



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
 FACULTAD DE MEDICINA
 DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
 HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

"FUNCIÓN LINFOCITARIA EN PACIENTES CON RESECCIÓN QUIRÚRGICA DEL TIMO VS PACIENTES SANOS. LA IMPLICACIÓN QUE TIENE EL RETIRAR EL TIMO EN PACIENTES CON CORRECCIÓN DE CARDIOPATÍA."

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN:
 ALERGIA E INMUNOLOGÍA CLÍNICA PEDIÁTRICA

PRESENTA:

DRA. DANIELA EDITH GARCÍA FAJARDO

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. Blanca Estela del Rio Navarro
 Dra. Elsy Maureen Navarrete Rodríguez



Ciudad de México, Febrero del 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



HOJA DE FIRMAS

DRA. REBECA GÓMEZ CHICO VELASCO
Directora de Enseñanza y Desarrollo Académico
Hospital Infantil de México Federico Gómez

DIRECTOR DE TESIS:

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Blanca Estela del Río Navarro'.

DRA. BLANCA ESTELA DEL RÍO NAVARRO
Departamento de Alergia e Inmunología Clínica
Hospital Infantil de México Federico Gómez
blancadelrionavarro@gmail.com

TUTOR:


A handwritten signature in black ink, appearing to be 'Elsy Maureen Navarrete Rodríguez'.

DRA. ELSY MAUREEN NAVARRETE RODRÍGUEZ
Departamento de Alergia e Inmunología Clínica
Hospital Infantil de México Federico Gómez
elsiee21@hotmail.com



Ciudad de México, Febrero del 2017

ASESORES DE INVESTIGACIÓN



DR. OMAR SAUCEDO RAMIREZ
Servicio de Alergia e Inmunología Clínica
Hospital Infantil de México Federico Gómez



DR. JUAN JOSE LUIS SIENRA MONGE
Sub Director de Pediatría Ambulatoria
Hospital Infantil de México Federico Gómez

DEDICATORIA.

A mi esposo **Marcelo**, por apoyarme incondicionalmente desde el inicio, sacrificando su confort y postergando inclusive metas personales, por, como él dijo: apostarle a la familia. Por llevar una paternidad responsable, porque en su respeto y admiración encontré siempre una motivación para seguir adelante y por corresponder mi amor. Agradezco a Dios el habernos hecho coincidir en la vida, en metas y valores.

A mi hija **Ana Paula**, podría dedicarte tres hojas. Cuando llegue el momento te mostraré estas líneas y te contaré muchas cosas de lo que viviste acá. No tengo palabras para agradecerte el acompañarme en este viaje, adaptándote a los cambios, creciendo conmigo y ofreciéndome siempre una sonrisa y un abrazo, regalándome un poco de ese ángel que tienes en esos momentos en los que me llegué a sentir abrumada, recordándome que este proyecto lo iniciamos juntas, y así lo íbamos a terminar.

A mi mamá **Paty** y mi suegra **Rosario** porque gracias a su infinito amor por sus hijos y su nieta pude contar con su presencia en todo momento, por acompañarme en mi crecimiento como madre. Sin su apoyo, esto no JAMÁS hubiera sido posible.

A mi papás **Paty y Victor Hugo** por motivarme y apoyarme a lo largo de todos estos años, hasta, ahora sí, el final de mis estudios. Parece que fue ayer cuando me llevaban de Rioverde a San Luis con todas mis cosas listas, incluida una gran emoción por iniciar mis estudios en medicina. Por todo el esfuerzo y sacrificio que esto implicó. A **mis hermanos Hugo, Omar** y mi cuñada **Karla** por cuidar a mi hija cuando yo no pude por cuestiones laborales.

A mi suegro **Miguel** por sugerirme y motivarme a hacer la sub-especialidad en alergia.

A mis hermanos alergólogos **Fireth, Bere, Christian, Victor, Herbert, Robertito, Ureña, Lety, Cesar y Luis** por ofrecerme además de un excelente compañerismo, una gran amistad.

Hicieron que todo este tiempo valiera completamente la pena. ¡Les deseo mucho éxito!

A mis Residentes de mayor y menor jerarquía por creer en mí, ponerme a estudiar y hacer de estos tres años, una de las mejores decisiones de mi vida.

A **Elsy**, mi maestra y tutora de tesis. Por toda su ayuda y orientación en la realización de esta tesis. Por ponernos atención y dedicarnos gran parte de su tiempo. Espero que sigan las bendiciones en tu vida, las mereces.

A mis maestros **Blanca, Lourdes, Jaime, Omar, José Luis**, por sus enseñanzas que me hacen estar satisfecha con la formación recibida y orgullosa de ser egresada de esta institución. Por nunca hacer distinción, ni para bien ni para mal, por el hecho de ser mamá.

Al **personal del CENDI** del HIMFG por darnos a los residentes el beneficio del éste, en donde mi hija recibió cuidado, cariño y estimulación. Son una parte fundamental en el cumplimiento de estas metas personales.

Por último, y no menos importante, a todos **mis pacientes y sus padres**, mis niños de acero, por permitirme aprender de ellos. Además de hacerme una mejor doctora, me hacen ser una mejor persona, teniendo más empatía que nunca con ellos, ahora que soy madre.

ÍNDICE

Contenido

ÍNDICE	5
RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	2
MARCO TEÓRICO.....	2
ANTECEDENTES.....	20
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	24
JUSTIFICACIÓN.....	24
OBJETIVOS.....	24
HIPÓTESIS.....	25
MÉTODOS.....	25
CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	30
PLAN DE ANÁLISIS DE LOS DATOS.....	31
DESCRIPCIÓN DE VARIABLES.....	33
RESULTADOS.....	37
DISCUSIÓN.....	39
CONCLUSIÓN.....	42
LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	42
CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	43
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	44
ANEXOS.....	51

RESUMEN.

El timo inicia su involución en la infancia e históricamente se pensaba que no era funcional en la vida adulta, no teniendo contraindicación, por lo tanto, para la timectomía de rutina durante la cirugía cardiotorácica.

Datos más recientes que se han podido obtener con las nuevas técnicas de estudio de la función linfocitaria, sugieren que el timo permanece activo en la vida adulta y es el responsable de la producción de células T normales.

Para investigar los efectos a largo plazo de la timectomía durante el desarrollo inmunológico en pacientes pediátricos, examinamos la función del timo y las poblaciones de células T periféricas, así como inmunoglobulinas, en niños entre 6 meses y 17 años, después de la cirugía correctiva o paliativa de lesiones cardíacas congénitas. Se evaluaron las consecuencias a largo plazo de la timectomía incidental en la infancia. En este trabajo se plantea la hipótesis de que la timectomía incidental durante una cirugía cardiotorácica afecta la función linfocitaria en la vida posterior.

INTRODUCCIÓN.

El timo es una glándula que se localiza en el tórax, caudal al tiroides, dorsal al esternón y ventral al corazón y los grandes vasos, que desempeña un importante papel en el desarrollo de la inmunidad mediada por células.

La eliminación de este órgano meses antes del nacimiento puede evitar el desarrollo de toda inmunidad celular, lo cual provoca un serio deterioro de las defensas inmunológicas que como es bien conocido dependen de los linfocitos T derivados del timo.

Las personas que tienen una falta genética de linfocitos o cuyos linfocitos han sido destruidos por radiaciones o sustancias químicas, no pueden desarrollar inmunidad adquirida y después del nacimiento son susceptibles a infecciones graves. Los linfocitos son esenciales para la supervivencia del ser humano.

El timo inicia su involución fisiológica en la infancia e históricamente se pensaba que no era funcional en la vida adulta, no teniendo contraindicación, por lo tanto, para la timectomía de rutina durante la cirugía cardiotorácica. Sin embargo, datos más recientes sugieren, que el timo permanece activo en la vida adulta y es el responsable de la producción de células T normales.

MARCO TEÓRICO.

1. EL TIMO

1.1 HISTORIA

Según la etimología, el término timo deriva de la palabra griega «thymos», que significa alma o espíritu.¹

Galeno (siglo II d. de Cristo) atribuyó su función a la purificación del sistema nervioso. Versalio (siglo XV) teorizó que el timo actuaba como amortiguador para proteger los importantes vasos del mediastino que se encontraban detrás del esternón. En el siglo XVIII se entendía que el timo regulaba de alguna manera la función pulmonar fetal y neonatal y este era conocido como el órgano vicario de la respiración.²

En 1777, Guillermo Hewson fue el primero en identificar correctamente al timo como una glándula que modifica la linfa. En 1832, Sir Astley Cooper describió la anatomía de este órgano a través de disecciones detalladas de cadáveres.

Hassall y Vanarsdale, en 1846, emplearon el microscopio compuesto para estudiar la histología del timo y describieron las diferencias de este con otros órganos linfoides, específicamente la existencia en él de los corpúsculos de Hassall.²

Sin embargo, fue el inmunólogo australiano Miller, en 1961, quien al demostrar el efecto devastador de la timectomía en el sistema inmunitario, aportó una noción clara de cuál era su verdadera función. ³

1.2 EMBRIOLOGÍA

El timo se origina de la superficie ventrolateral y de la porción ventral de la tercera y cuarta bolsas faríngeas, respectivamente; elementos derivados de las tres capas germinales.

Su desarrollo comienza en la sexta semana de gestación. En esta etapa, la bolsa faríngea se divide en dos porciones: una dorsal, que da origen a las glándulas paratiroides inferiores; y una ventral de donde se deriva el primordio tímico.⁴

En la séptima semana, cada primordio tímico migra de manera caudal y medial, desde el ángulo de la mandíbula hasta el mediastino anterosuperior, formando una estructura tubular llamada tracto o ductus timofaríngeo. Este tracto comienza en el seno piriforme, perfora la membrana tirohioidea y emerge entre la arteria carótida común y el nervio vago. Cursa posterior al nervio glossofaríngeo y lateral a la glándula tiroides y entra al mediastino.⁵

Hacia la octava semana, los primordios tímicos se fusionan en la línea y descienden, adoptando su posición característica en el mediastino anterosuperior; la porción cefálica, usualmente involuciona (ver figura 1).

Alrededor de la novena semana está constituido solo por células epiteliales y no es hasta la décima semana que es invadido por pequeñas células linfoides que migran desde el timo fetal y la médula ósea (MO), formando el tejido linfoide tímico. La diferenciación celular se completa entre las catorce y dieciséis semanas de gestación.

El timo crece rápidamente y alcanza un gran peso antes del nacimiento, en relación con el peso corporal. Está ubicado en la parte superior del mediastino anterior y se apoya sobre el pericardio, al nivel del nacimiento de los grandes vasos. ^{2, 4, 5.}

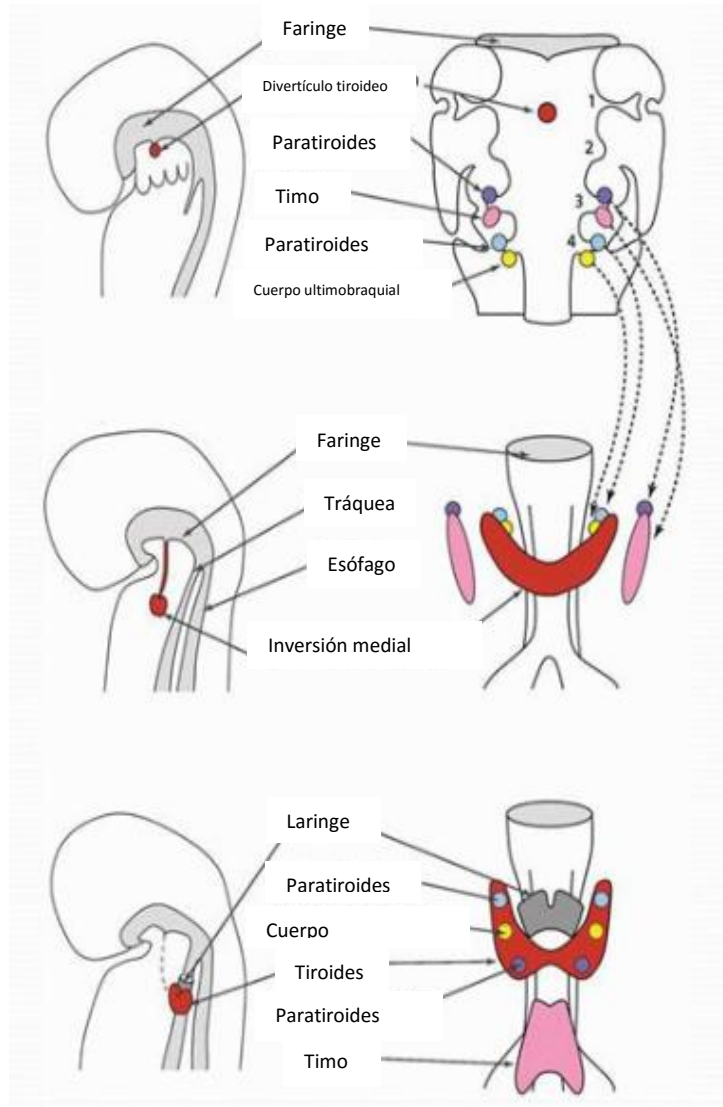


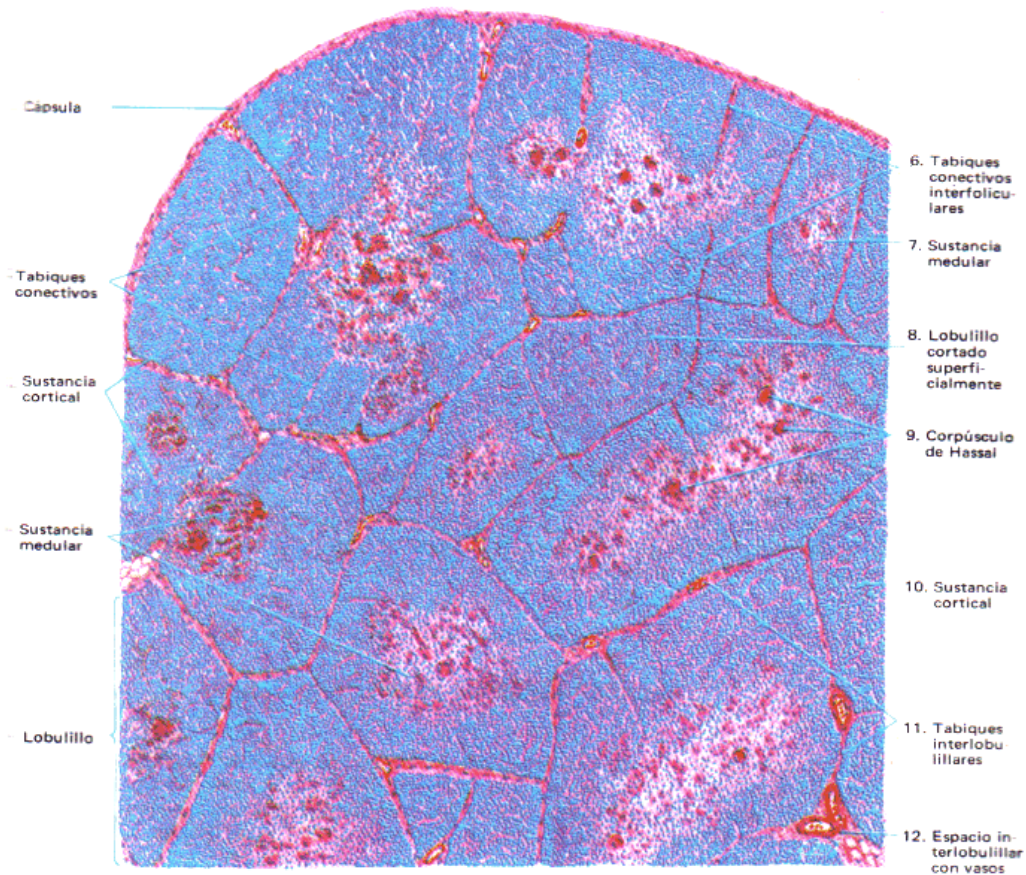
Figura 1: Origen embriológico del timo.
 Modificado de: Keith L. Moore. Embriología clínica. 9ª edición. España: Elsevier Saunders; 2013.

1.3 HISTOLOGÍA

El timo es un órgano grueso y bilobulado, rodeado de una cápsula de tejido conectivo laxo. Cada lóbulo está dividido en lobulillos, por tabiques fibrosos y organizados en dos compartimentos: corteza y médula.

La corteza está compuesta principalmente de linfocitos pequeños íntimamente empaquetados (timocitos) y esparcidas entre estos, escasas células más voluminosas: epiteliales (corticales) y mesenquimales.⁶

La médula está constituida por un gran número de células epiteliales (medulares) y pocos linfocitos pequeños. Las células epiteliales componen el esqueleto o armazón del timo, son llamadas células cuidadoras (del inglés «nurse cells») y son funcionalmente esenciales para la maduración de los timocitos. La médula tímica posee, además, nidos de células epiteliales maduras queratinizantes denominados corpúsculos de Hassall (ver imagen 1).



A. Vista panorámica

(Coloración: hematoxilina-eosina. 40 X.)

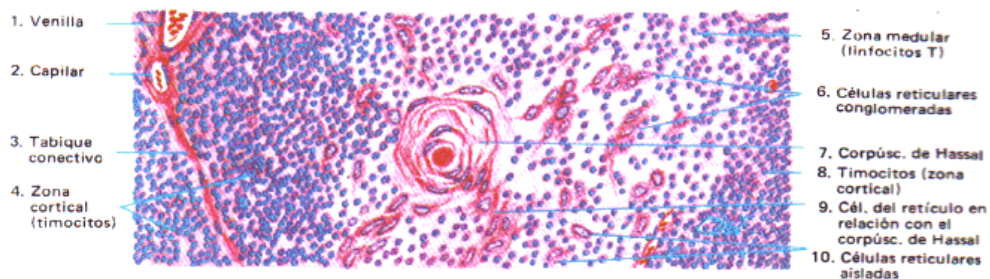


Imagen 1. Histología del timo.

Modificado de: Ramon S. Piezzi. Nuevo Atlas de Histología Normal de di Fiore. 7ª. Edición. España: Editorial El Ateneo; 2006.

También contiene células dendríticas, macrófagos y células miodes, que aparentemente degeneran y desaparecen durante el desarrollo fetal, pero constituyen una posible fuente de antígenos musculares y son de gran interés por su participación en la patogenia de la miastenia gravis.

El timo presenta un gran número de vasos sanguíneos flexibles y de linfáticos eferentes, que drenan a los nódulos linfoides mediastinales y carece de folículos linfoides que aparecen cuando existe una hiperactividad tímica.^{7,8}

Se han descrito dos modelos de desarrollo de las células epiteliales tímicas. El primero se refiere a que células progenitoras endodérmicas dan origen a una célula progenitora tímica o «stem cell» y que ésta, a su vez, origina dos células progenitoras epiteliales: cortical y medular, respectivamente, que dan lugar a estos dos tipos celulares epiteliales. El segundo modelo propone que la célula progenitora endodérmica origina directamente a los progenitores epiteliales cortical y medular.

En este proceso de organogénesis del timo participan diferentes genes que codifican para factores transcripcionales, entre ellos: Hoxa3, Pax1, Pax9, Eya1 y Foxn1. Estos productos génicos son indispensables para desencadenar una cascada de eventos que incluyen: iniciación, posición, crecimiento, separación y diferenciación del tejido tímico.^{7,8}

2. MADURACIÓN TÍMICA

La maduración tímica consiste en tres procesos relacionados:

1.- Migración y proliferación: Las células pre-T que nacen en la médula ósea migran a través del timo, donde algunas son estimuladas, con lo que pasan a la médula tímica, desde donde son liberadas a la circulación como células T maduras (con los consiguientes marcadores de superficie, incluyendo TCR, CD4 o CD8) y otras células pre-T mueren.

2.- Diferenciación: El fenotipo maduro de las células T se desarrolla en el timo, es decir, las células pre-T en el timo adquieren las moléculas de superficie de las células T maduras con funciones de reconocimiento de antígenos y activación de las células T, esta maduración funcional consiste en la capacidad de ejercer acciones cooperadoras o citolíticas que dependen fundamentalmente de la adquisición de esas moléculas.

3.- Selección: El repertorio maduro de células T antígeno- específicas, restringidas por el complejo de histocompatibilidad mayor (MHC) propio, se selecciona en el timo.

Todos los individuos contienen los mismos genes que codifican para el receptor de células T (TCR) en el genoma. Estos genes del receptor de células T deben poder codificar para el reconocimiento de cualquier antígeno (propio y no propio) asociado a cualquier molécula

del complejo de histocompatibilidad mayor (también propias o no propias) cuando los diferentes receptores de células T con diferentes especificidades se han expresado en la superficie de los diferentes clones de células T en desarrollo, ese repertorio es modificado, mediante 2 fenómenos de selección:

- La selección positiva, por la que el repertorio es restringido por el complejo de histocompatibilidad mayor propio (proceso de educación tímica). Este tipo de selección se consigue mediante la expansión clonal de células T con receptores para lo no propio, siendo estas células las que son liberadas al torrente sanguíneo como linfocitos T maduros CD-8.
- La selección negativa, que elimina o inactiva clones potencialmente autorreactivos, asegurando con ello que el repertorio final de células T maduras sea autotolerante.

Este tipo de selección explica el número tan grande de linfocitos inmaduros (> 90 %) que mueren en la corteza del timo.

Estos procesos de selección que suceden en todas las células T que están desarrollándose en el timo, se deben a un crecimiento selectivo de algunos clones y a la muerte de otros. ⁹

En resumen, la maduración de los timocitos tiene lugar mediante una secuencia de acontecimientos que son los siguientes:

- 1) Migración de los precursores de células T a la corteza del timo.
- 2) Adquisición de marcadores de superficie específicos y especificidad tipo CMH.
- 3) Reajustes genéticos para crear diversidad de cadenas de receptores.
- 4) Síntesis de receptores de células T e inserción en la membrana.
- 5) Selección negativa mediante la eliminación de células que reaccionan frente a lo propio.
- 6) Selección positiva mediante expansión clonal de células capaces de reaccionar frente a lo no propio.
- 7) Liberación de linfocitos T inmunocompetentes.

Esta sucesión de acontecimientos en la diferenciación de linfocitos T, depende del microambiente tímico creado por los tipos de células no linfoides residentes en el mismo. Se sabe desde hace mucho tiempo que las células epiteliales del estroma segregan citocinas involucradas en la diferenciación de linfocitos y los macrófagos segregan varias citocinas que pueden afectar la maduración de células T y la proliferación clonal. ¹⁰

Los timocitos que están destinados a formar linfocitos T y son pre procesados en el timo, presumiblemente viven en él por mecanismos quimiostáticos. El 90% de los linfocitos se localizan en la corteza en la cual hay una activa mitosis. A partir del cuarto mes y hasta el final del desarrollo intrauterino la cantidad de linfocitos T no cambia prácticamente.

En la semana 16, los timocitos de la médula degeneran o migran y las células del retículo epitelial forman estructuras epiteliales esféricas, pequeñas, los llamados corpúsculos epiteliales estratificados (o corpúsculos tímicos o de Hassall), con células dispuestas concéntricamente, cuyo centro está queratinizado. Se supone que los corpúsculos tímicos se originan de células ectodérmicas de la tercera hendidura faríngea mientras es organizado el retículo epitelial del timo de origen endodérmico.

Con la diferenciación de estos corpúsculos, el timo adquiere la estructura definitiva o adulta. El número de corpúsculos tímicos humanos aumenta desde la etapa fetal hasta la pubertad, etapa en la cual alcanzan su máximo desarrollo. Estos, después de la pubertad, disminuyen, empezando por los más pequeños. Los más grandes aumentan de tamaño, mientras el timo involuciona, pero no desaparece. Las células de los corpúsculos se hinchan, se calcifican, se necrosan, pero después de la lisis, algunas se transforman en quistes, otros tienen células queratinizadas como las de la epidermis o tienen en el centro una sola célula enorme, que se hincha, se calcifica y degenera.

Los linfocitos T de la sustancia cortical migran al flujo sanguíneo, sin entrar en la sustancia medular (estos linfocitos se diferencian por la composición de los marcadores y receptores de los linfocitos T de la médula) y penetran en los órganos periféricos de la linfocitopoyesis (ganglios linfáticos o linfonodos principalmente axilares e inguinales, bazo, tonsilas palatinas, faríngeas y lingual, folículos linfáticos agregados o placas de Peyer, tejido linfoide de aparato vermiforme) donde se diferencian en subclases: Killers antígenoreactivos (inactivadores), Helpers (activadores, cooperadores) y supresores, actuando para que el individuo tenga una respuesta inmunológica celular. Todas las estructuras linfoides son histológicamente maduras al año de vida.

Los linfocitos T del timo, son maduros, pero inocentes o vírgenes (naïve) y en el bazo se encuentran con antígenos que los estabilizan, sin activarlos inmunológicamente, con lo que se vuelven maduros y complejos. Los que no se ponen en contacto con los antígenos, mueren en el bazo.

No todos los linfocitos que se forman en el timo salen a la circulación, sino solo aquellos que pasaron el “adiestramiento” y adquirieron los citorreceptores específicos para los antígenos ajenos. Es decir, que cada uno de los linfocitos tímicos desarrollan una reactividad específica contra un antígeno determinado. Esto continúa hasta que hay diferentes linfocitos tímicos con reactividades específicas frente a millones de antígenos diferentes, fenómeno conocido como “repertorio de células T”. Las nuevas generaciones de

linfocitos aparecen en el timo cada 6 a 9 horas. El número absoluto de linfocitos en sangre periférica llega a su máximo durante el 1er año de vida.¹¹

El timo también asegura que los linfocitos T que libera no reaccionen contra proteínas u otros antígenos presentes en los tejidos propios del cuerpo, sino solo frente a antígenos de origen externo, como bacterias, toxinas y tejido trasplantado de otras personas. El linfocito T se une a la célula infectada y la “bombardea” con, por lo menos, dos tipos de proteínas que, juntas, llevan a la muerte de la célula por necrosis o apoptosis. Los linfocitos que tienen citorreceptores para sus propios antígenos, es decir, son autorreactivos, como regla mueren en el timo, por apoptosis, solo sobreviven los que se unen a componentes extraños, lo que sirve de manifestación de la selección de las células inmunocompetentes. Al penetrar por cualquier causa estos linfocitos T en el flujo sanguíneo se desarrolla la reacción autoinmune.¹²

La mayor parte del pre procesamiento de los linfocitos T en el timo se produce poco después del nacimiento y durante unos meses después. Más allá de este periodo la disminución de la glándula tímica reduce el sistema inmunitario de las células T, las cuales son células efectoras capaces de realizar varias funciones en las respuestas inmunes mediadas por células y son células auxiliares en las reacciones inmunitarias humorales, cooperando con los linfocitos B.⁹

3. CÍRCULOS DE ESCISIÓN DE SEÑALES DE UNIÓN DEL RECEPTOR DE CÉLULAS T (TREC_s)

Las células que recién emigran del timo, pueden ser identificadas por la presencia de pequeños fragmentos de ADN que permanecen durante el reordenamiento del TCR, los cuales se denominan círculos de escisión de señales de unión del TCR o TREC_s por sus siglas en inglés (ver figura 2).

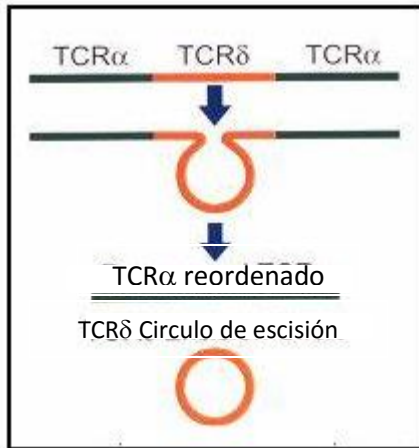


Figura 2. Origen de los TRECs
Modificado de: pid-research.blogspot.com

Las células T maduras se caracterizan por que su receptor de superficie, TCR, por sus siglas en inglés, es capaz de reconocer péptidos específicos presentados por las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés) de clase I y II de las células presentadoras de antígenos. En orden de responder a cualquier antígeno que pueda encontrar, la población de células T debe ser altamente diversa, en términos de su TCR. Dicha diversidad, la cual no es codificada en línea germinal, es generada durante la

diferenciación de las células T en el timo. El linfocito T durante su maduración en el timo sufre una serie de re-arreglos genéticos a nivel del TCR que permite su amplia diversidad. Durante los eventos de re-arreglo, el ADN que se escinde se “circulariza”, lo que resulta en la formación de un producto de escisión circular extra-cromosomal (TRECs, por sus siglas en inglés), ver figura 1. Los TRECs no se duplican durante la mitosis y son estables durante un largo período, ya que han sido detectados en pacientes timectomizados de hasta 41 años de edad.¹³

La función tímica, por tanto, ha sido evaluada mediante la medición de los niveles de TREC en las células T CD4+CD45RA+ o emigrantes tímicos tempranos (RTE, por sus siglas en inglés), es decir, las células T que recién abandonan el timo y aún no han sido activadas con el antígeno para el que codifica su TCR, como una forma más fidedigna de conocer la capacidad funcional de los linfocitos T, posterior a su desarrollo y diferenciación en el timo. Diferentes técnicas han sido empleadas para la medición de la concentración de los TREC, tales como, la reacción en cadena de polimerasa en tiempo real (PCR, por sus siglas en inglés), PCR cuantitativo-comparativo y PCR-ELISA.¹⁴

4. FUNCIONES DEL TIMO

1. Es el órgano linfoide primario esencial para el desarrollo de los linfocitos T
2. Es un órgano fundamental en la linfocitopoyesis y la inmunogénesis.
3. Controla la función inmunológica de otros órganos linfoides (ganglios, bazo y nódulos).

4. Sintetiza la hormona timulina, timopoyetina, factor humoral tímico, timosina y otras sustancias necesarias para la formación de los linfocitos T.
5. Actúa como antagonista de la función gonadal durante el desarrollo embrionario.
6. Juega un importante papel en la inmunidad del recién nacido.

El timo totalmente desarrollado tiene forma de pirámide, con un color rojizo en estado fresco debido a su gran vascularización y un peso máximo de 20 a 50 g a los 12 años, está bien encapsulado y formado por 2 lóbulos unidos. La cápsula presenta expansiones que dividen a cada lóbulo en muchos lobulillos, cada uno de los cuales tiene una capa cortical externa que rodea a la médula central.¹⁵

Las arterias que irrigan a esta glándula provienen de ramas de las arterias mamarias internas y de la arteria tiroidea inferior, a veces existe irrigación de la arteria tiroidea superior.¹⁶

Se ha observado que hay un escaso movimiento de macro moléculas desde la sangre al parénquima tímico a través de las paredes de los capilares corticales, mientras que los grandes vasos de la médula son muy permeables a las sustancias del plasma.

Por tanto, solo la población linfoide de la corteza está protegida frente a la influencia de macromoléculas circulantes. Esta es la base estructural de la llamada barrera hematotímica frente a los antígenos. En la actualidad esto se ha cuestionado, de tal manera que aunque en realidad exista una barrera hematotímica no se puede seguir manteniendo la idea clásica de que el timo es un microambiente libre de exposición de antígenos.

Se cree que los antígenos propios circulantes pueden entrar en la corteza por medio de la ruta transcapsular y contribuir a la inducción de tolerancia hacia lo propio mediante supresión clonal.

Las células epiteliales, también son el principal componente de la barrera hematotímica, que aísla tanto a la corteza como a la médula, al “acordonarlos” y evitar influencias externas.¹⁷

Las venas afluyen a las venas mamarias internas y en la vena tiroidea inferior. La multitud de vasos linfáticos que acompañan a los troncos sanguíneos terminan en los linfonodos vecinos, localizados en el mediastino. No hay linfáticos aferentes, los eferentes que se originan en la médula y en la unión cortico medular drenan por los extravasculares en compañía de las arterias y venas.

La inervación corresponde al tronco simpático, al nervio vago, y también a los nervios espinales cervicales.

Antes de que el timo sea invadido por células linfáticas, las fibras nerviosas autónomas penetran el primordio del timo. Es posible que estas fibras desempeñen un papel destacado en la vinculación de las funciones neurales e inmunológicas.

El timo sintetiza ácidos básicos como; ADN, ARN, ATP y la colinesterasa, elementos importantes en los movimientos de los músculos que intervienen en el proceso de aferencia y eferencia del sistema nervioso central y periférico. ¹⁸

En el timo hay varias poblaciones celulares, pero predominan las células epiteliales y los linfocitos T, pueden encontrarse además macrófagos, fibroblastos, eosinófilos, linfocitos B y dispersas células mioideas en médula y unión corticomedular (parecidas a las musculares, que aparentemente degeneran y desaparecen durante la vida fetal). Estas últimas células, aunque su función se desconoce, son de especial interés porque el timo está relacionado de forma un tanto oscura con la miastenia grave, una enfermedad musculoesquelética de aparente origen inmunitario. También se ha sugerido que las contracciones de estas células podrían facilitar el movimiento de los linfocitos a través del timo o fuera de él. ¹⁸

Las células epiteliales sintetizan varios péptidos que han sido considerados como hormonas tímicas y un factor mitogénico, producido por los macrófagos, todas estas sustancias, son responsables de la multiplicación, condicionamiento (o adiestramiento o pre procesamiento) y capacitación de los promielocitos que llegan al timo, para su transformación en linfocitos T.

No se conoce bien la función de estas hormonas, en la actualidad no se mantienen las afirmaciones iniciales respecto a que eran liberadas al torrente sanguíneo.

Parece más probable que medien interacciones a corto plazo dentro del propio timo, es decir, que tengan un efecto paracrino. ¹⁹

Hormonas tímicas:

- La timulina, se une ávidamente a los receptores de los linfocitos inmaduros para inducir la síntesis de marcadores de superficie de células T.

- El factor humoral tímico, es esencial para la diferenciación y expansión clonal de linfocitos T.

- La timopoyetina, promueve la diferenciación de los timocitos, aunque puede tener otras funciones no directamente relacionadas con el sistema inmunitario.

Se ha visto que tiene una gran afinidad para unirse a los receptores de acetilcolina y se sospecha que está involucrada en la patogénesis de la miastenia gravis.

- A la timosina, se le habían atribuido varios efectos inmunomoduladores.

En la actualidad se ha demostrado que aparece como una molécula la protimosina, la cual actúa como un péptido señal, cuyo objeto diana es el núcleo. No se encuentra confinada al timo y aunque pueda jugar un papel en la replicación del ADN no existen pruebas de que sea liberada de la célula por lo que probablemente no tenga ningún efecto parácrino en el timo, sino autócrino.

La inyección de hormonas tímicas mejora la inmunocompetencia del hombre y los animales pues modulan los epítomos de superficie en pacientes con deficiencias inmunitarias.²⁰

Cada vez es mayor la importancia que se concede a estas hormonas y mundialmente ya se muestran resultados muy esperanzadores en la utilización de las sustancias tímicas por su amplio espectro de acción terapéutica y valor diagnóstico en inmunodeficiencias primarias, enfermedades infecciosas autoinmunes, envejecimiento, las relacionadas con el estrés y el sistema neuroendocrino (incluyendo el reproductor), cáncer, quemaduras, alergias, entre otras.

Existen pocos datos a favor de los efectos a distancia de las hormonas tímicas, sin embargo sí se conoce que la secreción de otras glándulas endocrinas influye en el timo. Los esteroides adrenales y gonadales administrados en exceso provocan una disminución significativa de la población de timocitos en la corteza; el cortisol y las hormonas esteroides relacionadas con este, pueden provocar involución "accidental" del timo. La ausencia de timo aumenta la mortalidad en fetos masculinos, como si en ausencia de la glándula el feto no tolerara la acción de los andrógenos, por esta razón se considera que el timo actúa como antagonista de la función gonadal durante el desarrollo embrionario y la adrenalectomía o la gonadectomía provoca un aumento en el peso del timo.²¹

La administración de tiroxina se acompaña de una hipertrofia de las células epiteliales y un aumento en la secreción de timulina. La somatostatina, de la que hasta hace poco se creía que su función se limitaba a regular la secreción de la hormona de crecimiento por la hipófisis, en la actualidad se ha visto que ejerce un papel sobre las células del sistema inmune. Se han encontrado receptores para esta hormona en los linfocitos y monocitos, detectándose en bajas concentraciones en el bazo, timo y bolsa de Fabricio. En el timo se ha podido localizar a nivel de la frontera corticomedular y en la médula. Aún se desconoce su significado fisiológico en éste y en el resto de los órganos linfoides.

La función del sistema nervioso y otros elementos neuroendocrinos en la biología general del timo, están lejos de conocerse bien y sugieren muchas posibilidades interesantes.

Los linfocitos T constituyen el 50 % de la población de células de la leche materna y estos, en comparación con los linfocitos sanguíneos, presentan una proliferación disminuida en

sus diferentes activadores en relación con la citotoxicidad mínima de las células dependientes de anticuerpos. La proliferación de linfocitos en el calostro y la leche materna, evidencian una respuesta a la estimulación de antígenos virales de rubéola, citomegalovirus y parotiditis, pero están limitados en su potencial para reconocer o responder a ciertos agentes infecciosos, comparados con las células T de la circulación periférica.²²

Los linfocitos del calostro y la leche materna producen efectos inmunológicos que benefician al lactante durante sus primeros años de vida, al protegerlo de numerosas enfermedades, como enterocolitis necrotizante, meningitis neonatal, infecciones del tracto digestivo, respiratorio y genitourinario.²³

Todo lo anterior enfatiza la importancia del timo en el desarrollo de diversas funciones de la inmunidad celular, a nivel de diversas poblaciones de los linfocitos T, particularmente en la diversidad del TCR de las células T cooperadoras (CD3+CD4+), en el número y funcionalidad de las células Treg, lo cual impacta en las funciones de vigilancia y tolerancia con el potencial desarrollo de infecciones recurrentes, de fenómenos autoinmunes y en las enfermedades alérgicas.²⁴

5. INVOLUCIÓN TÍMICA

La involución que sufre el timo en los humanos se inicia durante la pubertad y se completa al final de la sexta década de la vida, de modo que en la edad adulta gran parte del parénquima tímico ha sido reemplazado por grasa (ver imagen 2).²⁵

En este proceso disminuye su tamaño, peso y actividad como resultado de la influencia que ejercen sobre él los altos niveles de hormonas sexuales circulantes durante la pubertad, el bajo número de células precursoras derivadas de la médula ósea y los cambios que sufre el microambiente tímico.²⁶

El timo es altamente activo durante el periodo prenatal, trabaja al máximo a los 6 meses de edad y continúa su crecimiento durante la niñez alcanzando su máximo tamaño durante la pubertad. Después de esta etapa la glándula comienza una involución gradual fisiológica, llamada “involución natural” con el consiguiente descenso en la producción de linfocitos y es representada por pequeños vestigios en el adulto. Sin embargo, el tejido linfoide que persiste mantiene algo de función.²⁷

Al nacer, el timo pesa de 10 a 35 gr, y su tamaño sigue aumentando hasta la pubertad momento en el que alcanza su peso máximo de 20 a 50 gr.

Este fenómeno tiene implicaciones en el mantenimiento del repertorio de linfocitos T vírgenes o Naïve, lo cual provoca numerosos defectos funcionales, incluido el acortamiento de telómeros, un repertorio restringido de receptor de células T (TCR por sus siglas en inglés), poca producción de interleucina 2 (IL-2) y deficiencias en su diferenciación y proliferación hacia células efectoras.^{25,26}

Se han descrito diversos cambios asociados con la involución tímica. Entre los más estudiados, se encuentra: la reducción en el número total de linfocitos T vírgenes que expresan el fenotipo CD45RA+, CD62L+ CD27+, CD28+ y CD11a+, por disminución en la timopoyesis; y el incremento en el número de linfocitos T de memoria, como una consecuencia de la experiencia inmunológica que se adquiere durante la vida. El efecto de una reducción de linfocitos T vírgenes en sangre periférica es el empobrecimiento en el repertorio total de linfocitos T, lo cual puede llevar a una limitada respuesta hacia los nuevos antígenos.²⁸

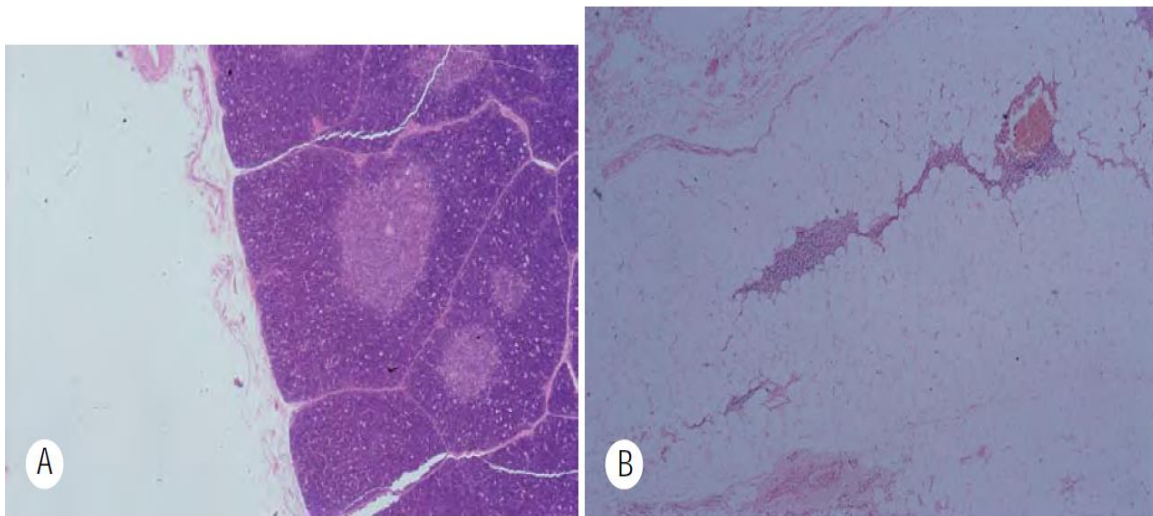


Imagen 2. (A). Timo pediátrico que muestra división en área cortical (externa más teñida) y medular (interna menos teñida), con lóbulos separados por septos delgados. (B) Involución crónica con la edad. Timo de una persona de 82 años que muestra una dramática reducción de los elementos linfoepiteliales y una invasión de tejido adiposo en los septos y en la región intra tímica inmediatamente debajo de la cápsula. Tinción de hematoxilina. Aumento X 250.

Tomado de: Robert Rich. *Clinical Immunology: Principles and Practice*, 4ª edición. Elsevier/Saunders,

Experimentos de trasplante de tejido tímico y de MO procedentes de ratones jóvenes a ratones viejos, demuestran que la maduración de los protimocitos a linfocitos T está gravemente comprometida a partir de los dos meses de edad del ratón. Por otro lado, el

número de protimocitos en la médula no parece variar con la edad, aunque sí sufren un proceso madurativo diferente. Así, el conjunto de precursores DN, que expresan CD44 pero no CD25, no está alterado con la edad. Sin embargo, su progenie inmediata (CD44+/CD25+, CD44-/CD25+, CD44-/CD25) sufre una declinación con el envejecimiento. Estos datos muestran cómo la maduración tímica en edades avanzadas parece estar bloqueada en las primeras etapas, justo en el momento previo al reordenamiento del gen V β del RCT, en los constituyentes de la línea germinal.²⁵⁻²⁸

El envejecimiento que sufre el sistema inmunitario genera cambios en el repertorio de los linfocitos T. Diferentes subpoblaciones de linfocitos T modifican su fenotipo durante el envejecimiento, lo que incrementa la proporción de linfocitos T de memoria. Este cambio se presenta tanto en linfocitos T CD4+ como en linfocitos T CD8+.

La expresión de marcadores de memoria CD44 y CD62L (L-selectina) también puede ser modificada. Aunque los linfocitos T con fenotipo de memoria se incrementan con la edad, existe poca evidencia que sustente que su función esté disminuida. Uno de los cambios cualitativos más relevantes existentes en la población de linfocitos T de memoria es la aparición de múltiples expansiones clonales dentro de los linfocitos T CD8+, así como la pérdida de moléculas coestimuladoras como CD40L y CD28, con un espectro de especificidad altamente restringido, de tal forma que las células T deterioradas manifiestan poca citotoxicidad y un desbalance en la producción de citocinas, lo que genera condiciones proinflamatorias.²⁹

La involución del timo con la consiguiente disminución de las células T cooperadoras, afecta además la función y la diversidad de las células B, que conduce a una débil y deficiente respuesta de anticuerpos y un incremento en la producción de auto anticuerpos.

La atrofia del timo y la disminución de su actividad constituyen procesos naturales que suceden a lo largo de la vida, los cuales provocan alteraciones en las respuestas de células T y B, que dan como resultado un aumento en la susceptibilidad para adquirir infecciones debido a la disminución en la capacidad para eliminar diferentes patógenos, la disminución de la memoria inmunológica y un alto riesgo de padecer enfermedades autoinmunes y cáncer.²⁴

El timo puede involucionar por el efecto de varios factores que han sido clasificados como fisiológicos y patológicos. Por lo general, la hipoplasia de la glándula timo provoca una serie de trastornos inmunológicos que están relacionados con la disminución del número y de la competencia de los linfocitos T. Los principales factores fisiológicos que pueden provocar

una involución o hipoplasia del timo generalmente se presentan a causa de cambios hormonales por: pubertad, el embarazo y el envejecimiento.

Las situaciones patológicas más comunes que provocan la atrofia del timo son: estrés intenso (principalmente en ratones), deficiencia de zinc, administración de IL-1, administración de dosis altas de glucocorticoides, y de esteroides gonadales, liberación de endotoxinas, desnutrición, infecciones graves, radiaciones ionizantes y, septicemias.²⁶

En niños y adultos jóvenes con enfermedades como la infección por VIH, en estados avanzados de SIDA, el timo aparece como “tierra desbastada” debido a la despoblación linfoide. Se ha tratado de trasplantar un timo humano o animal en una persona con VIH positiva.³⁰

También se ha tratado de estimular el timo utilizando hormonas tímicas. Se ha comprobado que los medicamentos antivirales potentes permiten que el timo reemplace las células T perdidas. Estas técnicas quizás sigan siendo importantes para personas VIH positivas de edad avanzada.³¹

A partir de la pubertad, cuando ocurre la maduración sexual y se presenta un incremento importante en la producción de esteroides gonadales, el timo comienza a involucionar y, desde ese momento en adelante. Su velocidad de crecimiento en el niño y de involución en el adulto es sumamente variable, y por eso es difícil estimar su peso a través de la edad. La atrofia interesa particularmente las zonas laterales e inferiores de la glándula, de modo que en el adulto, adquiere una forma más alargada y un color gris. Durante la involución la corteza se adelgaza, los elementos glandulares del parénquima son sustituidos en grado considerable por tejido adiposo tornándose entonces en color amarillento.³²

Los linfocitos T son los responsables de la inmunidad celular mediada por células, en la sangre periférica ellos representan el 60 a 70 % de los linfocitos totales, el resto se encuentra en las áreas paracorticales de los linfáticos y en los manguitos periarteriolas del bazo.

Si el timo es agredido ya sea de causa nutricional, infecciosa o emocional y presenta hipoplasia o atrofia, esto produce una estimulación del eje hipotálamo hipofisario, con la consiguiente liberación de glucocorticoides, por las glándulas suprarrenales; estos activan el proceso de apoptosis en los linfocitos T inmaduros intra tímicos (corticales) y hacen que este órgano se convierta en tejido fibrograso.²⁷

También se sabe que la desnutrición causa un gran deterioro en el sistema inmune. Un niño desnutrido no puede defenderse ante la agresión de los microorganismos y tampoco puede

responder a la aplicación de vacunas porque no es capaz de fabricar anticuerpos, pues al estar afectados los linfocitos T no pueden defenderse contra virus y bacterias.

En la desnutrición el timo resulta seriamente dañado y los linfocitos T no llegan a madurar antes de emigrar.³³

Éstos ejercen sus funciones en diferentes partes del organismo, como por ejemplo en la mucosa que tapiza el interior de las vías aéreas y el intestino. Si las células T no están maduras no cumplen su función en forma adecuada, y ello se refleja precisamente en las mucosas, unas de las áreas más grandes del cuerpo que están en contacto con microorganismos del medio externo.

En estudios realizados en ratas desnutridas a las que se realimentó hasta alcanzar el peso normal, el timo recuperó su volumen y el número de células pero el tamaño y la composición de estas no era normal y no sintetizaban todos los componentes de una célula normal, por ejemplo, ciertas proteínas de la membrana celular denominadas receptores, encargadas de la comunicación entre las células y de distinguir lo propio de lo ajeno.

La falta de una adecuada producción y utilización de los factores del timo ocasionan un desbalance inmune que contribuye al surgimiento de muchas de las enfermedades del envejecimiento como tal, pues se ha apreciado que a medida que el timo involuciona con la edad y con él la producción de los factores tímicos y la inmunidad que depende de él, aumenta la incidencia de afecciones relacionados con el envejecimiento: cáncer, enfermedades infecciosas y autoinmunes.

Recientemente se han descubierto interacciones timo-cerebro, lo que ha sentado las bases para formular la hipótesis de que la involución del timo y la disminución del nivel de sus hormonas en sangre puede ser la señal que indique al cerebro el desencadenamiento de diferentes mecanismos que conduzcan a los complejos procesos del envejecimiento.²⁷

6. TIMECTOMÍA NEONATAL: ENFERMEDAD CARDÍACA CONGÉNITA

Las enfermedades cardíacas congénitas (CHD por sus siglas en inglés) engloban defectos septales, defectos obstructivos en el corazón o los grandes vasos y anomalías complejas. La prevalencia en la población general se estima en el 1% de todos los nacidos vivos.³⁴

Esta frecuencia puede incrementar hasta el 4% de los partos de mujeres que han sido diagnosticadas con CHD durante la infancia. Los casos con gravedad media normalmente necesitan poco o ningún tratamiento, pero las formas mortales requieren cirugía invasiva para garantizar la supervivencia de los pacientes.

Como puede observarse en la figura 3, el timo está situado en el mediastino anterior, detrás del esternón, en frente del corazón y los grandes vasos y, por lo tanto, en el campo quirúrgico de la cirugía a corazón abierto. Durante estos procedimientos el campo quirúrgico debe ser despejado y el timo se extrae, total o parcialmente, de forma rutinaria. Desde que se iniciaron, los procesos de cirugía neonatal para corregir trastornos CHD son cada vez más habituales y, en consecuencia, la timectomía se ha convertido en una práctica habitual. Hasta el momento no hay descrita ninguna consecuencia clínica a corto plazo de la timectomía de neonatos.

En los individuos con enfermedad cardíaca congénita es común la práctica de la realización de la cirugía paliativa y correctiva en la lactancia y la primera infancia. Los niños que se someten a cirugía cardíaca correctiva o paliativa frecuentemente son sometidos a timectomía incidental para aumentar la exposición del campo quirúrgico. Las personas más jóvenes tienen más probabilidades de sufrir una timectomía imprevista debido al pequeño tamaño de la cavidad torácica infantil y la mayor complejidad de las cirugías realizadas en esta edad.

A pesar de que se conoce una deficiencia inmunológica importante como resultado de la ausencia del timo durante el desarrollo fetal, y de que se han realizado algunos estudios, poco se conoce del efecto de timectomía en humanos durante el periodo de desarrollo inmunológico postnatal.

Aunque la ausencia del timo durante la vida fetal se asocia con una ausencia completa de desarrollo de las células T y la inmunodeficiencia profunda (como se ve en el síndrome de Di George completo ³⁵), la contribución postnatal del timo con el desarrollo inmunológico había sido claro, históricamente. Sin embargo, datos recientes han confirmado que en los individuos normales hay una continua contribución del timo con el mantenimiento del compartimento de células T durante toda la vida.³⁶

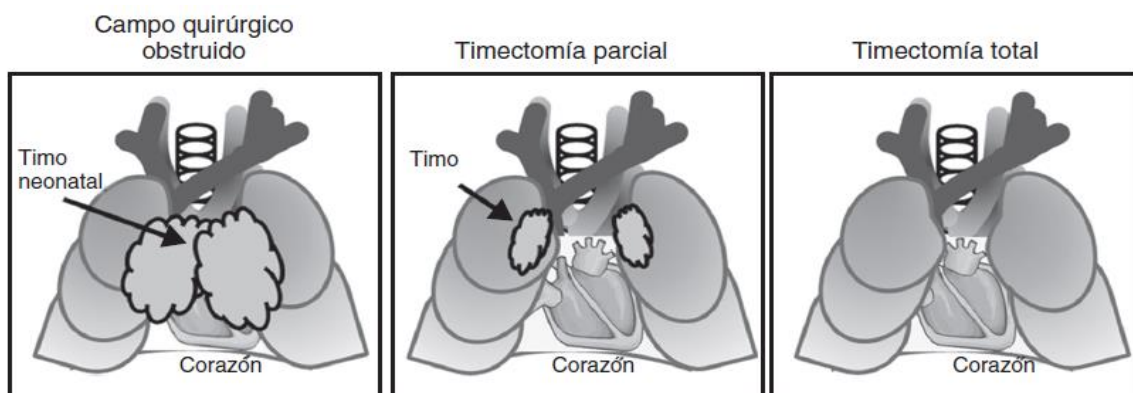


Figura 3 . Posición anatómica del timo.

En la figura se representa la necesidad de la timectomía para la corrección en enfermedades cardíacas congénitas y los diferentes procedimientos utilizados. ¹⁹

Tomado de: Rev Esp Geriatr Gerontol. 2013;**48**(5):232–237.

ANTECEDENTES.

Diferentes estudios transversales y longitudinales han estudiado la potencial falla inmunológica de los niños timectomizados. Sin embargo, hasta hace poco, había sido difícil de cuantificar la actividad del timo, incluso en individuos normales, por lo que es difícil de cuantificar la actividad del timo y evaluar el impacto de la timectomía en el compartimento de células T vírgenes y en la producción de células T de novo con los efectos posteriores sobre inmunidad adaptativa.

Los intentos iniciales para cuantificar la contribución de la timopoyesis al sistema inmune celular durante el desarrollo postnatal y en la edad adulta se centraron en la medición fenotípica de la población de células T vírgenes en sangre periférica. Estas células, por definición, son células T maduras que aún no se han encontrado con sus antígenos compatibles en la circulación. Las células T vírgenes se identificaron inicialmente como células CD4+ o CD8+ que también expresan CD45RA en su superficie. El uso de citometría de flujo multicolor ha puesto en tela de juicio la dependencia de expresión de éstos por sí sola, ya que hasta el 10-30% de las células T CD4+ o CD8+ CD45RA carecen de marcadores de la superficie celular y la expresión de perfil de citocinas característicos de las células naïve o vírgenes.³⁷

Los marcadores de citometría de flujo también fallan en diferenciar los TRECs en la periferia producidos por la expansión clonal. Sin embargo, Douek et al.^{38,39} desarrollaron un estudio basado en PCR que permite la cuantificación de las células que llevan TREC, que son moléculas no replicantes de ADN circular generados durante el reordenamiento por escisión de las secuencias codificantes para las proteínas del receptor de células T.^{38,39}

Los TREC permanecen en las células T después de su maduración y liberación del timo a la periferia. A pesar de que se diluyen conforme las células proliferan, el número de TRECs sirve como un parámetro de la timopoyesis.^{40,41,42}

El uso de estas técnicas ha demostrado que el timo normalmente permanece activo hasta la edad adulta, y que se requiere su función para la reconstitución de la función inmune durante el tratamiento de la infección por VIH, y después de la quimioterapia citolítica para cáncer o trasplante de médula ósea.^{43-47.}

A pesar de que los datos son todavía escasos y la metodología heterogénea, y que esto lleva a que la dinámica tímica tras la cirugía neonatal (especialmente tras la timectomía parcial y en los potenciales casos de regeneración del tejido) todavía sea un tanto desconocida, se han descrito numerosas alteraciones periféricas en las subpoblaciones de LT CD4 y CD8.

Durante el primer año posttimectomía se ha observado una disminución en los niveles de LT.^{48, 49} A medio plazo (de uno a cinco años poscirugía) los niveles LT periféricos siguen siendo bajos,^{50,51} sugiriendo que la homeostasis periférica no es suficiente para mantener unos niveles normales de LT en ausencia de función tímica, al menos en este escenario clínico. A medio plazo también se ha descrito la disminución de los niveles de fragmentos circulares y estables de ADN generados en la maduración intratímica, TRECs (círculos de escisión del receptor de células T) y la pérdida de diversidad del TCR.^{52,53}

Respecto a los efectos a largo plazo (más de cinco años poscirugía) hay que indicar que persisten los bajos niveles de LT y de TRECs. Algunos estudios apuntan hacia una normalización tras 20-30 años⁵⁴, mientras otros describen que las alteraciones se mantienen a lo largo de la vida.⁵⁵

Estas diferencias podrían estar poniendo de manifiesto diferencias constitutivas entre las cohortes o diferencias en el potencial de regeneración del tejido tímico dependiendo de la edad a la que se realizó la timectomía.

En nuestro país nunca se ha realizado un estudio con esta técnica.

Además de las alteraciones en los LT, también se han descrito alteraciones generales del sistema inmunitario a nivel periférico como la disminución de los niveles de LT vírgenes, aumento en la biodisponibilidad de IL-7, respuestas Th2 alteradas, aumento en el número de neutrófilos y bajo número de plaquetas pese a los niveles normales de linfocitos B y células NK.⁵⁶

Además, los individuos que han sido timectomizados tras el nacimiento muestran alteraciones inmunológicas definitorias de fragilidad inmune en el anciano: mayor tasa de proliferación de LT vírgenes, fuertes respuestas oligoclonales frente a citomegalovirus (CMV), LT que expresan el marcador de agotamiento CD57, biomarcadores de inflamación y menor capacidad de respuesta a vacunas (nuevos antígenos) pese a una respuesta memoria conservada.⁵⁷

Una conclusión tranquilizadora que puede extraerse de estos estudios es que no existen consecuencias clínicas tras 20-30 años posttimectomía.

Este resultado puede ser explicado parcialmente por la regeneración del timo tras una resección parcial de la glándula y/o por la restauración del sistema inmunitario durante la edad adulta.

Sin embargo, estos niños timectomizados están creciendo con un sistema inmunitario especialmente frágil, prematuramente envejecido, en el que se observan numerosas alteraciones. Estos resultados sugieren que la timectomía temprana sí podría tener consecuencias cuando la inmunosenescencia prematura se una al deterioro general del organismo, propio de la edad.

La timectomía realizada antes de la madurez inmunológica puede presentar efectos pronunciados sobre la homeostasis de linfocitos e importantes consecuencias para las futuras respuestas al neo antígeno. Además, el crecimiento somático de los lactantes puede requerir la expansión periférica significativa para mantener la homeostasis de los linfocitos y puede ocurrir una dilución resultante de las subpoblaciones de linfocitos dentro de un corto período de tiempo después de la timectomía.

Varios estudios han intentado para describir los cambios que se producen en los seres humanos como resultado de la timectomía. En un pequeño estudio de pacientes con miastenia gravis en adultos timectomizados que nunca usaron medicamentos inmunosupresores, Storek *et al.* encontraron una tendencia hacia la baja de TRECs en las células T CD4+ y más aún las células T CD8+ en comparación con los valores normales. Debido a que los niveles de TREC no eran cero (especialmente entre las células CD4) en sus sujetos, especularon que la timectomía fue incompleta, que las células T pueden ser generadas de novo en los sitios extratímicos, o que los TREC generados antes timectomía persistían durante décadas.⁵⁸

Varios estudios anteriores también, han tratado de abordar los cambios en la producción de linfocitos que pueden resultar de la timectomía incidental realizado durante los procedimientos quirúrgicos cardiorácicos en los niños pequeños.^{59, 60}

Desafortunadamente, estos estudios anteriores implicaron el análisis inmufenotípico limitado de células T y no utilizaron los métodos desarrollados recientemente (determinación de TRECs) para cuantificar la actividad del timo. Ramos y sus colegas examinaron los pacientes pediátricos que habían sido sometidos a timectomía incidental durante la cirugía cardíaca. Descubrieron una diferencia en las poblaciones de linfocitos NK, lo que sugiere una falta de diferenciación de los linfocitos normales en los niños que habían sido sometidos a timectomía temprana, en comparación con aquellos con timectomía a una edad mayor.⁶¹

En otro estudio, Gennery y colaboradores examinaron los subgrupos de linfocitos en los niños que se habían sometido a un trasplante de corazón o tenían enfermedad cardíaca congénita y encontraron que los números de células T CD8+ se redujeron en comparación con los controles normales.⁶²

En un estudio relativamente reciente, donde utilizaron técnicas más modernas para detectar TRECS, encontraron un efecto mayor en la subpoblación de células T CD8+ así. Además de sugerir que, aunque la presencia de la enfermedad cardíaca congénita por sí misma no tiene ningún efecto significativo sobre la timopoyesis o subpoblaciones de linfocitos, cualquier intervención quirúrgica torácica, incluidos aquellos en los que se salva el timo, pueden producir perturbaciones a largo plazo en poblaciones de células T periféricas. Así también que la reducción o lesión al tejido del timo funcional durante los procedimientos quirúrgicos cardiorráquicos en lactantes y niños pequeños puede resultar en la reducción a largo plazo de la nueva producción de células T como se evidencia por una reducción en el número de TREC años posteriores. A pesar de una reducción de la producción tímica de células T y linfocitos periféricos reducidos, los linfocitos se mantienen a niveles mínimos en niños timectomizados por mecanismos todavía por determinar. Estos pueden incluir la expansión periférica o mecanismos homeostáticos que dan lugar a perturbaciones en las células B o natural killer (NK) aumentado.⁶³

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Hasta en el 80% de los pacientes que han sido sometidos a una cirugía cardiovascular con abordaje en tórax anterior, se les realiza una resección del timo, esto debido a la interferencia que tiene el órgano con la visibilidad de estructuras cardíacas. En la mayoría de los pacientes la cirugía se lleva a cabo a edades tempranas.

El timo es un órgano vital para el correcto desarrollo de linfocitos T que son células necesarias para la protección de los seres humanos ante patógenos y microorganismos infecciosos; las alteraciones en el desarrollo de este órgano por tanto, provocan desde una inmunodeficiencia leve hasta un problema grave que conlleva a la muerte si no se trata a tiempo y que en algunos casos requiere el trasplante de timo.

Por lo que ante la escasa información estandarizada y poco concluyente en la literatura en población pediátrica, nos planteamos la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es la diferencia en la función linfocitaria de pacientes con resección quirúrgica del timo vs pacientes sanos?

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.

¿Existe diferencia en la función linfocitaria de pacientes con resección quirúrgica del timo vs pacientes sanos?

JUSTIFICACIÓN.

Los pacientes sometidos a cirugía cardiotorácica frecuentemente sufren afectación estructural del timo, que al ser el lugar de maduración de linfocitos T, podría colocarlos en un estado de deficiencia tanto de número como de función de estas células importantes para la defensa del organismo.

En la actualidad tenemos sólo pocos datos sólidos acerca de la función celular de este grupo de pacientes comparados con sujetos sanos y los resultados son contradictorios.

El poder caracterizar el funcionamiento linfocitario de sujetos con antecedente de resección quirúrgica del timo y compararlos con sujetos sanos nos permitiría aportar datos para el entendimiento de las interacciones inmunológicas de pacientes con este antecedente y conocer la repercusión de la resección quirúrgica de este órgano nos ayudaría a sentar las bases para en un futuro emitir recomendaciones pertinentes al respecto en los pacientes sometidos a cirugía cardiotorácica.

OBJETIVOS.

Objetivo general:

Comparar la función linfocitaria de pacientes con resección quirúrgica del timo vs pacientes sanos

Objetivos específicos:

1. Comparar el porcentaje de proliferación linfocitaria bajo estimulación con fitohemaglutinina en pacientes con resección quirúrgica del timo vs pacientes sanos
2. Comparar el número de TRECs (emigrantes tímicos tempranos) en pacientes con resección quirúrgica del timo vs pacientes sanos
3. Comparar el número de subpoblaciones linfocitarias en pacientes con con resección quirúrgica del timo vs pacientes sanos.

HIPÓTESIS.

La función linfocitaria medida mediante los círculos de escisión del receptor de Linfocito T será 30% mayor en pacientes sanos (con timo) vs sin timo por resección quirúrgica.

La hipótesis se construyó con base en lo publicado por Madhok et al. en donde se observa una diferencia de 30% en el número de TRECs entre aquellos pacientes cardiopatas con timo vs sin timo por resección quirúrgica.

MÉTODOS.

DISEÑO DEL ESTUDIO

De acuerdo a la imposición o no de una maniobra con fines de investigación es un estudio:

Observacional

De acuerdo al seguimiento o no del paciente a través del tiempo es un estudio:

Transversal

De acuerdo a la direccionalidad en la obtención de la información es un estudio:

Retroprolectivo

De acuerdo a la búsqueda o no de asociación entre dos variables es un estudio:

Comparativo

POBLACIÓN OBJETIVO

Pacientes con resección quirúrgica del timo por cardiopatía.

Pacientes "sanos"

POBLACIÓN ELEGIBLE

Pacientes con resección quirúrgica del timo por cardiopatía que cuenten con seguimiento por el servicio de cardiología del Hospital Infantil de México Dr. Federico Gómez.

Pacientes "sanos" que acudan al servicio de alergia del Hospital Infantil de México Federico Gómez acompañando a los casos.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN PACIENTES CON RESECCIÓN QUIRÚRGICA DEL TIMO POR CARDIOPATÍA

-Cualquier género

-Pacientes entre 1 y 18 años

-Pacientes con resección quirúrgica del timo por cardiopatía establecido mediante hoja quirúrgica del evento.

-Pacientes a quienes sus padres autoricen participar por medio de firma de consentimiento informado y en mayores de 8 años con firma además de asentimiento informado.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN PACIENTES CON RESECCIÓN QUIRÚRGICA DEL TIMO POR CARDIOPATÍA

- Pacientes con cualquier tipo de infección aguda (gastrointestinal, vías respiratorias superiores o inferiores, etc.) o en los últimos 15 días
- Pacientes hospitalizados actualmente por cualquier causa
- Pacientes con hospitalización en los dos meses previos por cualquier causa
- Pacientes que hayan sido transfundidos en los últimos 15 días previos a la toma de muestra para este estudio.
- Pacientes con quemaduras de por lo menos 2º grado con una afectación de más del 10% de superficie corporal en los últimos 2 meses
- Pacientes con antecedente de cirugía en los 2 meses previos por cualquier causa
- Pacientes con uso de esteroide sistémico en los últimos 2 meses por cualquier causa
- Pacientes con enfermedad neoplásica o degenerativa concomitante
- Pacientes con cualquier contraindicación para la toma de la muestra por enfermedad de base.

NOTA: Todos aquellos pacientes en que sean excluidos inicialmente por tener alguno de los primeros 7 puntos positivos podrán ser reevaluados para su posterior inclusión siempre y cuando cumplan con los tiempos de espera solicitados. Los criterios de exclusión se basan en la posible interferencia que pueden tener estos eventos sobre la citometría de flujo.

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN PACIENTES CON RESECCIÓN QUIRÚRGICA DEL TIMO POR CARDIOPATÍA

Al ser un estudio transversal no se cuenta con criterios de eliminación

- **CRITERIOS DE INCLUSIÓN SANOS**
- Cualquier sexo
- Pacientes entre 1 y 18 años pareados por edad con paciente

- Pacientes sin antecedente de enfermedad crónica degenerativa diagnosticada
- Pacientes que acepten participar en el estudio con firma de consentimiento y en su caso asentimiento informado.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN SANOS

- Pacientes con antecedente de hospitalización por causa infecciosa
- Pacientes con rinitis alérgica, asma, dermatitis atópica o cualquier patología asociada con alergia.
- Pacientes con antecedente de autoinmunidad de cualquier tipo, purpura de Henoch, artritis reumatoide, etc.
- Pacientes con antecedente de infección nosocomial por cirugía previa
- Pacientes que hayan sido transfundidos en los últimos 15 días previos a la toma de muestra para este estudio por cualquier causa.
- Pacientes con quemaduras en los últimos 2 meses
- Pacientes con alteración ortopédica de tórax
- Pacientes con antecedente de cirugía en los 2 meses previos por cualquier causa
- Pacientes con uso de esteroide sistémico en los últimos 2 meses por cualquier causa

CRITERIOS DE ELIMINACIÓN SANOS

Al ser un estudio transversal no se cuenta con criterios de eliminación

SITIO

El estudio se realizó en el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) que es un hospital de tercer nivel de atención médica, que cuenta con un área de hospitalización y consulta externa de especialidades y sub-especialidades de pediatría y cardiología. Es un centro de referencia de pacientes con cardiopatías congénitas, que brinda métodos de detección, diagnóstico, tratamiento y seguimiento para pacientes cardiopatas. Específicamente el estudio se realizó en el Departamento de Alergia e Inmunología, Genética, Laboratorio Central y área de ultrasonido de dicha Institución.

Se contó con la colaboración del Instituto Nacional de Pediatría INP Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias Primarias para capacitación sobre estudios de funcionamiento de células T.

Búsqueda de población elegible.- Hospital Infantil de México Federico Gómez particularmente en la consulta externa de cardiología.

Entrevista, selección y firma de consentimientos.- Oficina del Servicio de Alergia e inmunología del HIMFG de lunes a viernes de 8:00 a 14:00 horas.

Aplicación de hoja de recolección de datos así como exploración física completa.- Oficina del Servicio de Alergia e inmunología del HIMFG de lunes a viernes de 8:00 a 14:00 horas.

Toma de muestras sanguíneas.- Laboratorio de Servicio de Alergia e inmunología del HIMFG de lunes a viernes de 8:00 a 12:00 horas.

Procesamiento inicial de muestras para linfoproliferación y almacenaje.- Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas, HIMFG. Tanque de nitrógeno con temperatura -196 °C.

Procesamiento final de muestras para linfoproliferación.- Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas, HIMFG. Se programará procesamiento por cada 20 muestras obtenidas.

Almacenaje de muestras para TRECs.- Laboratorio de Servicio de Alergia e inmunología del HIMFG. Refrigerador 4°C

Procesamiento final de muestras para TRECs.- Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias Primarias. Instituto Nacional de Pediatría. Se programó procesamiento por cada 20 muestras obtenidas.

TAMAÑO DE LA MUESTRA

Tabla 1. Cálculo del tamaño de muestra					
Variable	Calculado por:	Autor de referencia	Valores	Fórmula	N
Número de círculos de escisión del	Diferencia de medias	Madhok et al.	d=9,271 Trecs/millón PBMC	$n = 2 \left[\frac{(Z_{\alpha} - Z_{\beta}) DE}{\mu_1 - \mu_2} \right]^2$	6 pacientes por grupo

receptor de Linfocito T en pacientes con y sin timo			a=0.05 unilateral B= 0.20 Media grupo A = 47,916 Trecs/millón PBMC Media grupo B = 33,157 Trecs/millón PBMC DE= 14,759 Trecs/millón PBMC		
Porcentaje de proliferación linfocitaria bajo	Diferencia de medias	Pillero LM. 2004	d= 34,180 cpm a=0.05 unilateral B= 0.20 Media grupo A = 66,288 cpm Media grupo B = 59,760 cpm DE= 32,182.5 cpm	$n = 2 \left[\frac{(Z_\alpha - Z_\beta) DE}{\mu_1 - \mu_2} \right]^2$	429 pacientes por grupo Incluidos

Se incluyeron 38 pacientes cardiopatas sin timo y 31 controles sanos pareados por edad.

MUESTREO

Se trata de un muestreo por conveniencia, eligiendo de forma consecutiva cada individuo accesible que cumpla los criterios de selección.

LOGÍSTICA DE LA INTERVENCIÓN

Los pacientes se reclutaron de la consulta externa de cardiología nuestro hospital. Se les invitó a participar checando previamente si cumplen con los criterios de inclusión y exclusión estipulados; previa firma de consentimiento y asentimiento informado, se le realizará una valoración completa que comprende una historia clínica y examen físico así como recopilación de datos relevantes para el protocolo: hoja quirúrgica en caso de corrección de cardiopatía. Anexo 2 Hoja de recolección de datos.

Se invitó además a participar a un familiar no directo o conocido que comparta las mismas características demográficas (edad y género) para formar parte del grupo control de la técnica de linfoproliferación así como la medición de TRECs. Se cuenta con criterios de inclusión y exclusión exclusivos para estos pacientes.

Se tomó muestra sanguínea al paciente y su control, se dividirá la muestra en:

- 500 micro litros en tubo con anticoagulante EDTA para biometría hemática
- 5ml tubo con anticoagulante EDTA para citometría de flujo y linfoproliferación
- 500 micro litros con anticoagulante EDTA para ser llenado papel filtro para cuantificación de TRECs

En todos los casos los investigadores carecieron de la información de resultados alternos a su campo de trabajo.

CONSIDERACIONES ÉTICAS.

El presente estudio cumple con lo estipulado en el título segundo del Reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación para la salud. Según esta ley vigente el estudio corresponde a la categoría I (Investigación con riesgo mínimo) ya que no representa riesgos agregados a la salud, la información obtenida de los pacientes durante el estudio será mantenida con estricta confidencialidad por los investigadores participantes.

A todos aquellos pacientes que cuenten con resultados alterados en las variables estudiadas se les dará seguimiento en la consulta externa del Servicio de Alergia e Inmunología del HIMFG de acuerdo a la normativa de la Institución.

PLAN DE ANÁLISIS DE LOS DATOS

Objetivo: Descripción general de la población de estudio en ambos grupos.

Análisis univariado.

Variable	Tipo de variable	Prueba estadística
Edad	Cuantitativa discreta	Medidas de tendencia central: Mediana Medidas de dispersión: Rango
Sexo	Cualitativa dicotómica	Proporción
Peso	Cuantitativa continua	<u>Libre distribución</u> Medidas de tendencia central: Mediana Medidas de dispersión: Rango
Talla	Cuantitativa continua	<u>Libre distribución</u> Medidas de tendencia central: Mediana Medidas de dispersión: Rango

Objetivo: Comparación de variables demográficas en ambos grupos para establecer adecuado pareamiento por edad y sexo.

Grupos de comparación: Pacientes con resección quirúrgica del timo y pacientes sanos

Análisis bivariado

Variable	Tipo de variable	Prueba estadística
Edad	Cuantitativa discreta	<u>Libre distribución</u> U Mann-Whitney
Sexo	Cualitativa dicotómica	Prueba exacta de fisher
Peso	Cuantitativa continua	<u>Libre distribución</u> U Mann-Whitney
Talla	Cuantitativa continua	<u>Libre distribución</u> U Mann-Whitney

Objetivo: Comparar la función linfocitaria

Grupos de comparación: Pacientes con resección quirúrgica del timo y pacientes sanos

Análisis bivariado

Variable	Tipo de variable	Prueba estadística
No. De TRECs	Cuantitativa, continua.	<u>Libre distribución</u> U Mann-Whitney
Linfoproliferación	Cuantitativa continua	<u>Libre distribución</u> U Mann-Whitney

Objetivo: Comparar el número de subpoblaciones linfocitarias

Grupos de comparación: Pacientes con resección quirúrgica del timo y pacientes sanos

Análisis: Bivariado

Variable	Tipo de variable	Prueba estadística
CD3+	Cuantitativa discreta	<u>Libre distribución</u> U Mann-Whitney
CD4+	Cuantitativa discreta	<u>Libre distribución</u> U Mann-Whitney
CD8+	Cuantitativa discreta	<u>Libre distribución</u> U Mann-Whitney

Todas las estimaciones estadísticas se realizarán por medio del programa estadístico SPSS versión 20.0

DESCRIPCIÓN DE VARIABLES.

VARIABLES:

Resección quirúrgica de timo

Función linfocitaria

Número de subpoblaciones linfocitarias

Variables independientes:

1. Resección quirúrgica de timo

Variables Dependientes:

1. Función linfocitaria
2. Número de subpoblaciones linfocitarias

Variables Confusoras:

1. Tiempo desde la resección del timo

Variables demográficas:

1. Sexo
2. Edad en meses
3. Peso en kg
4. Talla en m

Debido a que la edad es una variable potencialmente confusora que podría darnos un sesgo diferencial se parearan ambos grupos por edad, la variación permitida será de 6 meses.

Definición de variables

Resección quirúrgica de timo

Definición conceptual.- Resección quirúrgica del timo durante la corrección de la cardiopatía de base.

Definición operacional.- Resección quirúrgica del timo durante la corrección de la cardiopatía de base, evidenciado por escrito en la hoja quirúrgica.

Tipo de variable.- Cualitativa, nominal, dicotómica.

Escala de Medición.- Resección quirúrgica de timo, presencia de timo.

Temporalidad de las mediciones.-Al ingreso al estudio. 1 medición.

Responsable de las mediciones.- El investigador responsable del proyecto será el encargado de analizar la hoja quirúrgica de pacientes sometidos a corrección de cardiopatía para constatar la resección quirúrgica o no de dicho órgano.

Función linfocitaria

Definición conceptual.- Evidencia de la capacidad de linfocitos T para presentar respuestas ante un estímulo.

Definición operacional.- Evidencia de la capacidad de linfocitos T para presentar respuestas ante un estímulo. Estará determinada por 2 pruebas:

- a) Porcentaje de proliferación linfocitaria bajo estimulación con fitohemaglutinina
- b) Número de emigrantes tímicos tempranos

Nota: Cada una de las pruebas se medirá de forma independiente y cada una se analizará por separado.

a) Porcentaje de proliferación linfocitaria bajo estimulación con fitohemaglutinina

Definición conceptual y operacional.- Porcentaje de células CD3+ que proliferaron antes y después del estímulo con fitohemaglutinina respecto a un individuo de la misma edad y sexo.

Tipo de variable.- Cuantitativa, continua.

Escala de Medición.- Porcentaje de células CD3

Temporalidad de las mediciones.- Al ingreso al estudio. 1 medición.

Responsable de las mediciones.-El investigador responsable del proyecto será el encargado de realizar el procesamiento de la muestra así como la medición del

resultado junto con la Doctora Guillermina Baay adscrita a la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas, HIMFG.

Valores de normalidad: Se considera normal un porcentaje de células CD3% que proliferaron al menos 50% respecto al control (de la prueba). Nosotros usaremos los datos de forma cuantitativa continua, comparando los grupos no en relación al nivel de normalidad si no a la diferencia entre ambos grupos.

b) Círculos de escisión del receptor de Linfocito T

Definición conceptual y operacional.- Círculos de escisión del receptor de Linfocito T por microlitro de sangre periférica detectados por PCR

Tipo de variable.- Cuantitativa, continua.

Escala de Medición.- Número de células por microlitro

Temporalidad de las mediciones.- Al ingreso al estudio. 1 medición.

Responsable de las mediciones.- El investigador responsable del proyecto será el encargado de realizar el procesamiento de la muestra así como la medición del resultado junto con el Químico Edgar Alejandro Medina-Torres adscrito a la Unidad de Investigación en Inmunodeficiencias. INP

Valores de normalidad.- Se considera el punto de corte por arroga de 25 TRECs por microlitro. Nosotros usaremos los datos de forma cuantitativa continua, comparando los grupos no en relación al nivel de normalidad si no a la diferencia entre ambos grupos.

Número de subpoblaciones linfocitarias

Definición conceptual y operacional.- Estará determinada por 3 variables:

- a) Número de linfocitos T CD3+
- b) Número de linfocitos T CD4+
- c) Número de linfocitos T CD8+

Nota: Cada una de las variables que conforman las subpoblaciones linfocitarias se medirá de forma independiente y cada una se analizará por separado.

a) Número de linfocitos T CD3+

Definición conceptual y operacional.- Número total de células en sangre periférica que expresan el marcador CD3+

Tipo de variable.- Cuantitativa, discreta

Escala de Medición.- Número de células/ \square L

Temporalidad de las mediciones.- Al ingreso al estudio. 1 medición.

Responsable de las mediciones.- El investigador responsable del proyecto será el encargado de realizar el procesamiento de la muestra así como la medición del resultado junto con la Química Q.F.B. Noemí Nájera Martínez adscrito al Laboratorio Central del HIMFG.

b) Número de linfocitos T CD4+

Definición conceptual y operacional.- Número total de células en sangre periférica que expresan el marcador CD4+

Tipo de variable.- Cuantitativa, discreta

Escala de Medición.- Número de células/ \square L

Temporalidad de las mediciones.- Al ingreso al estudio. 1 medición.

Responsable de las mediciones.- El investigador responsable del proyecto será el encargado de realizar el procesamiento de la muestra así como la medición del resultado junto con la Química Q.F.B. Noemí Nájera Martínez adscrito al Laboratorio Central del HIMFG.

c) Número de linfocitos T CD8+

Definición conceptual y operacional.- Número total de células en sangre periférica que expresan el marcador CD8+

Tipo de variable.- Cuantitativa, discreta

Escala de Medición.- Número de células/ \square L

Temporalidad de las mediciones.- Al ingreso al estudio. 1 medición.

Responsable de las mediciones.- El investigador responsable del proyecto será el encargado de realizar el procesamiento de la muestra así como la medición del resultado junto con la Química Q.F.B. Noemí Nájera Martínez adscrito al Laboratorio Central del HIMFG.

Variables confusoras

Tiempo desde la resección del timo

Definición conceptual y operacional.- Número de meses transcurridos desde la resección del timo por reparación quirúrgica de la cardiopatía de base.

Tipo de variable.- Cuantitativa discreta

Escala de Medición.- Meses

Temporalidad de las mediciones.-Al ingreso al estudio. 1 medición.

Responsable de las mediciones.- El investigador responsable del proyecto será el encargado de obtener estos datos en el expediente clínico.

RESULTADOS

Se incluyeron un total de 69 pacientes, 38 pertenecientes al grupo de cardiópatas sin timo representando un porcentaje de 55,1% (IC 95% 43.3-66.2) y 31 al grupo de sanos representando un porcentaje de 44.9% (IC 95% 33.7-56.6), los cuales fueron pareados por edad. Las características de género, mediana de peso y de talla se presentan en la tabla 2, de acuerdo al grupo.

Tabla 2. Características de los pacientes por grupo

Grupo	Género % (IC 95%)	Mediana de peso (kg)	p (U de Mann- Whitney) para peso	Mediana de talla (cm)	p (U de Mann- Withney) para talla
Cardiópata sin timo	Hombres: 55.2% (39.7 – 69.8) Mujeres: 44.7% (30.1 – 60.2)	18.2	0.01	112.5	0.041

Sanos	Hombres: 54.8% (37.7- 70.8)	32.0	0.01	133.0	0.041
	Mujeres: 45.1% (29.1 – 62.2%)				

En esta se puede observar que hay una diferencia en el peso entre cardiopatas y sanos favoreciendo a los sanos en peso.

A cada individuo se le percentiló de acuerdo a las tablas de percentiles de estatura y peso para la edad del centro para el control y prevención de enfermedades (CDC por sus siglas en inglés). La p al realizar U de Mann Whitney fue significativa, es decir, se encontró una diferencia entre el peso y la talla de los sanos y la de los cardiopatas. Sin embargo para talla se encontró que si hay menor talla en los cardiopatas ($p=0.075$), pero cuando están comparados contra sus propias percentilas no hay una diferencia entre ambos grupos.

En cuanto a los valores de biometría hemática, la media de leucocitos en el grupo cardiopatía sin timo fue de $7.5 \times 10^3 \pm 3.2$. Para los neutrófilos fue de $3.7 \times 10^3 \pm 2.0$ y para linfocitos $2.9 \times 10^3 \pm 2.1$; para monocitos $0.55 \times 10^3 \pm 0.54$, para eosinófilos $0.22 \times 10^3 \pm 0.25$ y para basófilos $0.02 \times 10^3 \pm 0.2$. En el grupo de los pacientes sanos la media de los leucocitos fue de $8.6 \times 10^3 \pm 0.89$, para los neutrófilos fue de $4.2 \times 10^3 \pm 0.32$, para linfocitos $3.8 \times 10^3 \pm 1.1$, para monocitos $0.42 \times 10^3 \pm 0.05$; para eosinófilos $0.22 \times 10^3 \pm 0.04$ y para basófilos $0.05 \times 10^3 \pm 0$. Al realizar el análisis para ver si hubo diferencias entre los grupos se obtuvo valores de p significativos en leucocitos, linfocitos y monocitos ($p=0.27$, 0.007 y 0.005 respectivamente) siendo mayores en los pacientes sanos.

La media de los valores de niveles séricos de inmunoglobulinas se muestra en la siguiente tabla. No hubo diferencia significativa entre ambos grupos ($p=1.0$, 1.0 , 0.82 y 0.62 para IgA, IgM, IgG e IgE respectivamente).

Tabla 3. Media de niveles de inmunoglobulinas séricas por grupo

Grupo	Media			
	IgA (mg/dl)	IgM (mg/dl)	IgG (mg/dl)	IgE (IU/ml)
Cardiópatas sin timo	147.0	122.0	1122.0	89.3
Sanos	155.2	117.2	1080.1	127.3

En cuanto a los valores de TRECs la media en el grupo de cardiópatas sin timo fue de 11.9 ± 7.3 , en el grupo de los sanos 13.2 ± 8.8 .

Además de que las medias de ambos grupos fueron diferentes, teniendo una disminución del 10% con respecto al grupo de pacientes sanos, llamó la atención que sólo 2 pacientes en el grupo de cardiopatía sin timo tuvieron niveles de TRECs normales.

Tabla 4. Cantidad de TRECs por grupo.

Grupo	Media
Cardiópatas sin timo	11.9 ± 7.3
Sanos	13.2 ± 8.8

DISCUSIÓN.

El timo es el principal sitio de la linfopoyesis de células T durante la vida fetal y en el posnatal temprano. Los estudios de timos de pacientes con deficiencias inmunológicas han conducido a una comprensión de la base molecular y genética de muchas inmunodeficiencias, que apunta a la importancia del timo en el desarrollo de las células T.

64

Debido a la involución del timo, se ha sugerido que el timo adulto no contribuye a la nueva reemplazo de células T. Sin embargo datos posteriores indicaron que el timo contribuye a las células T nuevas, incluso en la edad adulta.^{65, 66}

Por lo tanto, es muy probable que una disminución de la timopoyesis conducirá a una deficiencia duradera en la capacidad del huésped para generar nuevas células T. No hay marcadores fenotípicos que distinguen entre los últimos emigrantes tímicos del resto del

pool periférico de células T vírgenes. La evaluación de las frecuencias de TREC en las células T periféricas puede ser un indicador útil de la de novo producción de linfocitos T.

En los niños, los estudios que utilizan TRECs se han realizado en pacientes con enfermedades de inmunodeficiencia primaria y secundaria incluyendo lactantes y niños infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).⁶⁷

Los pacientes con ausencia del timo, tales como en la enfermedad de inmunodeficiencia combinada severa o en completa síndrome de Di George tienen TRECs muy bajos. En pacientes infectados por el VIH, los TRECs en linfocitos de sangre periférica estuvieron disminuidos en comparación con los lactantes expuestos al VIH, no infectados; después del tratamiento los niveles de TREC aumentaron a los niveles actuales en los lactantes expuestos al VIH, no infectados.^{68, 69}

En un estudio del 2005, los TRECs se redujeron notablemente en los pacientes después de muchos años timectomía en la infancia, al mismo tiempo que disminuye en total las células T y las células T CD4 fenotípicamente vírgenes⁵⁰

En el presente estudio los niveles de TREC disminuyeron significativamente en el grupo de los pacientes cardiopatas sometidos a timectomía, llamado la atención que sólo dos pacientes de éste grupo tuvieron niveles de TRECs normales.

Los valores de TRECs disminuidos visto en estos pacientes son probablemente debido a varias razones, incluyendo la disminución de la producción del timo. En general los valores de TREC en el grupo de pacientes sin timectomía fueron superiores a los pacientes que tenían timo (sanos). La probabilidad de una verdadera disminución en TRECs resultante de la disminución de la timopoyesis se ve reforzada por la observación de que incluso los pacientes examinados durante periodos de hasta seis años después de la timectomía total tuvieron TRECs más bajos que los pacientes que no tenían la timectomía.

En el estudio publicado de Halnon et al.⁵⁰, los pacientes sin timo residual tuvieron TRECs significativamente más bajos que los que tienen timectomía parcial. Se desconoce si la disminución de TREC en pacientes con eliminación parcial o completa del timo también conduce a una deficiencia en las células T reguladoras derivadas del timo. La timectomía parcial en la infancia y la disminución de los TRECs no pareció influir negativamente en la función inmune, ya que no había enfermedades autoinmunes conocidas en la población de estudio durante un seguimiento a corto plazo. Presumiblemente, un mínimo de tejido del timo residual post-parcial timectomía es suficiente para la función inmune.

Nuestros datos proporcionan evidencia de que la cirugía cardiotorácica y timectomía en la primera infancia produce cambios significativos y perdurables en el número de linfocitos T de sangre periférica que son consistentes con la pérdida de timopoyesis en curso.

En el estudio de Storek et al.⁵⁸ encontraron una tendencia hacia una menor cantidad de TRECs en las células T CD4+ y significativamente menor TRECs en células T CD8+ en comparación con los valores normales. Ya que los niveles de TREC no eran cero (especialmente entre las células CD4), especularon que la timectomía fue incompleta, que las células T se pueden generar de novo en los sitios extratímicos, o que los TREC que se generaron antes de la timectomía pueden persistir durante décadas, lo cual puede aplicar a nuestros resultados. Por el contrario, en otro estudio⁶³ los TREC fueron indetectables en muchos sujetos sin evidencia anatómica de timo residual. Por lo tanto, nos encontramos con evidencia de la generación extratímica de células T. En nuestro estudio, los individuos sin evidencia de tejido del timo tuvieron más probabilidades de tener niveles indetectables de TREC en la sangre periférica, mientras que aquellos con timo presente tuvieron mayores niveles de TRECs, a menudo cerca de lo normal, lo que indica que la eliminación total puede derogar su actividad. Sólo dos sujetos del grupo cardiopatas sin timo tuvieron niveles de TRECs normales, consistentes con la hipótesis de que se correlaciona con la cantidad de TRECs con la presencia o no de timo, y que sería mayor en los pacientes sanos. Nuestros datos indican que la extirpación del timo durante los procedimientos quirúrgicos cardiotorácicos en pacientes pediátricos puede resultar en la reducción a largo plazo de nueva producción de células T como se evidencia por la reducción en los niveles de TRECs.

Estas observaciones sugieren que los estudios descritos hasta ahora pueden subestimar el impacto de la timectomía en la primera infancia. Una investigación exhaustiva para evaluar las consecuencias clínicas (por ejemplo el número de infecciones) de esta práctica sería valioso, así como una cohorte para estudiar la función linfocitaria de los sujetos antes y después de la cirugía.

CONCLUSIÓN.

La función linfocitaria medida mediante los círculos de escisión del receptor de Linfocito T, TRECs, fue 10% mayor en pacientes sanos (con timo) Vs sin timo por resección quirúrgica.

LIMITACIONES DEL ESTUDIO.

Dada la naturaleza transversal del estudio, los resultados sólo demuestran lo que ocurre en el momento de las mediciones correspondientes a la valoración, por lo que sólo podremos establecer asociaciones entre las variables de estudio sin poder establecer causalidad.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.



Fecha de inicio: marzo 2015	MES												
mes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	ACTIVIDAD												
Revisión y actualización de literatura													
Recolección de muestra													
Procesamiento de muestra													
Análisis de resultados													
Descripción de resultados													
Reporte de resultados													
Entrega de tesis													

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

1. Jacobs MT, Frush DP, Donnetty LF. The right place at the wrong time: historical perspective of the thymus gland and pediatric radiology. *Radiology*. 1999;210:11-6.
2. Nishino M, Ashiku SK, Kocher ON, Thurer RL, Boiselle PM, Hatabu H. The thymus: a comprehensive review. *Radiographics*. 2006;26:335-48.
3. Miller J. Immunological function of the thymus. *Lancet*. 1961; 2:7489.
4. Boehm T, Bleul CC. The evolutionary history of lymphoid organs. *Nat Immunol*. 2007;8:131-5.
5. Blackburn CC, Manley NR. Developing a new paradigm for thymus organogénesis. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:278-89.
6. Ribatti D, Crivettato E, Vacca A. Miller's seminal studies on the role of thymus in immunity. *Clin Exp Immunol*. 2006; 144:371-5.
7. Anderson G, Jenkinson WE, Jones T, Parnell SM, Kinsella FA., White AJ et al. Establishment and functioning of intrathymic microenvironments. *Immunol Rev*. 2006;209:10-27.
8. Itoi M, Tsukamoto N, Yoshida H, Amagai T. Mesenchymal cells are required for functional development of thymic epithelial cells. *Int Immunol*. 2007;19:953-64
9. Abul K. Abbas. *Inmunología celular y molecular*. 8a. edición. España: Elsevier Saunders; 2015.
10. Rabiola E. Timo. En: Fawcett DW. *Tratado de Histología*. 12 ed. Nueva York: Interamericana- McGraw Hill; 1995.p.479-93.
11. Guyton AC, Hay JE. *Tratado de Fisiología Médica*. t2. Madrid: Interamericana-Mc Graw Hill; 1996. p.487-98.
12. Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol* 2014;14:377–391.

13. Hazenberg MD, Verschuren MC, Hamann D, Miedema F, van Dongen JJ. T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *J Mol Med (Berl)*. 2001;79:631–40.
14. Gerstel-Thompson JL, Wilkey JF, Baptiste JC, Navas JS, Pai SY, Pass KA, et al. High-throughput multiplexed T-cell-receptor excision circle quantitative PCR assay with internal controls for detection of severe combined immunodeficiency in population-based newborn screening. *Clin Chem*. 2010;56:1466–74.
15. Aster J, Kumar V. Leucocitos, ganglios linfáticos, bazo y timo. En: Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins. *Patología estructural y funcional*. 6ta.ed. Madrid: Mc GrawHill-Interamericana; 2000.p.675-726.
16. Bannister LH. Timo. En: Williams PL. *Anatomía de Gray: bases anatómicas de la medicina y cirugía*. 38.ed. Madrid: Harcourt; 1998. p.1423-31.
17. Sano S, et al. Stat3 in thymic epithelial cells is essential for postnatal maintenance of thymic architecture and thymocyte survival. *Immunity* 2001;15:261–273.
18. Chaudhry MS1, et al. Thymus: the next (re)generation. *Immunol Rev*. 2016 May;271(1):56-71.
19. Ashwell JD, Lu FW, Vacchio MS. Glucocorticoids in T cell development and function*. *Annu Rev Immunol* 2000;18:309–345.
20. Piña C., et al. Thymus' gland. Clinical, morphological and functional aspects. *Revista Electrónica de las Ciencias Médicas en Cienfuegos. Medisur* 2004; 2(3).
21. Olsen NJ, Olson G, Viselli SM, Gu X, Kovacs WJ. Androgen receptors in thymic epithelium modulate thymus size and thymocyte development. *Endocrinology* 2001;142:1278– 1283.
22. Savino W. The thymus is a common target organ in infectious diseases. *PLoS Pathog* 2006;2:e62.
23. Nunes-Alves C, Nobrega C, Behar SM, Correia- Neves M. Tolerance has its limits: how the thymus copes with infection. *Trends Immunol* 2013;34:502–510.

24. Coder BD, Wang H, Ruan L, Su D-M. Thymic involution perturbs negative selection leading to autoreactive T cells that induce chronic inflammation. *J Immunol* 2015;194:5825–5837
25. Appay V, Sauce D, Prelog M. The role of the thymus in immunosenescence: lessons from the study of thymectomized individuals. *AGING* 2010;2:278-81.
26. Caruso C, Buffa S, Cardore G, Colonna-Romano G, Dunn-Walters D, Kipling D, et al. Mechanisms of immunosenescence. *Immun Ageing* 2009;6:10-4.
27. Palmer DB. The effect of age on thymic function. *Front Immunol* 2013;4:1–6.
28. Sansoni P, Vescovini R, Fagnoni F, Biasini C, Zanni F, Telera A, et al. The immune system in extreme longevity. *Experimental Gerontology* 2008;43:61-5.
29. Aw D, Silva AB, Palmer DB. Is thymocyte development functional in the aged? *Aging (Albany NY)* 2009;1:146–153.
30. Fang RHT, Colantonio AD, Uittenbogaart CH. The role of the thymus in HIV infection: a 10 year perspective. *AIDS* 2008;22:171–184.
31. Schmitt N, et al. Differential susceptibility of human thymic dendritic cell subsets to X4 and R5 HIV-1 infection. *AIDS* 2006;20:533–542.
32. Lynch HE, Goldberg GL, Chidgey A, van den Brink MRM, Boyd R, Sempowski GD. Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol* 2009;30:366–373.
33. Paes-Silva R, Correia de Macedo EM, Oliveira Tomiya MT, Machado Barbosa de Castro CM. Immune response of severe malnutrition children treated according to the protocol of the world health organization. *Nutr hosp.* 2015 aug 1;32(2):638-44.
34. Hoffman JI, Kaplan S. The incidence of congenital heart disease. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:1890–900.
35. Gennery AR. Immunological aspects of 22q11.2 deletion syndrome. *Cell Mol Life Sci* 2012 Jan;69(1):17-27.

36. Gui J, Zhu X, Dohkan J, Cheng L, Barnes PF, Su D-M. The aged thymus shows normal recruitment of lymphohematopoietic progenitors but has defects in thymic epithelial cells. *Int Immunol* 2007;19:1201–1211.
37. De Rosa SC, Herzenberg LA, Herzenberg LA, Roederer M 2001 11-color, 13-parameter flow cytometry: identification of human naïve T cells by phenotype, function, and T-cell receptor diversity. *Nat Med* 7:245–248
38. Douek DC, Vescio RA, Betts MR, Brenchley JM, Hill BJ, Zhang L, Berenson JR, Collins RH, Koup RA 2000 Assessment of thymic output in adults after haematopoietic stem-cell transplantation and prediction of T-cell reconstitution. *Lancet* 355:1875–1881
39. Douek DC, McFarland RD, Keiser PH, Gage EA, Massey JM, Haynes BF, Polis MA, Haase AT, Feinberg MB, Sullivan JL, Jamieson BD, Zack JA, Picker LJ, Koup RA 1998 Changes in thymic function with age and during the treatment of HIV infection. *Nature* 396:690–695
40. Kong F, Chen CH, Cooper MD 1998 Thymic function can be accurately monitored by the level of recent T cell emigrants in the circulation. *Immunity* 8:97–104
41. Steffens CM, Al-Harhi L, Shott S, Yogev R, Landay A 2000 Evaluation of thymopoiesis using T cell receptor excision circles (TRECs): differential correlation between adult and pediatric TRECs and naïve phenotypes. *Clin Immunol* 97:95–101
42. Ye P, Kirschner DE 2002 Reevaluation of T cell receptor excision circles as a measure of human recent thymic emigrants. *J Immunol* 169:4968–4979
43. Haynes BF, Hale LP, Weinhold KJ, Patel DD, Liao H, Bressler PB, Jones DM, Demarest JF, Gebhard-Mitchell K, Haase AT, Bartlett JA 1999 Analysis of the adult thymus in reconstitution of T lymphocytes in HIV-1 infection. *J Clin Invest* 103:453–460
44. Haynes BF, Markert ML, Sempowski GD, Patel DD, Hale LP 2000 The role of the thymus in immune reconstitution in aging, bone marrow, transplantation, and HIV-1 infection. *Annu Rev Immunol* 18:529–560

45. Heitger A, Neu N, Kern H, Panzer-Grumayer ER, Greinix H, Nachbaur D, Niederwieser D, Fink FM 1997 Essential role of the thymus to reconstitute naïve (CD45RA⁺) T-helper cells after human allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 90:850–857
46. Mackall CL, Hakim FT, Gress RE 1997 T-cell regeneration: all repertoires are not created equal. *Immunol Today* 18:245–251
47. Zhang L, Lewin SR, Markowitz M, Lin HH, Skulsky E, Karanicolos R, He Y, Jin X, Tuttleton S, Vesanen M, Spiegel H, Kost R, van Lunzen J, Stellbrink H, Wolinsky S, Borokowsky W, Palumbo P, Kostrikis LG, Ho DD 1999 Measuring recent thymic emigrants in blood of normal and HIV-1 infected individuals before and after effective therapy. *J Exp Med* 190:725–732
48. Turan T, Turan M, Arslan C, Kinoglu B, Sarioglu T. How does neonatal thymectomy affect the immune system? *Acta Cardiologica*. 2004;59:511–3.
49. Wells WJ, Parkman R, Smogorzewska E, Barr M. Neonatal thymectomy: does it affect immune function? *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1998;115:1041–6.
50. Halnon NJ, Jamieson B, Plunkett M, Kitchen CM, Pham T, Hrogstad P. Thymic function and impaired maintenance of peripheral T cell populations in children with congenital heart disease and surgical thymectomy. *Pediatric Res*. 2005;57:42–8.
51. Mancebo E, Clemente J, Sánchez J, Ruiz-Contreras J, de Pablos P, Cortezón S, et al. Longitudinal analysis of immune function in the first 3 years of life in thymectomized neonates during cardiac surgery. *Clin Exp Immunol*. 2008;154:275–383.
52. Madhok AB, Chandrasekran A, Parnell V, Gandhi M, Chowdhury D, Pahwa S. Levels of recent thymic emigrant cells decrease in children undergoing partial thymectomy during cardiac surgery. *Clin Diagn Lab Immunol*. 2005; 12:563–5.
53. Ogle BM, West LJ, Driscoll DJ, Strome SE, Razonable RR, Paya CV, et al. Effacing of the T cell compartment by cardiac transplantation in infancy. *J Immunol*. 2006;176:1962–7.

54. Van Gent R, Schadenberg AWL, Otto SA, Nievelstein RAJ, Sieswerda GT, Haas F, et al. Long-term restoration of the human T cell compartment after thymectomy during infancy: a role for thymic regeneration? *Blood*. 2011;118:627–34.
55. Prelog M, Keller M, Geiger R, Brandstätter A, Würzner R, Schweigmann U, et al. Thymectomy in early childhood: significant alterations of the CD4(+)CD45RA(+)CD62L(+) T cell compartment in later life. *Clin Immunol*. 2009;130:123–32.
56. Eystendottir JH, Freysdottir J, Haraldsson A, Stefansdottir J, Skaftadottir I, Helgason H, et al. The influence of partial or total thymectomy during open heart surgery in infants on the immune function later on life. *Clin Exp Immunol*. 2004;136:349–55.
57. Sauce D, Larsen M, Fastenackels S, Duperrier A, Keller M, Grubeck-Loebenstein B, et al. Evidence of premature immune aging in patients thymectomized during early childhood. *J Clin Invest*. 2009;119:370–8.
58. Storek J, Douek DC, Keesey JC, Boehmer L, Storer B, Maloney DG 2003 Low T cell receptor excision circle levels in patients thymectomized 25–54 years ago. *Immunol Lett* 89:91–92
59. Wells WJ, Parkman R, Smogorzewska E, Barr M 1998 Neonatal thymectomy: does it effect immune function? *J Thorac Cardiovasc Surg* 115:1041–1046
60. Gennery AR, Barge D, Spickett GP, Cant AJ 2001 Lymphocyte subset populations in children with polysaccharide antibody deficiency following cardiac transplantation. *J Clin Immunol* 21:37–42
61. Ramos SB, Garcia AB, Viana SR, Voltarelli JC, Falcao RP 1996 Phenotypic and functional evaluation of natural killer cells in thymectomized children. *Clin Immunol Immunopathol* 81:277–281.
62. Gennery AR, Barge D, Spickett GP, Cant AJ 2001 Lymphocyte subset populations in children with polysaccharide antibody deficiency following cardiac transplantation. *J Clin Immunol* 21:37–42

63. Halnon NJ, Jamieson B, Plunkett M, Kitchen CM, Pham T, Krogstad P. Thymic function and impaired maintenance of peripheral T cell populations in children with congenital heart disease and surgical thymectomy. *Pediatr Res.* 2005 Jan;57(1):42-8.
64. Roifman, C. M. 2005. Studies of patients' thymic aid in the discovery and characterization of immunodeficiency in humans. *Immunol. Rev.* 203:143– 155.
65. Fry, T. J., and C. L. Mackall. 2002. Current concepts of thymic aging. *Springer Semin. Immunopathol.* 24:7–22.
66. Douek DC, Koup RA. Evidence for thymic function in the elderly. *Vaccine* 2000;18:1638–1641.
67. Chavan, S., B. Bennuri, M. Kharbanda, A. Chandrasekaran, S. Bakshi, and S. Pahwa. 2001. Evaluation of T-cell receptor gene rearrangement excision circles after antiretroviral therapy in children infected with human immunodeficiency virus. *J. Infect. Dis.* 183:1445–1454.
68. Markert, M. L., et al. 2004. Complete DiGeorge syndrome: development of rash, lymphadenopathy, and oligoclonal T cells in 5 cases. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113:734–741.
69. Patel, D. D., M. E. Gooding, R. E. Parrott, K. M. Curtis, B. F. Haynes, and R. H. Buckley. 2000. Thymic function after hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency. *N. Engl. J. Med.* 342:1325–1332.

ANEXOS.

ANEXO 1. Valores de normalidad de Subpoblaciones linfocitarias

Tabla 5. Valores de normalidad. Linfocitos T CD3+			
0-1 mes	2-6 meses	7-24 meses	3-5 años
55-82%	55-82%	55-82%	65-84%
3,000-5,000cel/ μ L	3,000-5,000cel/ μ L	3,000-5,000cel/ μ L	1,200-4,100cel/ μ L
6-10 años	11-15 años	Femenino más de 16 años	Masculino más de 16 años
65-84%	65-84%	59-85%	59-85%
1,200-4,100cel/ μ L	1,200-4,100cel/ μ L	770-4,000cel/ μ L	770-4,000cel/ μ L

Tabla 6. Valores de normalidad. Linfocitos T CD3+ CD4+			
0-1 mes	2-6 meses	7-24 meses	3-5 años
50-57%	50-57%	50-57%	27-57%
2,800-3,900cel/μL	2,800-3,900cel/μL	2,000-4,000cel/μL	560-2,700cel/μL
6-10 años	11-15 años	Femenino más de 16 años	Masculino más de 16 años
27-57%	42-58%	42-58%	42-58%
560-2,700cel/μL	560-2,700cel/μL	546-2,900cel/μL	546-2,900cel/μL

Tabla 7. Valores de normalidad. Linfocitos T CD3+ CD8+			
0-1 mes	2-6 meses	7-24 meses	3-5 años
8-31%	8-31%	8-31%	14-34%
350-2,500cel/μL	350-2,200cel/μL	350-2,200cel/μL	330-2,200cel/μL
6-10 años	11-15 años	Femenino más de 16 años	Masculino más de 16 años
14-34%	14-34%	17-33%	17-33%
330-1,800cel/μL	330-1,800cel/μL	220-1,650cel/μL	220-1,650cel/μL

ANEXO 2. Hoja de recolección de datos pacientes a incluir en el estudio

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Médico que llena los datos _____ Fecha _____

1. NOMBRE: : _____
 1. Resección quirúrgica del timo
 - i. Si _____
 - ii. Control _____
 2. Dirección _____

 3. Cardiopatía
 - i. Si _____
 - ii. No _____
 - iii. Tipo de
Cardiopatía _____
 4. Operado
 - i. Si _____ iii. Fecha
Qx _____
 - ii. No _____
 5. Hoja
quirúrgica _____
2. REGISTRO: _____
3. TELÉFONO 1 _____
4. TELÉFONO 2 _____
5. Edad en meses: _____
6. Fecha de nacimiento _____
7. Fecha de hoy _____
8. Peso a la inclusión _____
9. Talla a la inclusión _____
10. IMC a la inclusión _____
11. Informante:
 1. PADRE _____
 2. MADRE _____
 3. OTRO _____

ANEXO 3. TECNICA PARA LA IDENTIFICACION Y RECIENTOS ABSOLUTOS DE LINFOCITOS HUMANOS T (CD3⁺), (CD3⁺CD4⁺) Y (CD3⁺CD8⁺) EN SANGRE TOTAL.

A partir de una muestra de 1 mL recolectada en tubo anticoagulado con EDTA se realizará el siguiente procedimiento: el reactivo MultiTEST CD3 conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC), CD8 conjugado a ficoeritrina (PE), CD45 conjugado a la proteína peridín clorofila (PerCP) y CD4 conjugado a alofocianina (APC) es un reactivo de inmunofluorescencia directa de cuatro colores para usarlo con un citómetro de flujo debidamente equipado para la identificación y determinación de los porcentajes y recuentos absolutos de linfocitos humanos T maduros (CD3), y las sub-poblaciones de linfocitos T supresores/citotoxicos (CD3⁺CD8⁺) y de colaboradores/inductores (CD3⁺/CD4⁺) en sangre entera con los eritrocitos lisados. Se utiliza con los tubos TruCOUNT los recuentos absolutos de estas poblaciones y se pueden enumerar en un solo tubo.

Material y reactivos

1. Reactivo: MultiTEST CD3 FITC, CD8 PE, CD45 PerCP, CD4 AP (BD No. de catálogo 340491)
2. Solución lisante FACS (1X)
3. Tubos VACUTAINER K3 EDTA para recolección de sangre
4. Agitador VORTEX
5. Micropipeta con puntas
6. Líquido de revestimiento (FACSFlow BD), No de catálogo 340398
Controles TruCOUNT (BD No de catálogo 340335)
7. Citómetro de flujo: Modelo FacsCalibur 4 colores de Becton Dickinson. C

Técnica de tinción

- 1) Para cada muestra de paciente (1 mL de sangre completa), se debe rotular un tubo de TruCOUNT (se debe verificar que el sedimento de microesferas del TruCOUNT este intacto y dentro del retenedor metálico al fondo del tubo)
- 2) Pipetear 20 µL del reactivo TriTEST CD3/CD8/CD45/CD4 al fondo del tubo.
- 3) Pipetear 50µL de sangre entera anticoagulada bien mezclada al fondo del tubo.
NOTA: Se debe evitar que la sangre descienda por las paredes del tubo. Si se queda sangre entera en las paredes del tubo, no se teñirá con el reactivo.
- 4) Tapar el tubo y agitarlo suavemente en el Vortex para que se mezcle. Incubar durante 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente (20° a 25°C)

- 5) Agregar 450 μL de solución lisante FACS 1x al tubo.
- 6) Tapar el tubo y agitarlo suavemente en el Vortex para que se mezcle. Incubar por 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente (20° a 25°C). La muestra está lista para ser analizada en el citómetro de flujo.

TÉCNICA DE SEPARACIÓN DE LAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (CMSP)

La separación de las CMSP se realizará con gradiente de densidad de la siguiente manera:

1. Se diluirá la sangre total (5 ml) con PBS en una dilución 1:1. En un tubo falcon de 50 ml se colocará el mismo volumen de linfoprep y con pipeta paster se pasará la sangre previamente diluida.
2. El tubo falcon se centrifugará a 1800 RPM durante 30 min.
3. Después de centrifugar se aspirarán las CMSP con pipeta Pasteur gentilmente y se colocará en un tubo cónico de 15 ml con tapa.
4. Se agregará PBS al tubo hasta aforar a 15 ml, se mezclará gentilmente.
5. Se centrifugará nuevamente a 1500 RPM por 15 minutos, se decantará el sobrenadante.
6. Se re-suspenderá el botón celular agitando suavemente en vortex.
7. Se adicionarán PBS hasta aforar a 10 ml y se mezclará suavemente.
8. Se centrifugará a 1500 RPM por 10 min y se decantará el sobrenadante.
9. Se re-suspenderá el botón celular agitando suavemente en vortex y se adicionará RPMI hasta aforar a 1 ml.
10. Se procederá a realizar cuenta celular y corroborar viabilidad con cámara de Neubauer y tinción con azul triptano.

CULTIVO DE CMSP PARA REALIZAR MEDICIÓN DE LINFOPROLIFERACIÓN CON CARBOXIFLUORESCÉINA

1. A las CMSP se agregarán 2 μL de carboxifluoresceína y se incubarán durante 10 min a 37°C en oscuridad con agitación en vortex cada dos minutos.
2. Una vez terminado el tiempo de incubación se agregarán 10 ml de PBS al tubo hasta aforar a 15 ml, se mezclará gentilmente.

3. Se centrifugará nuevamente a 1500 RPM por 15 minutos, se decantará el sobrenadante.
4. Se re-suspenderá el botón celular agitando suavemente en vortex.
5. Se adicionarán PBS hasta aforar a 10 ml y se mezclará suavemente.
6. Se centrifugará a 1500 RPM por 10 min y se decantará el sobrenadante.
7. Se re-suspenderá el botón celular agitando suavemente en vortex y se adicionará RPMI hasta aforar a 1 ml.
8. En placas de cultivo de 96 pozos con fondo plano se prepararán pozos con 2.5×10^5 CMSP más AIMV hasta un volumen final de 200 μ L por pozo. Se agregará a cada pozo uno de los siguientes estímulos: fitohemaglutinina 10 μ g/mL, y un pozo sin estimular como control negativo.
9. Las placas se incubarán a 37°C y en una atmósfera de CO₂ al 5% durante 72 hrs.
10. Al finalizar del tiempo de incubación se homogenizará el contenido de cada pozo, mismo que se depositará en un tubo falcon de 5 ml por cada pozo, y se centrifugará a 1500 RPM durante 5 min, posterior a lo cual el sobrenadante se decantará y el botón celular se resuspenderá y se agregarán 250 μ L de PBS + 1% de paraformaldehído y se mantendrá a 4° C hasta su lectura en citómetro de flujo FACS aria (marca BD) en las primeras 24 hrs.

ANEXO 4. CUANTIFICACIÓN DE CÍRCULOS DE ESCISIÓN DEL RECEPTOR DE LINFOCITOS T (TRECS) POR PCR EN TIEMPO REAL.

Purificación de DNA.

- La muestra de 5 ml de sangre con EDTA se centrifuga a 3000 rpm durante 20 minutos.
- Se colecta la capa de leucocitos con ayuda de una pipeta pasteur y se colecta en un tubo de fondo cónico de 15 ml nuevo.
- Se agregan 6 ml de la disolución para lisar eritrocitos y se agita vigorosamente en un agitador vortex durante 2 minutos.
- Terminada la agitación se centrifuga el tubo durante 10 min a 3500 rpm.

- Se elimina el sobrenadante y se agregan 500 μ L de la disolución para lisar eritrocitos se agita en vortex hasta resuspender el botón de células.
- Se agregan 3 mL de disolución de lisis de leucocitos y 20 μ L de proteinasa K (10mg/mL), se agita vigorosamente en agitador vortex durante 1 minuto y se deja incubar durante 2 horas a 55 °C.
- Agregar 1 mL de disolución para precipitar proteínas agitar por inversión durante 20 segundos el tubo e incubar en el congelador durante 10 minutos.
- Concluída la incubación centrifugar el tubo a 3500 rpm durante 10 minutos y colectar el sobrenadante y colocarlo en un tubo de fondo cónico de 15 mL nuevo y limpio.
- Precipitar el DNA agregando isopropanol al 100% en una relación 1:1.
- Agitar por inversión el tubo hasta que se observen la fibras del DNA y centrifugar durante 5 minutos a 3500 rpm.
- Decantar el sobrenadante y dejar secar el DNA a temperatura ambiente durante 10 minutos.
- Para lavar el DNA agregar 1,4 mL de etanol al 70% y trasladar el DNA a un tubo para microcentrífuga de 1,5 mL nuevo y limpio.
- Agitar por inversión durante 10 minutos y luego centrifugar por 10 minutos a 12 000 rpm eliminando el sobrenadante al concluir la centrifugación.
- Realizar un lavado más y dejar secar durante 8 minutos a temperatura ambiente.
- Una vez seco el DNA resuspenderlo en 300 μ L de regulador Tris/EDTA (TE) pH=8,0, homogenizarlo con ayuda de una micropipeta.
- Cuantificar y determinar la pureza del DNA por espectrofotometría tomando las lecturas a 260, 280 y 230 nm.
- Finalmente almacenar a 4°C hasta su uso.

Cuantificación de TRECs por PCR tiempo real.

Para las reacciones de PCR tiempo real se implementarán un ensayo doble para determinar simultáneamente la expresión del gen control/normalizador β -actina y los TRECs.

Las mezclas de reacción se prepararán de acuerdo a la siguiente tabla.

Tabla X. Mezcla de reacción para la cuantificar por PCR tiempo real β -actina y TRECs.

Reactivo	Concentración	Vol. (µL)
Master Mix	2x	12.5
Iniciador β-actina F	20 pmol	1
Iniciador β-actina R	20 pmol	1
Iniciador TRECs F	20 pmol	1
Iniciador TRECs R	20 pmol	1
Sondas TaqMan	20 pmol	1,5
DNA	----	50 ng
H ₂ O	c.b.p.	25 µL

c.b.p.= cuanto baste para alcanzar el volumen indicado.

H₂O= agua

El programa de PCR se describe a continuación en la siguiente tabla:

Tabla X. Programa de PCR para amplificar al gen de β-actina y TRECs.

Temperatura (°C)	Tiempo (s)	Ciclos
95	600	1
95	15	45
60	60	
60	60	1
4	∞	1

Para cuantificar TRECs y β-actina se montarán las muestras por triplicado de cada paciente y se usarán los valores de Ct promedio para referir dicho valor a la curva de calibración y así obtener el número de copias de TRECs y β-actina de cada muestra.

Para normalizar los valores de la cuantificación de TRECs se calculará el radio de TRECs de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Radio}_{\text{TRECs}} = \text{Copias}_{\text{TRECs}} / \text{Copias}_{\beta\text{-actina}}$$

ANEXO 5. CONSENTIMIENTO INFORMADO



Carta de consentimiento informado

Proyecto de investigación:

Función linfocitaria de pacientes con resección quirúrgica del timo vs pacientes sanos.

Estimado madre y/o padre:

Por medio de esta carta, lo invitamos a participar en el estudio mencionado arriba. Usted debe saber que la participación en esta investigación es totalmente voluntaria, de manera que usted puede decidir no participar en mismo y en este caso no perdería ninguna prestación a la que tiene derecho en nuestro hospital.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Los pacientes con resección del timo pudieran presentar una afectación del sistema de defensa de grado variable que les provoque infecciones recurrentes de las vías aéreas, debido a que es un órgano fundamental para el desarrollo y maduración de varias células del sistema de defensa de nuestro organismo.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

La presente investigación pretende conocer la función linfocitaria de pacientes con resección quirúrgica vs pacientes sanos.

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

Para este estudio necesitamos realizarle al (la) paciente una serie de preguntas y un examen físico completo. Además, se le tomará una muestra de sangre

Las muestras serán obtenidas mediante el siguiente procedimiento:

Obtención de la muestra sanguínea.

1. Se explica detalladamente el procedimiento al paciente y/o familiar.
2. Bajo condiciones higiénicas óptimas, se coloca el brazo extendido y se selecciona la vena por palpación preferentemente en el antebrazo.

3. Se tomarán 7ml de sangre aproximadamente.
4. La muestra sanguínea será almacenada a temperatura ambiente para su análisis posterior de las células del sistema de defensa.

Riesgos y molestias

Los posibles riesgos de la toma de muestra sanguínea son molestia leve en el sitio de punción, formación de moretones, hemorragia, infección o cicatriz. En caso de presentarse algún daño causado por la investigación, los costos del tratamiento serán cubiertos por el fondo asignado a la misma.

BENEFICIOS

Su colaboración permitirá obtener conocimiento del grado de afectación de varias células del sistema inmunológico de su hijo (a) y tal vez ayudará a otras familias que presenten problemas similares en un futuro, y en caso que lo amerite, permitiría su inicio de tratamiento oportuno. Debido a que la información que se recabe es absolutamente confidencial y con fines de investigación, usted debe saber que no daremos a conocer ninguna información acerca de su hija(o), sin su consentimiento.

COSTOS

La toma de muestras de sangre, el ultrasonido del timo, así como cualquier consulta que usted tenga con el médico para hablar del estudio de investigación no tendrán ningún costo.

Usted tiene la garantía de recibir respuesta a sus preguntas y aclaración a cualquier duda acerca de los procedimientos, riesgos, beneficios y otros asuntos relacionados con la investigación. Si este fuera el caso, deberá comunicarse con los médicos responsables (Dra. Elsy Maureen Navarrete Rodríguez, Dra. Blanca del Rio Navarro, Dra. Daniela García Fajardo) de la investigación, teléfono 52 28 99 17 ext. 2150 (oficina de Alergia). Además, en caso de aceptar de participar en el protocolo usted puede dejar de hacerlo en cualquier momento durante la realización del mismo, sin que se vea afectado su derecho de recibir atención en nuestra institución.

Los resultados del estudio serán proporcionados al familiar responsable en forma oportuna, a pesar de que podría alterar su voluntad para continuar participando en el mismo.

Le sugerimos que conserve una copia de este documento para consultarla si es necesario.

Por este medio, _____ otorgo mi consentimiento para participar en el estudio, sin que haya de por medio coerción alguna

México, D.F. a _____ de _____ de _____

Nombre y firma de la Madre

Nombre y firma del Padre

Nombre y firma de testigo 1

Nombre y firma de testigo 2

Parentesco con el paciente

Parentesco con el paciente

Nombre y firma del investigador

Responsable

ANEXO 6. ASENTIMIENTO INFORMADO



Carta de asentimiento informado para pacientes

Proyecto de investigación:

Función linfocitaria de pacientes con resección quirúrgica del timo vs pacientes sanos.

Estimado paciente:

Por medio de esta carta, te invitamos a participar en el estudio mencionado arriba, debes saber que participar en esta investigación es totalmente voluntario, por lo que si decide no participar no habrá ningún problema.

Ninguna información será dada a nadie sin tu consentimiento.

JUSTIFICACIÓN DEL ESTUDIO

Los pacientes como tú a quienes se les ha operado del corazón, pueden tener problemas con sus defensas y enfermarse constantemente de la garganta, además hay algunos niños que posterior a la cirugía del corazón pueden tener más problemas de infecciones.

OBJETIVO DEL ESTUDIO

Queremos conocer cómo funcionan las defensas con pacientes que hayan sido operadas del corazón vs otras que no, para entender mejor cómo funcionan las defensas en esta enfermedad.

PROCEDIMIENTO DEL ESTUDIO

Necesitamos preguntarte algunas cosas sobre las infecciones que te dan y si has estado hospitalizado, te revisaremos completamente y te tomaremos una muestra de sangre de 7ml y un estudio de ultrasonido del timo.

Riesgos y molestias

Los posibles riesgos de la toma de la sangre son molestia leve en el sitio de punción, formación de moretones, hemorragia, infección o cicatriz...

BENEFICIOS

Tu colaboración permitirá conocer como están tus defensas y ayudará tanto a ti en el caso que lo necesites como a más pacientes con tu misma enfermedad.

COSTOS

La toma de muestras de sangre, el ultrasonido del timo, así como cualquier consulta no tendrán ningún costo.

Si tienes alguna duda puedes comunicarte con los médicos responsables de la investigación (Dra. Elsy Maureen Navarrete Rodríguez, Dra. Blanca del Rio Navarro, Dra. Daniela García Fajardo) al teléfono 52 28 99 17 ext. 2150 (Oficina de Alergia). Además, en caso de aceptar su participación en el protocolo tú puedes dejar de participar en cualquier momento durante la realización del mismo, sin que se vea afectado tu derecho de recibir atención en nuestra institución.

Te sugerimos que conserves una copia de este documento para consultarla si es necesario.

He leído las explicaciones acerca de este estudio y se me ha dado la oportunidad de discutirlos y de hacer preguntas.

Por este medio, _____ otorgo mi asentimiento para participar en el estudio.

México, D.F. _____ de _____ de _____

Nombre y firma del paciente _____

Nombre y firma de la Madre

Nombre y firma del Padre

Nombre y firma de testigo 1

Nombre y firma de testigo 2

Parentesco con el paciente

Parentesco con el paciente

Nombre y firma del investigador Responsable