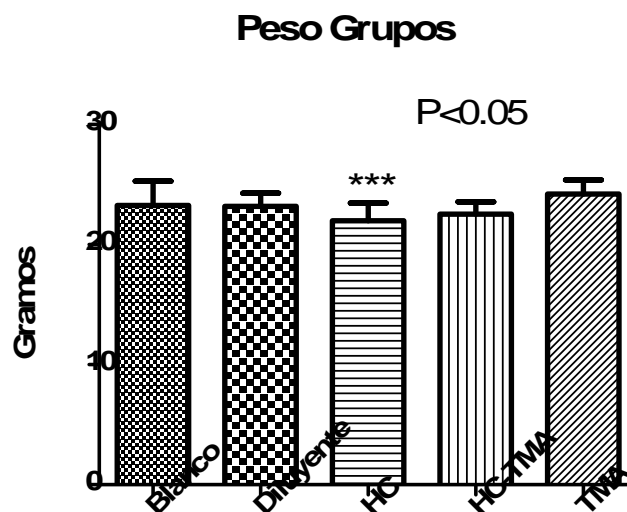
6.6 pesos e índices.

Durante el experimento y sus repeticiones, se tomaron en cuenta los pesos de los timos y bazo para obtener sus respectivos índices (tímico y esplénico) además del peso corporal de los ratones que conformaron los cinco grupos, en la tabla VI se observan los promedios.

Tabla VI promedios de pesos e índices

Grupo	Corporal g	Timo g	IT	Bazo g	IE
Blanco	23.1	0.043	1.8	0.111	4.7
Diluyente	23.2	0.046	1.97	0.098	4.25
HC	22	0.050	2.07	0.093	3.83
HC-TMA	22.5	0.057	2.52	0.089	3.94
TMA	24.2	0.053	2.19	0.09	3.71

En el desglose de esta tabla se aprecia más adelante en las gráficas de cada uno de estos valores. Así el peso corporal si se ve ligeramente afectado en los ratones del grupo HC (22g) siendo el menor, HC-TMA (23g) y TMA(24g) en la comparación entre ellos el grupo TMA resultado ser el que tuvo más ganancia de peso, subjetivamente su aspecto también resultado ser más vivaz y su capa o pelaje también fue más sedosa. Estas diferencias si resultaron ser estadísticamente significativas ($P<0.05$) Figura 19.



	Blanco	Diluyente	HC	HC-TMA	TMA
Media	23	23	22	23	24
Desvest	2.0	1.1	1.5	1.0	1.2
Error estándar	0.45	0.24	0.33	0.23	0.26

Figura 19. Gráfica de barras en la que se compara el peso de los ratones de los 5 grupos del experimento, se observa una diferencia significativa en el grupo HC, por un ANOVA de una cola con comparación de Tukey.

El peso del timo y el bazo también se comparó entre grupos, en el caso del timo se observa que el grupo HC-TMA fue el que más incremento presentó seguido del grupo TMA y del HC Figura 20A, al comparar el grupo Blanco contra el grupo HC-TMA la diferencia resultó estadísticamente significativa ($P<0.05$) Por su parte en el bazo también hubo diferencia estadísticamente significativa ($P<0.05$) ya que los grupos HC HC-TMA y TMA fueron los menores Figura 20B

el grupo que presentó la mayor disminución fue HC-TMA comparado contra el blanco.

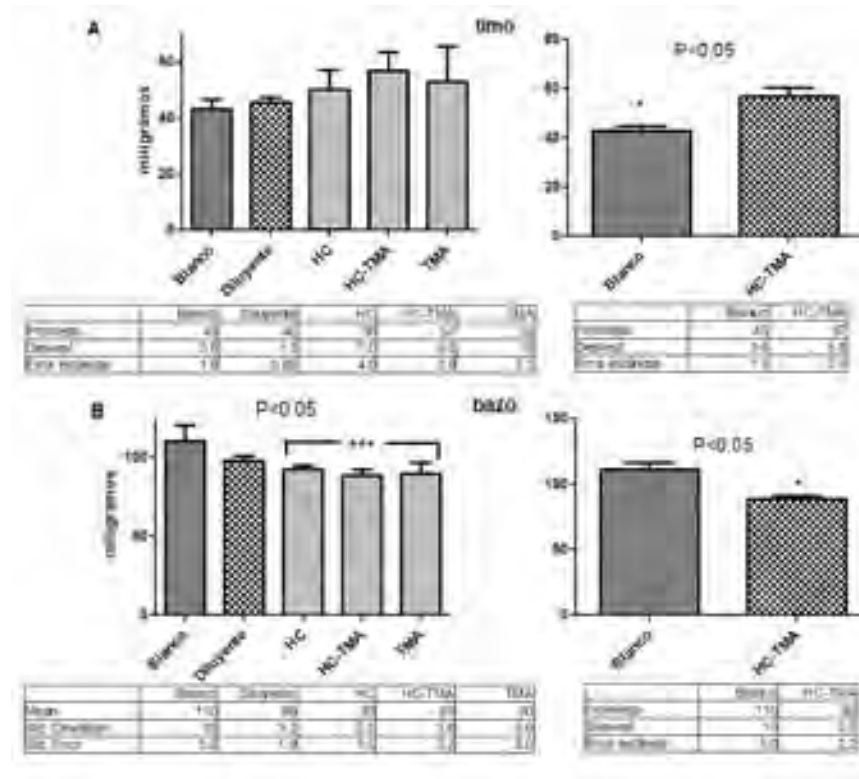


Figura 20. Gráfica de barras que presenta la comparación entre grupos de pesos del timo (A) y el bazo (B), se presentaron diferencias significativas en el grupo HC-TMA, TMA y HC por ANOVA con comparación de Tukey.

También se obtuvo el índice tímico (IT) y el índice del bazo o esplénico (IE), este valor es muy sutil pero su relevancia radica en que refleja estrés al incrementar los índices comparados con el Blanco [27, 50, 51], los resultados del experimento indican que en el timo hubo un ligero incremento, siendo mayor en el grupo HC-TMA, seguido de TMA y HC Figura 21A aunque este aumento no tuvo significancia estadística, en el bazo sucedió que comparado con el grupo Blanco los demás valores resultaron ligeramente menores, el menor de ellos fue el del grupo TMA como se muestra en la figura 21B y esta diferencia si fue estadísticamente significativa por ANOVA ($P < 0.05$), al comparar al Blanco contra cada uno de los grupos experimentales por T no paramétrica Resultaron estadísticamente significativos los grupos HC, HC-TMA y TMA.

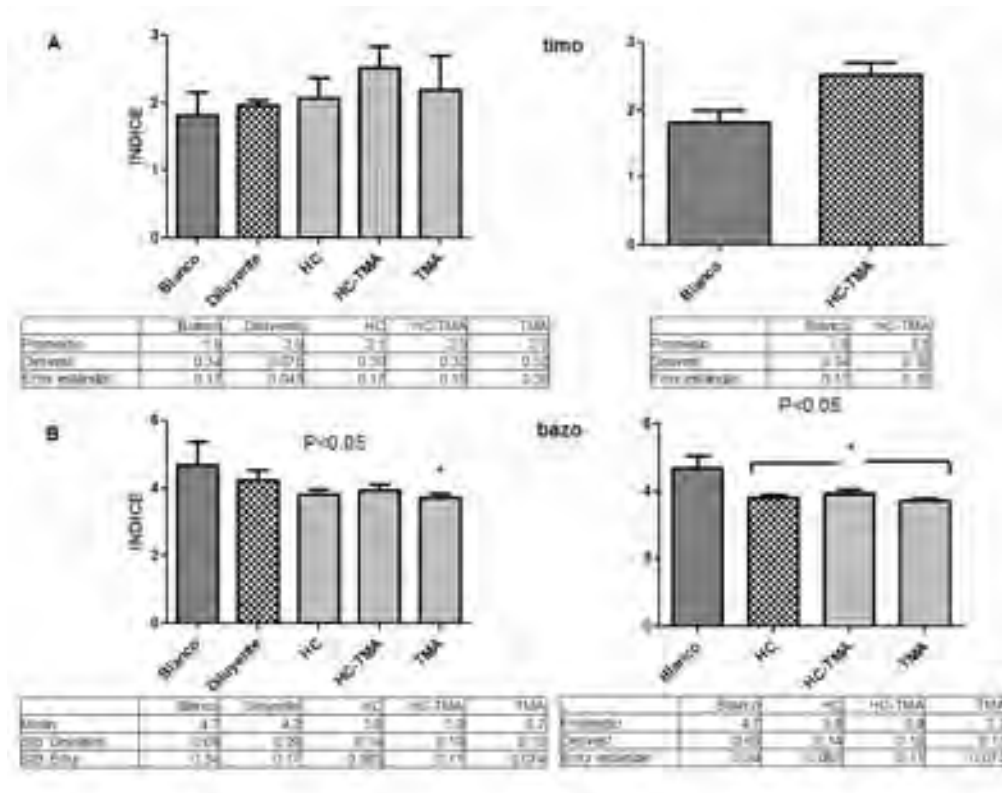
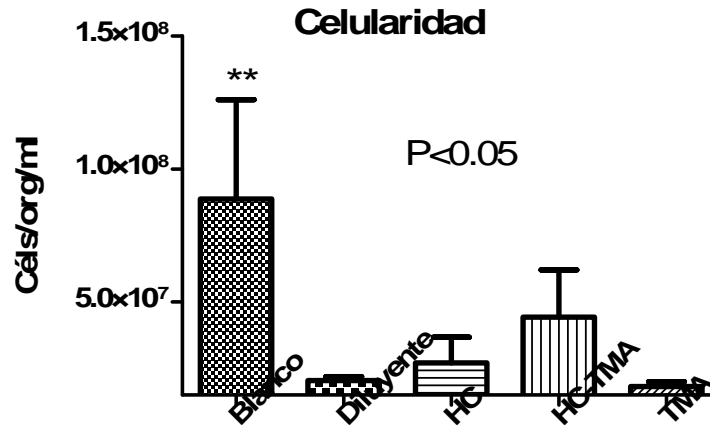


Figura 21. Gráficas de barras A) índice tímico en donde el menor resulta se el del grupo HC, B) índice esplénico el menor es la TMA, por análisis de varianza con comparación de Tukey se muestra diferencia significativa solo en el grupo TMA con respecto de los demás.

La celularidad del órgano se muestra en la figura 23 presenta diferencias estadísticas significativas $P < 0.05$ en el grupo Blanco que resultó ser el de mayor celularidad, seguido de HC-TMA si bien aunque el grupo HC tuvo mayor número de células que otros grupos durante el manejo al momento del conteo incluyeron el colorante azul de tripán.



	Blanco	Diluyente	HC	HC-TMA	TMA
Media	89,000,000	21,000,000	27,000,000	44,000,000	18,000,000
Desvest	37,000,000	1,400,000	9,800,000	18,000,000	1,900,000
Error estándar	19,000,000	830,000	5,600,000	10,000,000	1,100,000

Figura 22. Gráfica de barras, de los millones de células que conforman el timo se observa diferencia estadística significativa en el grupo Blanco por ANOVA con comparación de Tukey.

6.7 Histología.

El estudio histológico permitió hacer una comparación visual entre las zonas propias del timo y el tejido de sustitución que en este caso es graso. La tinción elegida es H-E, con la que fue posible ver la morfología celular. La figura 23 es una foto 4X, en 23A se observa el timo con sus dos lóbulos, la corteza uniforme, más oscura y grande con respecto a la médula, los dos lóbulos rodeados de su cápsula de tejido conectivo colageno. En la foto 23B del grupo HC. No tuvo la forma característica del órgano, los dos lóbulos se sustituyeron por tejido adiposo y solo quedaron porciones, la corteza es irregular, más delgada comparada con el grupo Blanco y la tinción no fue uniforme. La figura 24 muestra un acercamiento a 40X; en 24 A se observa que la morfología celular se conservó en el grupo TMA comparado con el Blanco, la figura 24B es una foto del grupo HC-TMA, en la corteza hay células gigantes con varios núcleos, se encuentran adyacentes a la cápsula y algunas más en dirección a la unión corticomedular, es notorio que estas células se vieron en tres ratones pertenecientes al grupo HC-TMA pero no se vieron en los demás grupos, hasta ahora la literatura no menciona nada de esta morfología, en las fotos

consultadas en Atlas histológicos tampoco, estas células son mayores que los macrófagos propios del timo.

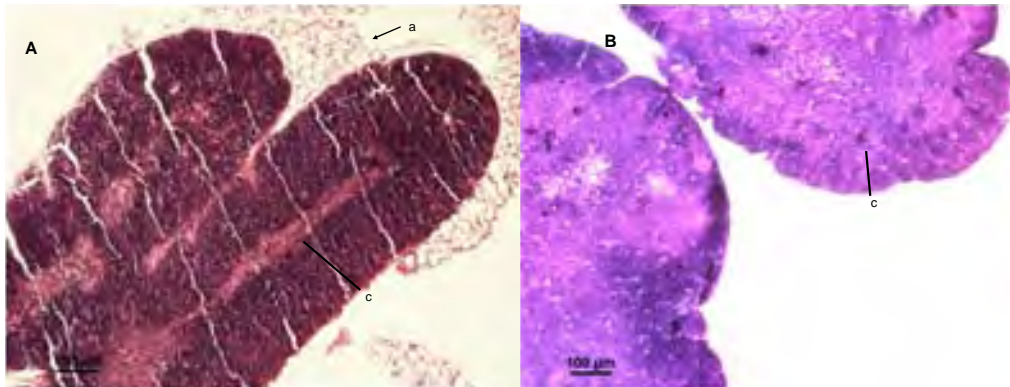


Figura 23 Timo H-E 4X, ratones BALB/c de 8 semanas de edad A) corte histológico del grupo blanco en donde se observa al timo conformado por dos lóbulos rodeado de tejido adiposo (a), la corteza es uniforme y se tiñe más intensamente, B) corte histológico del grupo HC el timo no tiene la morfología normal del órgano, se observa como lóbulos separados entre si la corteza (c) se observa muy adelgazada.

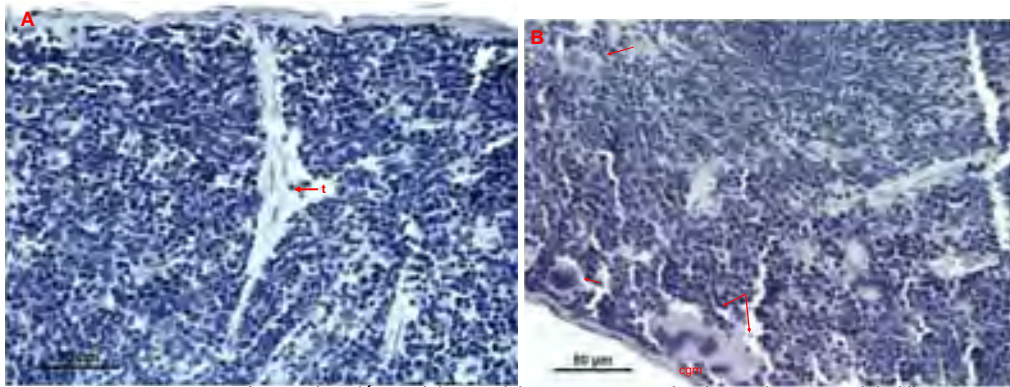


Figura 24 Timo H-E 40X A) corte histológico del timo del grupo TMA en donde se observa un lobulillo mostrando una morfología celular propia de la corteza con su trabécula (t) bien definida, B) corte histológico del grupo HC-TMA, se observa en la corteza junto a la cápsula células gigantes multinucleares, células similares se encuentran en otros sitios de la corteza.

7. Discusión.

7.1 Reducción en las poblaciones del timo por efecto de la HC.

Los resultados obtenidos confirmaron que la inyección la dosis de HC 10mg, reduce las cantidades de linfocitos T intra-tímicos.

Diez días después de haber inyectado la HC, el porcentaje de linfocitos T CD3⁺ no se ve afectado, seguramente porque aunque se encuentran en la corteza y es aquí donde la HC tiene mayor efecto, son células cuyo fenotipo define a los linfocitos T. Todos los grupos tuvieron promedios similares y lo mismo se observó al calcular la IMF es decir la cantidad de moléculas expresadas en su membrana cuyo porcentaje fue idéntico en todos los grupos de experimentación. Esto sugiere que la maduración se acelera como un efecto compensatorio de la agresión que sufre el órgano con los fármacos. La población de linfocitos DN es muy pequeña, sin embargo comienza a ser afectada por la HC porque aquí con los recién inmigrantes empieza la selección. Esta apoptosis natural más la generada por la hidrocortisona hace que disminuya esta población aún más junto con la evidencia histológica que indica que la corteza comienza a ser sustituida por tejido adiposo. La literatura revisada en este trabajo indica que las células que desaparecen en gran cantidad son DP cuyo porcentaje es el más elevado <80% [35]. Sin embargo como vimos con la población CD3⁺ se ve un incremento en todas las poblaciones que fueron tratadas con los fármacos y su IMF indica además que expresan más marcadores en su membrana. Si bien es cierto el efecto apoptótico de la hidrocortisona también debe ser cierto que existe un proceso de adaptación al estrés y esto se logra permitiendo que más células pasen al siguiente estado de selección. Antes de que los linfocitos lleguen a la médula se da el proceso de selección negativa y se definen a los únicos positivos siendo CD4⁺ más numerosa en relación a CD8⁺. De acuerdo a los resultados, en ambas poblaciones hubo disminución las células de los grupos en Diluyente y HC, lo cual probablemente fue posible por la baja en la producción de los factores tróficos del timo, como por ejemplo el factor de crecimiento de los queratinocitos y la IL-7[15].

La población CD4⁺ se mostró muy sensible al efecto de los fármacos. El grupo HC se vió disminuido seguramente por efecto de la hidrocortisona, sin embargo el grupo Diluyente también se vio disminuido significativamente, esto sugiere que el manejo es un factor importante de estrés o la posible presencia de ínfimas cantidades de pirógenos que tuvieron un efecto similar a la HC. Porque activaron el eje HHA. Paradójicamente la IMF se incrementó en el grupo que recibió diluyente y en los grupos que recibieron fármacos muy por encima del grupo Blanco. El incremento en la expresión de moléculas en la membrana vuelve a sugerir un efecto de adaptación. El comportamiento del grupo Diluyente y HC también se ve en la población CD8⁺ el comportamiento de la HC era esperado [52, 53], lo que no se esperaba era lo que se obtuvo después de inyectar los animales solamente con el diluyente (agua estéril). Aunque el agua estéril utilizada fue un producto adquirido comercialmente y sus proveedores garantizaban que estaba libre de pirógenos, esta aseveración no se confirmó en el laboratorio con una prueba del Limulus. El agua de Pisa® es un vehículo para administración intravenosa para humanos y si bien no representa problemas en éstos, probablemente para el ratón debido a su tamaño, la concentración de posibles pirógenos y su metabolismo resultó un factor de estrés [37]. Creemos en la posibilidad de que el agua estuviera contaminada con pequeñas cantidades de endotoxinas (LPS) y que su administración provocara un cierto grado de estrés endotóxico que pudo repercutir en el timo. Sin embargo, existe también la posibilidad de que debido al ambiente que proporciona Harlan® la manipulación pudo haberles provocado un moderado estrés que, sumado o no al anterior, pudieron haber estimulado el eje HHA incrementando la liberación de glucocorticoides a niveles que fueron más altos de los que tenían los ratones del grupo blanco que no fueron inyectados ni manipulados. Este efecto se vio atenuado por acción de la inmunomodulación positiva de la timalfasina en los grupos tratados con la misma.

El aumento de el índice tímico es un valor fisiológico e incluso social entre roedores que indica estrés como fenómeno de adaptación dentro de una población, los grupos de experimentación presentan valores mayores a 2

comparados con el grupo blanco(IT1.8)[50, 51]. En el IE el mayor índice fue precisamente en el blanco, esto nos indica que lo que sucede en el timo impacta en la periferia y al bazo no llega el mismo número de células maduras tabla VI.

La persistencia del efecto de la HC hasta 10 días después de la inyección ya ha sido estudiada periféricamente y lo mismo se puede decir del efecto a corto plazo de los glucocorticoides sobre las respuestas inmunes celular y humoral[35, 38]. Sin embargo, los resultados del presente trabajo revelan la necesidad de estudiar más a fondo el impacto a largo plazo de los glucocorticoides sobre funciones inmunológicas. Si el timo no elimina adecuadamente los linfocitos T auto-reactivos o no induce cabalmente la maduración de una población adecuada de linfocitos que van a pasar a la circulación, se presenta una situación que puede tener consecuencias adversas a largo plazo en la vida de los ratones.

7.2 Efecto de la timalfasina α -1 (Zadaxín®).

En este experimento se puso a prueba la actividad inmunomoduladora de la timalfasina desafiándola al aplicarla en un timo involucionado y en un timo clínicamente sano. En las poblaciones que se encuentran en la corteza, DN y DP principalmente, la DN se vio más afectada por HC, mientras la DP con respecto al blanco se ve ligeramente incrementada como se mencionó anteriormente. Posiblemente esto sucede porque las células maduran más rápido. La acción de la timalfasina es favorecer la producción de la IL-7 que actúa sobre los linfocitos inmaduros, mientras que la población CD4⁺ influenciada por la timalfasina después de la inyección con hidrocortisona incrementa la producción de IL-2 e IL-3[44]. Es probable que el aumento en la población de linfocitos T CD8⁺ no fue tan evidente porque esta población es la más pequeña de las únicas positivas[36], debido a esto la timalfasina tuvo un efecto compensatorio en el grupo HC-TMA principalmente en la población CD4⁺ en el grupo TMA no tuvo efecto porque simplemente no fue necesaria su acción[43, 46].

Hay que considerar que toma al menos 28 días para que el timo recupere su población normal [16, 34, 35] este experimento se llevó a cabo en el día 10, el

proceso de maduración de la población CD4⁺ esta apoyado por la IMF, el grupo HC tiene una IMF muy pequeña en sus marcadores CD4⁺ y CD8⁺ Figura 10D Por otra parte tanto HC-TMA como TMA expresan en menor medida el receptor CD4⁺ en su superficie, en cuanto a la IMF de los linfocitos CD8⁺ es mayor lo que corrobora que estos linfocitos están maduros todo ello apunta hacia un proceso de adaptación favorecido por la timalfasina.

El timo no es solamente es un órgano linfoide necesario para la maduración de los linfocitos T DN y DP, sino que también es un órgano clave para la eliminación de los linfocitos T inmaduros defectuosos y/o auto-reactivos. Si los linfocitos CD4⁺ fueron tan sensibles y su expresión de marcadores de membrana fue tan disminuida existe la duda de que otras subpoblaciones de linfocitos T se vieran afectadas negativamente Por esa razón nosotros también decidimos estudiar el efecto de la HC sobre los linfocitos Treg naturales.

7.3 Efecto de la HC sobre la población Tregs.

Como lo indican estudios[20, 21] los Tregs se incrementan en un proceso de estrés y esto se comprueba con el grupo Diluyente que se comportó como si hubiera recibido la inyección por un pirógeno ya que tuvo más Tregs que el Blanco. Apoyando esta aseveración la IMF indica que aumenta la expresión de CD25⁺ y principalmente Foxp3. La HC a la dosis utilizada no tiene efecto sobre los linfocitos T reguladores naturales [53] posiblemente porque la involución aguda del timo afecta principalmente a la corteza y ésta población se encuentra en la médula. El porcentaje de los Tregs resultó ser igual al del grupo Blanco <1%. Esta población tan pequeña no puede desaparecer simplemente porque se presentarían procesos de autoinmunidad o proinflamatorios que conducirían a la muerte

La timalfasina como inmunomodulador si tiene un efecto de proliferación en las Tregs, ya que el grupo HC-TMA supera al Blanco, esto también fue corroborado por la IMF que también aumentó sobre todo CD25+ que es el marcador que se activa primero, posteriormente lo hace Foxp3+ que en este caso fue significativamente más bajo debido tal vez a que el tiempo de recuperación lleva 26-28 días en los Tregs. En el grupo TMA no hay cambio, no fue necesaria la proliferación. Esta inactividad es propia de los Tregs en ausencia de estímulos proinflamatorios [25, 54]

8. Conclusiones.

1. La inyección de HC provoca una hipoplasia del timo, caracterizada por una disminución significativa de las poblaciones de linfocitos DN, CD4⁺ y CD8⁺.
2. La IMF indica que los grupos que recibieron inyecciones expresaron significativamente más moléculas en su membrana comparadas con el grupo Blanco.
3. Hacen falta más estudios para conocer porqué la HC disminuye los porcentajes de los linfocitos T CD4⁺ y aumenta significativamente las IMF de los linfocitos T CD8⁺.
4. En los animales control que solo recibieron inyecciones del diluyente, los resultados sugieren que el agua inyectable estéril pudiera no estar libre de LPS.
5. El tratamiento con Timalfasina mejora aunque no significativamente el porcentaje de linfocitos T CD4⁺ y aumenta la IMF de CD8⁺ en los ratones previamente tratados con HC.
6. Diez días después de inyectar la HC, los valores de los linfocitos Treg no han sufrido cambios comparados con los animales blanco.
7. El tratamiento con TMA solamente mejora los porcentajes aunque no significativamente, de igual manera aumenta el IMF de los linfocitos Treg que habían sido tratados previamente con HC.

Perspectivas

1. Este trabajo requiere de continuidad, ya que las terapias que utilizan inmunomoduladores y aún a los mismos linfocitos T reguladores parecen tener futuro en la eliminación de algunas enfermedades inflamatorias. Se han confirmado que la HC afecta la al timo disminuyendo su

celularidad, ahora es necesario ver si afecta el comportamiento de los linfocitos T midiendo su actividad mediada por citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias

2. Para lograr el punto anterior en el modelo experimental debe incluirse un desafío con un microorganismo, un hongo o una bacteria que tenga actividad patógena en una situación de inmunosupresión.
3. El comportamiento de los linfocitos T reguladores es variable dependiendo del microorganismo, por tanto del patógeno que se decida utilizar dependerá el modelo experimental
4. Aún cuando se cuantifique la celularidad de los linfocitos T reguladores es necesario también medir su capacidad de eliminar la actividad de los linfocitos T efectores.
5. una vez que se logre establecer una infección experimental se ensayará con el inmunomodulador Timalfasina α -1, para ver si en presencia de un microorganismo patógeno mantiene su actividad de modulación a la alta y si esta actividad repercute de alguna manera en el comportamiento de los linfocitos T reguladores.

9 Referencias Bibliográficas.

1. Tian Yan-Mei, Zhang Gui-You, and D. Yao-Ren, *Melatonin rejuvenates degenerated thymus and redresses peripheral immune functions in aged mice*. Immunology Letters, 2003. **88**: p. 101-104.
2. Verinaud Liana , d.S.S.P.C., Niéto Brito Vânia. , *Thymic atrophy in infectious diseases*. Brazilian Journal of Morphological Sciences, 2004. **21**(2): p. 111-116.
3. Williams Michael E, K.C.A., *Transfer Factor: a Murine Model*. Infection and Immunity, 1980. **27**(1): p. 187-191.
4. Hayday Adrian C, P.D.J., *Key factors in the organized chaos of early T cell development*. Nature Immunology, 2007. **8**(2): p. 137-144.
5. Manley, N.R., *Thymus organogenesis and molecular mechanisms of thymic epithelial cell differentiation*. seminars in Immunology, 2000. **12**: p. 421-428.
6. Manley, N.R. and C. Blackburn, *A developmental look at thymus organogenesis: where do the non-hematopoietic cells in the thymus come from?* Current Opinion in Immunology, 2003. **15**: p. 225-232.
7. Blackburn Clare, M.N.R., *Developing a new paradigm for thymus organogenesis*. Nature Reviews immunology, 2004. **4**: p. 278-289.
8. Depreter Marianne GL, B.N.F., Gaskell Terri L, Nowell Craig S, Davern Kathleen, Blackburn C Clare, *et al.*, *Identification of Plet-1 as a specific marker of early thymic epithelial progenitor cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. **105**: p. 961-966.
9. Gordon Julie , B.A.R.C., Blackburn Clare, Manley Nancy R., *Gcm2 and Foxn1 mark early parathyroid- and thymus-specific domains in the developing third pharyngeal pouch*. Mechanisms of Development, 2001. **103**: p. 141-143.
10. Fredrickson, G.G., Basch Ross S., *Early thymic regeneration after irradiation*. Developmental and Comparative Immunology, 1994. **18**(3): p. 251-263.
11. Surh Charles D, J.S., *Regulation of mature T cell homeostasis* Seminars in immunology 2005. **171**: p. 183-191.
12. Xiao He, X.H., Vibhuti P. Dave, Yi Zhang, Xiang Hua, Emmanuelle Nicolas, Weihong Xu, Bruce A. Roe, Dietmar J. Kappes., *The zinc finger transcription factor Th-POK regulates CD4 versus CD8 T-cell lineage commitment*. Nature, 2005. **433**: p. 826-833.
13. Magalhaesa Danielle A.R, M.C., Juntaa Cristina M, Mellob Stephano S, and C.R.S. Marquesa Marcia M.C, *et al.* , *Hybridization signatures during thymus ontogeny reveals modulation of genes coding for T-cell signaling proteins*. Molecular Immunology, 2004. **42**: p. 1043-1048.
14. Berzins S P, U.A.P., Sutherland J, Gill J, Miller J, Godfrey D, Boyd R.L., *Thymic regeneration: teaching an old immune system new tricks*. Trends in Molecular Medicine, 2002. **8**(10): p. 469-476.
15. Goronzy Jörg J, W.C.M., *T cell development and receptor diversity during aging*. Current opinion in Immunology 2005. **17**: p. 468-475.
16. Hadden., J.W., *Thymic endocrinology* Annals of the New York Academy of Ciencias, 1998. **840**: p. 352-358.
17. watanabe Norihiko, W.Y.-H., Lee Heung Kyu, Ito Tomoki, Wang Yui-Hsi, Cao Wei, Liu Yong-Jun., *Hassal's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+ CD25+ regulatory T cells in human thymus* Nature Letters 2005. **436**: p. 1181-1185.

Referencias Bibliográficas

18. Paust Silke, L.L., McCarty Nami, Cantor Harvey., *Engagment of B7 on effector T cells by regulatory T cells prevents autoimmune disease* Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS), 2004. **101**(28): p. 10398-10403.
19. Chang Xing , G.J.X., Jiang Qi , Wen Jing, Seifers Nick, Su Lishan, Godfrey Virginia L, Zuo Tao, Zheng Pan, Liu Yang. , *The scurfy mutation of FoxP3 in the thymus stroma leads to defective thymopoiesis.* Journal of experimental Medicine, 2005. **202**: p. 1141-1151.
20. Baecher-Allan Clare, V.V., Hafler David A. , *Human CD4+CD25+ regulatory T cells.* Seminars in immunology, 2004. **16**: p. 89-97.
21. Nishioka Tomohisa, S.J., Iida Ryuji, Yamazaki Sayuri, Sakaguchi Shimon., *CD4+CD25+Foxp3+ T cells and CD4+CD25-Foxp3+ T cells in aged mice* Journal of immunology 2006. **176**: p. 6586-6593.
22. Miyara Makoto, S.S., *Natural regulatory T cells: mechanisms of supression* Trends in Molecular Medicine 2007. **13**(3): p. 108-116.
23. Gregg R C.M, S.F.J., Dunnion Clark D, Khan N, Chakraverty R , Nayak L, Moss P. A. , *The number of human peripheral blood CD4+CD25 high regulatory T cells increases with age* Clinical and Experimental Immunology 2005. **140**: p. 540-546.
24. Kim Jeong M, R.J.P., Rudensky Alexander Y., *Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice.* Nature Immunology, 2007. **8**(2): p. 191-197.
25. Abbas Abdul K, L.A.H., Pober Jordan S., *Cellular and Mollecular Immunology.* 5^a ed. 2003, Philadelphia: Elsevier Science, Saunders. 152-160.
26. Xin Chen, J.J.O., O. M. Zack Howard, *BALB/c mice have more CD4+CD24+ T regulatory cells and shows grater susceptibility to suppression of their CD4+CD25- responder T cells than C57BL/6 mice* Journal of Leucocyte Biology 2005. **78**: p. 114-121.
27. Yue Wang, T.Y., Jian Shen, Haiying Guod, Xiaoren Xiang, *Preventive effect of Ophiopogon japonicus polysaccharides on an autoallergic mouse model for Sjogren's syndrome by regulating the Th1/Th2 cytokine imbalance.* Journal of Ethnopharmacology, 2007. **114** p. 246–253.
28. Chatenoud Lucienne , S.B.t., Bluestone Jeffrey A. , *Suppressor T cells – they're back and critical for regulation of autoimmunity!* Immunological Reviews, 2001. **182**: p. 149–163.
29. Zelante Teresa, F.F., Bistoni Francesco, Puccetti Paolo, Luigina Romani., *Indoleamine 2,3-dioxygenase in infection: the paradox of an evasive strategy that benefits the host.* Microbes and Infection, 2009. **11**: p. 133-141.
30. Puccetti Paolo, G.U., *IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF- B activation.* Nature Reviews, Immunology, 2007. **7**: p. 817-823.
31. Horwitz David A., Z.S.G., Gray J. Dixon. , *The role of the combination of IL-2 and TGF-beta or IL-10 in the generation and function of CD4 CD25 and CD8 regulatory T cell subsets.* Journal of Leukocyte Biology, 2003. **74**: p. 471-478.
32. Kozłowska Ewa , B.M., Ciechomska Marzena, Drela Nadzieja. , *Age-related changes in the occurrence and characteristics of thymic CD4+ CD25+ T cells in mice.* Immunology, 2007. **122**: p. 445–453.
33. Liang Zhao, L.S., Hongjun Wang, Haixia Ma, Guangwei Liu, Yong Zhao, *Changes of CD4 CD25 Foxp3 regulatory T cells in aged Balb/c mice.* Journal of Leukocyte Biology, 2007. **81**: p. 1386-1394.

34. Mocchegiani E, G.R., Cipriano C, Gasparini N, Orlando F, Stecconi R, Muzzioli M, Isani G, Carpené E., *Metallothioneins (I+II) and thyroid-thymus axis efficiency in old mice: role of corticosterone and zinc supply*. Mechanisms of ageing and development 2002. **123**: p. 675-694.
35. Genhong Yao, Y.H., *Thymic atrophy via estrogen-induced apoptosis is related to Fas/FasL pathway* International Immunopharmacology, 2003. **4**: p. 213-221.
36. Paul, W.E., *Fundamental immunology*. 5ª ed. 2003, Philadelphia, USA: Lippincott Williams and Wilkins. 935-960.
37. Rey-Mendez, L.D.-G.a.M., *Role of Pre-T Cells and Chemoattractants on Stress-Associated Thymus Involution*. Scandinavian Journal of Immunology, 2000. **52**: p. 470-476.
38. Hadden, J.W., Saha A, Sosa M, Hadden E.M. , *Immunotherapy with natural interleukins and/or thymosin 1 potently augments T lymphocyte responses of hydrocortisone-treated aged mice*. Journal of Immunopharmacology, 1995. **17**: p. 821-828.
39. Ganong, W.F., *Fisiología Médica*. 14a ed. 1994, México: El manual moderno.
40. Kirkpatrick, C.H., *Transfer Factors: Identification of Conserved Sequences in Transfer Factor Molecules*. Molecular Medicine, 2000. **4**(6): p. 332-341.
41. García-Contreras Fernando, N.-S.A., Constantino-Casas Patricia, Abud-Bastida Fernando, Garduño-Espinosa Juan., *Cost-effectiveness of Chronic Hepatitis C Treatment with Thymosin Alpha-1*. Archives of Medical Research, 2006. **37**: p. 663-673.
42. Paul H. Naylor, J.W.H., *T cell targeted immune enhancement yields effective T cell adjuvants* International Immunopharmacology 2003. **3**: p. 1205-1215.
43. Rossina F, C.P., Smedile A, Mangia A, Borghesio E, Martinotti R, Andriulli A, Rizzetto M., *Treatment of chronic hepatitis B with thymus-derived polypeptide thymic humoral factor gamma -2: a pilot study*. Digestive and Liver Disease, 2002. **34**(4): p. 285-289.
44. Baumann Christian A, B.M., Goldstein Allan L. , *Thymosin α 1 antagonizes dexamethasone and CD3-induced apoptosis of CD4+CD8+ thymocytes through the activation of cAMP and protein kinase C dependent second messenger pathways*. Mechanisms of Ageing and Development, 1997. **94**: p. 85-101.
45. Ji S-M, L.L.-S., Sun Q-Q, Chen J-S, Sha G-Z, Liu Z-H. , *Immunoregulation of Thymosin α 1 Treatment of Cytomegalovirus Infection Accompanied With Acute Respiratory Distress Syndrome After Renal Transplantation*. Transplantation Proceedings, 2007. **39**: p. 115-119.
46. Hadden J.W, E.V., E. Hadden, *IRX-2 and Thymosin alpha 1 (Zadaxin) Increase T Lymphocytes in T Lymphocytopenic Mice and Humans*. Annals of the New York Academy of Ciencias 2007. **1112**: p. 245-255.
47. Ophir R, M.G., Pecht M, Shashoua M, Rashid G, Ben-Efraim S, Trainin N, Burstein Y, Keisari Y., *THF-gamma 2 mediated reduction of pulmonary metastases and augmentation of immunocompetence in C57BL/6 mice bearing melanoma*. Journal of immunotherapy, 1999. **22**(2): p. 103-113.
48. Aspinall R, A.D., *Thymic atrophy in the mouse is a soluble problem of the thymic environment*. Vaccine, 2000. **18**: p. 1629-1637.
49. Bodey B, B.J.B., Siegel S E, Kaiser H E. , *Review of thymic hormones in cancer diagnosis and treatment*. Journal of Immunopharmacology, 2000. **22**: p. 261-263.

Referencias Bibliográficas

50. Durant Pedro, D.a., De Pascual Díaz Amelia., *Informaciones ecológicas de una población de ratas casiraguas (proechymis sp.) en áreas adyacentes a la presa "Las Cuevas". Complejo hidroeléctrico de los Andes "Leonardo Ruíz Pineda" estado Táchira Venezuela*. Revista Ecológica Latino Americana, 1995. **3**(1-3): p. 39-50.
51. Yuji Takeda, H.A., Masamichi Ueno, Fumie Jimma, Mayumi Hidaka, Hiromu Shibusawa, Kenta Kaneda, Abbi R. Saniabadi, Katsuya Hiaraiishi and Nobuhito Kashiwagi, *Assessment of Rabbit Spleen Size Using Ultrasonography*. Journal of Veterinary Medical Science, 2007. **69**(8): p. 841–842.
52. Silversone Allen E, F.J.D.E., Fiore Nancy C, Soultz Johann A. , *Dexamethasone, Beta-estradiol and 2,3,7,8,-tetrachlorodibenzo-p-dioxin Elicit Thymic Atrophy through Different Cellular Targets* Toxicology and applied pharmacology, 1994. **126**: p. 248-259.
53. Moraes-Fontes Maria Francisca, R.M., Caramalho Iris, Zelenay Santiago, and C.A. Bergman Marie-Louise, Demengeot Jocelyne., *Steroid treatments in mice do not alter the number and function of regulatory T cells, but amplify cyclophosphamide-induced autoimmune disease*. Journal of Autoimmunity, 2009. **article in press**.
54. Jeong M Kim, J.P.R., Alexander Y Rudensky., *Regulatory T cells prevent catastrophic autoimmunity throughout the lifespan of mice*. Nature Immunology, 2007. **8** (2): p. 191-197.