



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOMEDICINA

**INDUCCIÓN DE TUMORES DE UNA LÍNEA DE CARCINOMA DE CÉRVIX
HUMANO INBL EN RATONES HEMBRA ALOPÉCICOS CD1^{et/et} CUYOS
LINFOCITOS PIERDEN ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y PRESENTAN UN
FENOTIPO CD4-CD8 DOBLE POSITIVO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

VARGAS ÁNGELES CARLOS ADRIAN

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ROSALVA RANGEL CORONA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

COMITÉ TUTOR: DR. BENNY WEISS STEIDER
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DR. JOSÉ ANTONIO ALVARADO MORENO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL (IMSS)

CD. MX.

ABRIL 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
BIOMEDICINA

**INDUCCIÓN DE TUMORES DE UNA LÍNEA DE CARCINOMA DE CÉRVIX
HUMANO INBL EN RATONES HEMBRA ALOPÉCICOS CD1^{ET/ET} CUYOS
LINFOCITOS PIERDEN ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y PRESENTAN UN
FENOTIPO CD4-CD8 DOBLE POSITIVO**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

VARGAS ÁNGELES CARLOS ADRIAN

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. ROSALVA RANGEL CORONA
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

COMITÉ TUTOR: DR. BENNY WEISS STEIDER
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
DR. JOSÉ ANTONIO ALVARADO MORENO
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL (IMSS)

MÉXICO, CD. MX.

ABRIL 2020

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

OFICIO CPCB/275/2020.

ASUNTO: Oficio de Jurado.

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **07 de octubre de 2019** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** en el campo de conocimiento de (**Biología Experimental**) del estudiante **VARGAS ÁNGELES CARLOS ADRIAN** con número de cuenta **308208467** con la tesis titulada "**Inducción de tumores de una línea de carcinoma de cérvix humano INBL en ratones hembra alopecicos CD1et/et cuyos linfocitos pierden actividad citotóxica y presentan un fenotipo CD4-CD8 doble positivo**", realizada bajo la dirección de la **MTRA. ROSALVA RANGEL CORONA**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE
Vocal: DR. BENNY WEISS STEIDER
Secretario: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA
Suplente: DR. LUIS SÁNCHEZ SÁNCHEZ
Suplente: DRA. MARÍA DE LOURDES MORA GARCÍA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 02 de marzo de 2020

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



c. c. p. Expediente del alumno

Agradecimientos institucionales

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la UNAM

Al CONACyT por el apoyo económico que me brindo para realizar mis estudios de Maestría (CVU: 850077)

Al Programa PAPIIT de la DGAPA por el financiamiento al Proyecto IN-222118.

A la M en C. Rosalva Rangel Corona quien fungió como mi tutora durante mis estudios de Maestría

Al Dr. Benny Weiss Steider y al Dr. José Antonio Alvarado Moreno quienes formaron parte de mi comité tutor.

No hay nada que la ciencia no pueda explicar, buscar una norma para explicar aquello que no puedes entender... El esfuerzo inagotable que sigue este camino recto y constante, eso es lo que llamamos ciencia. Podemos derrotar a la fantasía con la ciencia.

Ishigami Senku

Agradecimientos

Gracias a la UNAM, en especial a la FES Zaragoza por haberme permitido formarme en ella.

Gracias a todas las personas que fueron participes de este proceso, ya sea de manera directa o indirecta. Primeramente, a la M en C Rosalva Rangel y a la Dra. Tere Corona por aceptarme en su laboratorio de investigación.

Al equipo ratón conformado por Virginia, Paola, Diana y Julio (Alex) por apoyarme durante todo el proceso de esta investigación. A los M en C Edgar y Leo por los consejos y apoyo para poder realizar este trabajo.

A los miembros del L-4, Ana, Zeit, Gloria, Adri, Jeanette, Fer (Canelita), Bere y demás compañeros de laboratorio que hicieron mi estancia en el laboratorio muy amena y divertida.

A mi novia Daritza por acompañarme y apoyarme a lo largo de mis estudios desde licenciatura hasta la realización de mis estudios de maestría.

Al personal del Bioterio en especialmente a la MVZ Adriana Altamirano, por el apoyo brindado para el cuidado de los ratones.



Contenido

Resumen	1
Abstract.....	2
Introducción.....	3
El cáncer en México.....	3
El carcinoma de cérvix.....	4
El uso de modelos animales en la investigación del cáncer.....	7
El ratón de laboratorio	9
El ratón CD-1	10
El ratón CD-1 ^{et/et}	11
El timo	12
El desarrollo y maduración de linfocitos T en el timo.....	15
Los linfocitos	18
Los linfocitos T.....	18
Linfocitos Th (CD4 ⁺)	19
Linfocitos Tc (CD8 ⁺).....	19
Los linfocitos simples positivo	20
La coexpresión de CD4 y CD8: linfocitos dobles positivo.....	21
Los marcadores de superficie	23
El marcador CD3.....	23
Los marcadores CD4 y CD8.....	24
Objetivos	26
General:.....	26
Específicos:.....	26
Antecedentes	27
Hipótesis	28
Material y método	29
Material biológico.	29
Cultivo Celular.	29
Extracción de linfocitos	29
Caracterización de las poblaciones de LSP	30
Ensayo de citotoxicidad.....	31
Ensayo de proliferación.....	31

Inducción de tumores en ratones CD1 y CD1 ^{et/et}	32
Análisis estadístico	33
Resultados.....	34
Poblaciones de LSP CD3, CD4 y CD8 en ratones hembra de la cepa CD1	34
Poblaciones de LSP CD3, CD4 y CD8 en ratones hembra de la cepa CD1 ^{et/et}	35
Ensayo de proliferación.....	38
Citotoxicidad de los linfocitos de las cepas CD1 y CD1 ^{et/e}	39
Inducción de tumores en ratones de la cepa CD1	41
Inducción de tumores en ratones de la cepa CD1 ^{et/et}	41
Discusión de resultados.....	45
Conclusiones	50
Referencias.....	51

Resumen

Los ratones son uno de los modelos animales más utilizados para la investigación, no solo en oncología sino en infinidad de patologías debido a que comparten numerosos procesos bioquímicos y fisiológicos con los humanos. Son de gran utilidad porque además de tener un tiempo generacional corto, se reproducen fácilmente, permitiendo que puedan obtenerse líneas genéticamente definidas para el estudio de enfermedades específicas. De igual forma es posible generar animales transgénicos para describir la función de un gen o una proteína específica en un proceso fisiológico. Es importante mencionar que los resultados obtenidos en estos animales no son directamente extrapolables al humano, pero facilitan la comprensión de diversos procesos fisiológicos.

Para comprender los procesos fisiológicos que ocurren en el desarrollo del cáncer se utilizan ratones, especialmente aquellos que poseen un sistema inmune deficiente como la cepa *nu/nu* donde el epitelio tímico no se diferencia o los *scid* que son incapaces de desarrollar linfocitos B o T y es fácil hacer xenotrasplantes. También, se pueden lograr modelos experimentales con ratones inmunodeprimidos mediante la administración de hidrocortisona.

El presente trabajo pretende contribuir a la caracterización de una cepa de ratones que surgió en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza en 1985 a partir de ratones CD1 llamada CD1^{et/et}, en la cual se ha demostrado que las hembras son inmunodeficientes pues presentan un timo rudimentario en su adultez, semejante a un nódulo linfoide, mientras que los machos conservan un timo funcional de menor tamaño. Además, se ha demostrado que las hembras de esta cepa de ratón son susceptibles a infecciones bacterianas y han sido utilizadas como modelo experimental del síndrome de Sjögren. Por tal motivo se evaluó, la susceptibilidad a la generación de tumores exógenos. También se realizó la caracterización de las poblaciones de linfocitos de sangre periférica (LSP) de ratones CD1^{et/et} y CD1 de 6, 12, 18, 24 y 48 semanas de vida. En una investigación preliminar los resultados indicaron que los ratones de la cepa CD1^{et/et} son susceptibles a la generación de tumores exógenos y que a partir de las 12 semanas de vida el ratón CD1^{et/et} presenta linfocitos dobles positivos CD4 y CD8 con actividad citotóxica disminuida.



Abstract

Mice are one of the most commonly used animal models for research, not only in oncology but in countless pathologies because they share numerous biochemical and physiological processes with humans. They are very useful because in addition to having a short generational time, they reproduce easily, allowing genetically defined lines to be obtained for the study of specific diseases. Similarly, it is possible to generate transgenic animals to describe the function of a specific gene or protein in a physiological process. It is important to mention that the results obtained in these animals are not directly extrapolated to humans, but they facilitate the understanding of various physiological processes.

To understand the physiological processes that occur in the development of cancer, mice are used, especially those that have a deficient immune system such as the *nu/nu* strain where the thymic epithelium is not differentiated or the *scid* that are unable to develop B or T lymphocytes and it is easy to do xenotransplants. Also, experimental models can be achieved with immunosuppressed mice by administering hydrocortisone.

This paper aims to contribute to the characterization of a strain of mice that emerged in the bioterium of the Faculty of Higher Studies Zaragoza in 1985 from CD1 mice called CD1^{et/et}, in which it has been shown that females are immunodeficient with a rudimentary thymus in adulthood, similar to a lymphoid nodule, while males retain a smaller functional thymus. In addition, it has been shown that females of this mouse strain are susceptible to bacterial infections and have been used as an experimental model of Sjögren's syndrome. For this reason, the susceptibility to the generation of exogenous tumors was evaluated. Characterization of the peripheral blood lymphocyte (LSP) populations of CD1^{et/et} and CD1 mice of 6, 12, 18, 24 and 48 weeks of age was also performed. In a preliminary investigation, the results indicated that the mice of the strain CD1^{et/et} are susceptible to the generation of exogenous tumors and that from 12 weeks of age the CD1^{et/et} mouse has CD4 and CD8 positive double lymphocytes with decreased cytotoxic activity.



Introducción

El cáncer en México

El cáncer es un conjunto de enfermedades ocasionada por cambio en los mecanismos de proliferación, diferenciación y muerte celular, además de la capacidad de migración e invasión en tejidos. (Cooper, 2000) Todo esto ocurre como resultado de la acumulación de mutaciones somáticas en la progenie de una célula normal, llevando a la proliferación selectiva e incontrolada de las células mutadas. (Merlo, Peppe, & Reid, 2006)

El cáncer actualmente afecta tanto a los países desarrollados como a los países en desarrollo. Sin embargo, en los países en desarrollo, el impacto potencial del cáncer en los siguientes años puede tener consecuencias devastadoras para los sistemas de salud (Martínez & Leal, 2000). Actualmente, los principales problemas de salud pública en el país son enfermedades crónicas degenerativas. Sin embargo, se continúan experimentando una morbilidad y mortalidad significativas como resultado de deficiencias nutricionales, enfermedades infecciosas y contagiosas (Barquera & Tolentino, 2005).

En las mujeres, los cánceres de mama, cervix e hígado tienen las tasas más altas de mortalidad por cáncer (Fig. 1 2018) (OMS, GLOBOCAN, 2020)

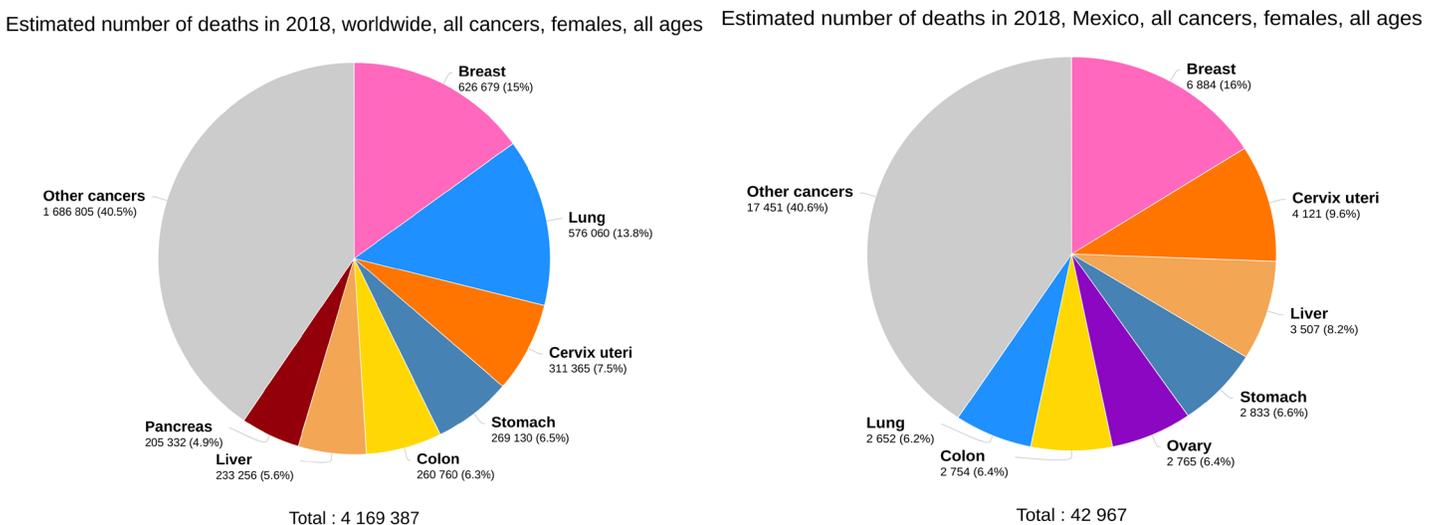


Fig. 1 Mortalidad en mujeres en el Mundo y México por cáncer en 2018. Se observa que el cáncer cervicouterino ocupa el tercer lugar de mortalidad a nivel mundial y el segundo en México. Tomado de (OMS, GLOBOCAN, 2020)

El carcinoma de cérvix

Con un estimado de 570,000 casos y 311,000 muertes en 2018 en todo el mundo, esta enfermedad se ubica como el tercer cáncer diagnosticado con mayor frecuencia y la tercera causa de muerte por cáncer en las mujeres. El cáncer cervicouterino (CaCu) ocupa el segundo lugar en incidencia y mortalidad detrás del cáncer de mama en países no desarrollados.

El virus de papiloma humano (VPH) es el principal factor de riesgo para el desarrollo del CaCu, existen 12 tipos oncogénicos de los virus clasificados como oncogénicos del grupo 1 según monografías del Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (CIRC). Otros cofactores importantes incluyen la inmunosupresión, el tabaquismo, la paridad y el uso de anticonceptivos orales.

En las últimas décadas, la incidencia del cáncer de cérvix y las tasas de mortalidad han disminuido en muchas poblaciones en todo el mundo. Además de los programas de detección oportuna, éstas disminuciones se han atribuido a factores asociados al aumento de los niveles socioeconómicos medios o al riesgo decreciente de infección persistente por VPH de alto riesgo, como resultado de las mejoras en la higiene genital, la reducción de la paridad y la disminución de la prevención de enfermedades de transmisión sexual. Los efectos benéficos de los programas de cribado citológico basados en la población aceleraron las disminuciones en las tasas de cáncer cervical (Bray & Ferlay, 2018).

Esta neoplasia se origina en el cérvix ubicado contiguo al cuerpo del útero y actúa como su apertura. Es un órgano cilíndrico y fibroso; se encuentra revestido por dos tipos de células epiteliales: células escamosas en la cara más externa, y células cilíndricas y glandulares en el conducto interno. La zona de transición entre las células escamosas y cilíndricas se denomina unión pavimentosa-cilíndrica. La mayoría de los cambios precancerosos y cancerosos se presenta en esta zona (Fig. 2, 2015) (McGuire, Blessing, & Moore, 1996).



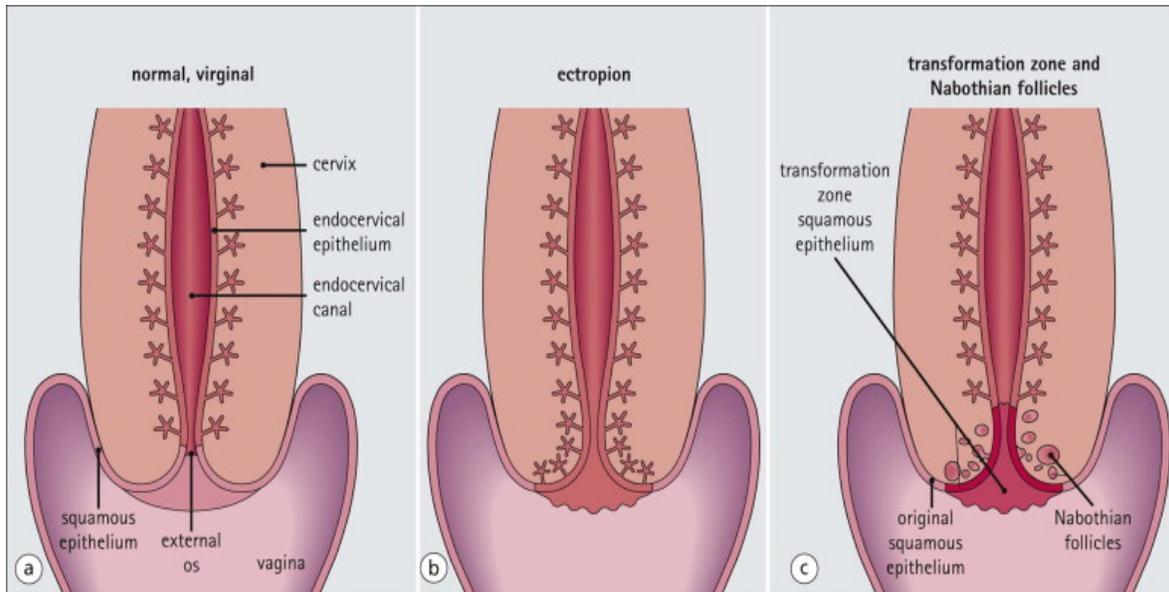


Fig. 2 Unión escamosa / columnar del cuello uterino. La movilidad de la unión escamosa / columnar, el desarrollo del ectropión y la formación de la zona de transformación. (a) La unión escamosa / columnar está situada originalmente en la región del orificio externo. (b) En la pubertad, el epitelio endocervical se extiende distalmente hacia el ambiente ácido de la vagina y forma un ectropión. (c) Se forma una zona de transformación a medida que el epitelio escamoso vuelve a crecer sobre el ectropión. Las aberturas de las criptas pueden ser borradas en el proceso, lo que resulta en la formación de folículos de Nabothia llenos de moco. (James & Anderson, 2015)

La lesión precursora es una displasia: neoplasia intraepitelial cervical (NIC) o adenocarcinoma *in situ*, que posteriormente se puede tornar en cáncer invasivo. Este proceso puede ser bastante lento. En algunos estudios longitudinales se observó que, pacientes de CaCu presentan un carcinoma invasivo en un periodo de 10 a 12 años. Sin embargo, en alrededor del 10% de las pacientes, las lesiones pueden progresar de *in situ* a invasivas en un periodo menor a 1 año, en medida que se torna invasivo, el tumor irrumpe a través de la membrana basal e invade el estroma del cuello uterino. La extensión del tumor en el cuello uterino puede manifestarse, en último término, como una ulceración, un tumor exofítico o la infiltración extensa del tejido subyacente, incluso vejiga o el recto (Fig. 3, 2012).

La infección por el virus de papiloma humano es un paso necesario para la expresión de casi todas las lesiones precancerosas y cancerosas. En algunos estudios se demuestra que el principal factor de riesgo es el VPH y que sobrepasa todos los demás factores de riesgo.

Es importante mencionar que es necesario identificar la cepa responsable de la infección para determinar el riesgo. Existen múltiples subtipos de VPH, de éstos, los subtipos 16 y 18 son los relacionados estrechamente con la presentación de lesiones de alto grado y cáncer (Doorbar, 2012) (Bosch & Broket, 2013).

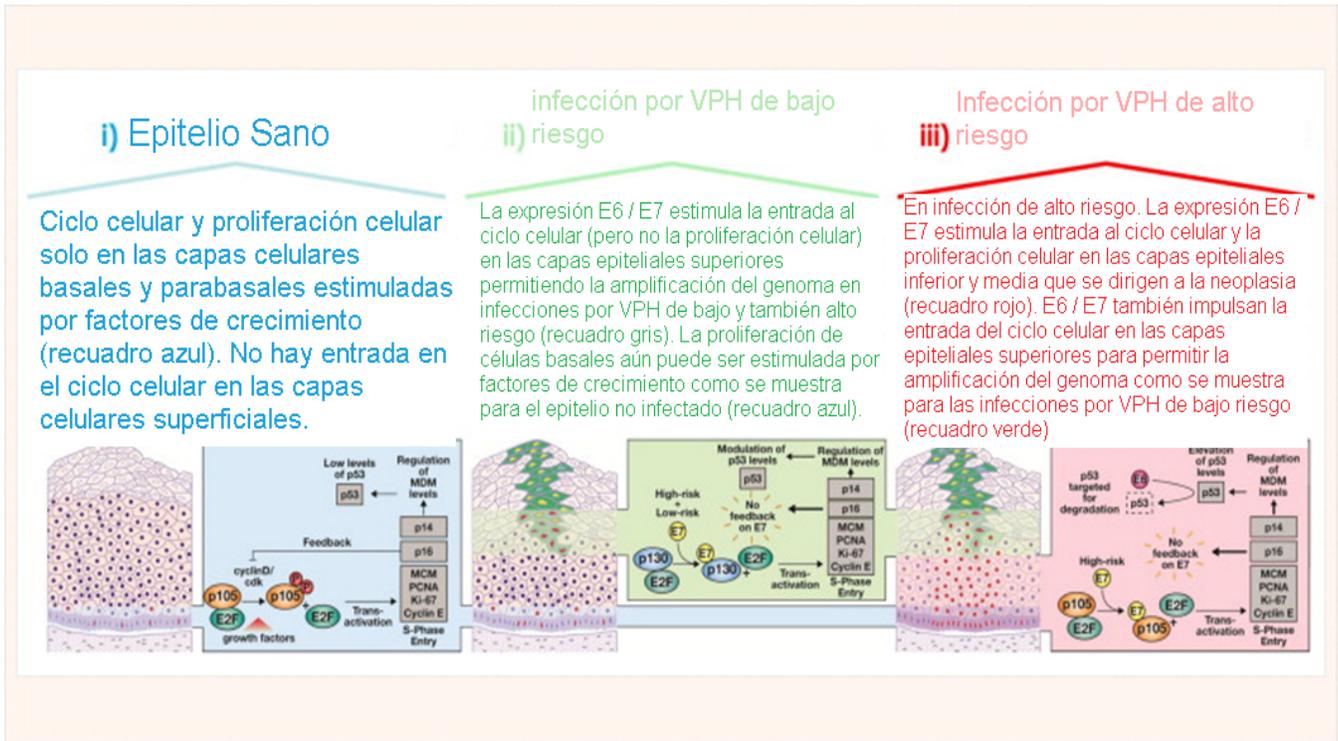


Fig. 3 Características del VPH para desencadenar una infección de bajo o alto riesgo. Tomado de (Doorbar J, 2012)

El uso de modelos animales en la investigación del cáncer.

El desarrollo de las ciencias médicas y biológicas va de la mano con el desarrollo de la experimentación con animales de laboratorio. La experimentación animal es una actividad que tiene como misión evidenciar o aclarar fenómenos biológicos sobre especies animales determinadas. Pero también debe de procurar el bienestar animal al evitar o disminuir en lo posible el dolor, sufrimiento y angustia al animal.

El uso de animales en experimentación está estrechamente relacionado al desarrollo de la biomedicina. Se define como animal de laboratorio a todo aquel ser vivo no humano, vertebrado o invertebrado, usado para la experimentación con fines científicos. (Guillen, 2012) (Smith, y otros, 2007). Su uso se basa, fundamentalmente, en la analogía fisiológica con la especie humana. El punto de partida para el uso de animales en las investigaciones biomédicas es conocer los detalles biológicos (anatomía, fisiología y etología) y de mantenimiento (alojamiento, alimentación y manejo) de la especie (Martín-Zúñiga J, 2009).

Los roedores de laboratorio son las especies más utilizadas no solo en área oncológica sino en el estudio de infinidad de patologías. Existen dos ideas básicas: la primera es que la interpretación de los resultados y la extrapolación de éstos de una especie a otra depende del modelo experimental utilizado. La segunda idea es que no existe un modelo perfectamente extrapolable a hombre. (Benavidez & Genet, 2001)

Si bien los resultados obtenidos en los animales de laboratorio no son directamente extrapolables al humano, ofrecen una serie de ventajas como:

- I. El tratarse de un mamífero, con diferencias, pero comparten procesos bioquímicos y fisiológicos muy similares.
- II. Tiene un tiempo generacional muy corto y un alto índice reproductivo, su talla es pequeña y son relativamente dóciles.
- III. Se puede controlar con relativa facilidad las variables ambientales, más precisamente el macro y microambiente, fundamentales para el desarrollo correcto de los experimentos, permitiendo su fácil reproductividad, su mantenimiento en cautiverio es fácil y económico.



- IV. Existe una gran cantidad de líneas definida genéticamente, como las consanguíneas y congénitas además de cientos de mutaciones y un gran número de rearrreglos cromosómicos disponibles, se pueden producir líneas de individuos genéticamente idénticos.
- V. Se conocen los mapas genéticos, así como la secuencia completa del genoma, al publicarse el primer mapa detallado del genoma de ratón se halló que al menos el 90% del ADN de los ratones es idéntico al de los humanos. (Foltz, 1999)

Para la investigación oncológica se requiere la implantación de células para la generación de un crecimiento tumoral en un modelo murino, con lo que se obtendrán ratones xenotransplantados o alotransplantados. En el primer caso se inoculan líneas celulares tumorales de origen humano y para ello es indispensable usar animales genéticamente modificados o mutados, para evitar el rechazo del tumor, que por lo general son organismos inmunodeprimidos. (Euhus, 1986)

Existe un abanico enorme de modelos murinos para el estudio experimental del cáncer, abarcando distintas cepas consanguíneas, mutaciones espontaneas, ratones transgénicos. Las ventajas más importantes que ofrecen estos modelos es la posibilidad de estudiar el efecto de las mutaciones que predisponen al cáncer en un fondo genético uniforme y la posibilidad de llevar a cabo todo tipo de estudios básicos y ensayos terapéuticos *in vivo*. (Wallace, 2000)

Tanto la generación como la implantación tumoral en los animales de investigación son actividades experimentales de vital importancia que requieren la consideración del efecto del tumor en el animal. Es importante también implementar sistemas eficaces de vigilancia y criterios de punto final los cuales deben incluir los límites de la carga tumoral en sí y la gravedad de la enfermedad asociada al tumor. Es importante para ello el estudio de las posibles alteraciones fisiológicas, bioquímicos, y de biomarcadores. (Morton, 2000)

En ningún caso el tamaño tumoral debe exceder los 20 mm en el diámetro más largo en los ratones y de 40 mm en ratas. (Wallace, 2000)

El ratón de laboratorio

El ratón es el animal de laboratorio mejor caracterizado genéticamente. Si a ello sumamos su pequeño tamaño, fácil manejo, corto periodo gestacional, camadas grandes y rápida madurez sexual, todo ello lo convierte en una óptima especie para la creación de modelos (Navarro-Hernández, Ramírez, & Villagrán, 2012).

El ratón es un modelo en el cual 90% de los genes tienen contraparte humana. Los ratones son relativamente económicos de criar y mantener. Se pueden reproducir rápidamente y por ende permiten a los investigadores estudiar la función de características particulares a lo largo de varias generaciones durante un periodo de tiempo razonable. Su fisiología y genética han sido estudiadas en profundidad, y pueden ser comparados a humanos fácilmente. El desarrollo de ratones transgénicos son un modelo animal cada vez más usado. Éstos pueden modificarse, añadiendo genes exógenos para cambiar alguna característica, adicionando alguna funcionalidad (*Knockin*) o bloqueando la expresión de algún gen (*Knockout*) (Miller, 2011) su importancia radica en describir, las funciones de los genes de interés. También se han desarrollado varios modelos en ratón de enfermedades humanas para avanzar en los estudios de la patogénesis de las enfermedades, y para evaluar la efectividad y toxicidad de varios medicamentos en investigación (Fig. 4,2016) (Beura, y otros, 2016).

Cepa	Principales características	ventajas	principales aplicaciones
C57BL/6	endogámica, negro	estabilidad de la cepa, de fácil cría	modelos fisiológicos o patológicos para experimentos <i>in vivo</i> , cepa de fondo genético para transgénicos y congénicos
BALB/c	endogámica, inmunodeficientes	de fácil cría, propensos a los tumores	producción de hibridomas y anticuerpos monoclonales, modelos para la investigación de terapias contra el cáncer e inmunología.
CD-1	exogámica, albino	variabilidad genética	clonado posicional, selección genotípica, pruebas de toxicidad (cuestionable)
CB17 SCID	endogámica, albino	sin células T o B, trasplante de tumores	modelo animal inmunodeficiente para pruebas de nuevos tratamientos contra el cáncer como huésped para sistema inmune humano.

Fig. 4 Principales cepas de ratón y sus características y aplicaciones. Tomado de (Beura, y otros, 2016)

Los ratones utilizados en el laboratorio se pueden clasificar en cepas consanguíneas y no consanguíneas. Las cepas consanguíneas se caracterizan por homogeneidad genética, uniformidad fenotípica, larga estabilidad genética, identidad e individualidad de la cepa, y son distribuidas internacionalmente con un fondo genético registrado. Las no consanguíneas maximizan la variación genética y minimizan la endogamia con una mayor variación fenotípica interindividual, lo que permite obtener animales con mejor fertilidad, salud y longevidad, útiles en análisis genéticos de rasgos complejos (Benavides & Guénet, 2003).

El ratón CD-1

Los ratones CD1 destacan entre los ratones de uso más común en la investigación como una cepa exogámica. La variabilidad genética en modelos animales exogámicos de investigación puede servir como ventaja en la selección fenotípica o genotípica de un rasgo en particular.

Son ratones pertenecientes a una cepa exogámica. Se utilizan con mayor frecuencia en los proyectos de investigación que requieren animales fuertes, de precio económico, pero donde las consideraciones de genotipo específico son de menos importancia. Se utilizan a menudo en los ensayos biológicos o en estudios

preliminares en los que se perfeccionan las técnicas antes de estudios más detallados con cepas puras. También son útiles en estudios donde un mayor peso corporal o un mejor rendimiento de reproducción es de mayor importancia que un genotipo determinado.

El ratón CD-1^{et/et}

A pesar de la disponibilidad de varios modelos de ratón existentes para el estudio de inmunidad, el modelo animal que en este trabajo se utilizó, es un ratón hipotímico alopécico derivado de una mutación espontánea de la cepa albina CD1, como resultado de la expresión de un gen recesivo autosómico simple, surgida en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza de la UNAM; los animales son obtenidos al aparear machos y hembras $et/+$, o bien machos y hembras et/et . A este ratón se le llamo CD1 et/et , el símbolo “et” se ha adoptado para referir a la forma mutante y se encontró que los ratones machos de esta cepa, presentan un timo rudimentario el cual es aproximadamente la mitad del peso que presentan los animales eutímicos CD1; mientras que en las hembras CD et/et , presentan una estructura parecida a un nódulo linfático en lugar de timo y el peso de esta estructura es más bajo que el peso del timo de las hembras eutímicas CD1 (Marroquín & Rosas, 2000).

Se ha observado que estos animales presentan un periodo de vida mayor a los ratones desnudos atímicos nu/nu en condiciones convencionales de mantenimiento. Se ha observado que las hembras adultas presentan una marcada susceptibilidad a problemas cutáneos como abscesos, dermatitis bacteriana, cataratas y signos de envejecimiento prematuro (Marroquín & Rosas, 2000).

Otra característica del ratón CD1 et/et es que presenta una leucocitosis circulante con linfocitosis, monocitosis y eosinofilia y una linfopenia en bazo, así como una hipersegmentación de neutrófilos; se considera como una posibilidad que esta última característica sea el factor involucrado en la predisposición de los ratones a procesos infecciosos por una deficiencia en los procesos fagocíticos (Marroquin, Lara, & Calvillo, 2003)

También presentan anticuerpos antifosfolípidos de tipo IgA, IgG e IgM, auto anticuerpos anti-Ro y anti LA, factor reumatoide, y desarrollan una exocrinopatía inflamatoria con daño histopatológico de glándulas salivales y lagrimales que semejan a los pacientes con el síndrome de Sjögren. (Marroquin, Lara, & Calvillo, 2003) (Marroquin, Wek, Reyes, Arce, & Rojas, 1998) (Solis-Gonzalez, 2005) (Basurto, Mondragon, & Atilano, 2000)

El timo

El timo es un órgano donde maduran los linfocitos T que provienen de la médula ósea y, además, donde se eliminan los linfocitos T autorreactivos. Estas dos funciones lo convierten en un órgano esencial para mantener la salud y las funciones del sistema inmune. Numerosos factores, como la edad, el estado de nutrición, la administración de diversos fármacos, las infecciones, el embarazo, el estrés entre otros, influyen sobre el tamaño, la celularidad y las funciones del timo. (Tian, Zhang, & Yao-Ren, 2003) Estos cambios generalmente son temporales y representan procesos de adaptación del sistema inmune a condiciones adversas, pero en otros casos los cambios en las funciones del timo pueden facilitar la aparición de enfermedades o pueden ser atacados por agentes infecciosos que promueven la apoptosis del timo, por ejemplo *E. coli*, *S. aureus* y *M. tuberculosis* (Verinaud & Nieto, 2004).

En los mamíferos el timo es un órgano de forma triangular, bilobulado y de color gris rosáceo. Está ubicado en el tórax, inmediatamente por detrás de la parte superior del esternón, con la base apoyada en el pericardio y el ápice dirigido hacia el cuello. Se presenta delante de las venas tiroideas inferiores, la tráquea y los grandes vasos incluyendo el cayado aórtico.

El timo presenta una organización cortico-medular. Cada uno de los lóbulos está rodeado por una capsula de tejido conectivo derivado de la mesénquima, la cual se extiende hacia el interior del lóbulo formando tabiques que lo dividen en lobulillos. Cada lobulillo presenta una corteza rica en linfocitos y una médula con menos densidad de éstos (Tian, Zhang, & Yao-Ren, 2003).

En la corteza externa se encuentran células linfocíticas de núcleos grandes, mientras que, en la corteza interna, los núcleos de estas células son pequeños. Los linfocitos T son impulsados de la corteza hacia la médula a través de los intersticios del retículo epitelial o por los espacios perivascuales de la corteza que llegan a la médula. De ahí migran por el torrente sanguíneo hacia los ganglios linfáticos en los cuales entran en contacto con los linfocitos B.

Las células retículo-epiteliales sintetizan hormonas polipeptídicas llamadas timosinas, que estimulan la maduración y diferenciación de los linfocitos T.

La importancia del timo en la inmunidad se descubrió por primera vez a través de experimentos en ratones. Se encontró que la extirpación quirúrgica del timo al nacer dio lugar a ratones inmunodeficientes.

El papel importante del timo en la inducción de la diferenciación de las células precursoras derivadas de la médula ósea se ha demostrado mediante injertos de tejidos entre dos ratones mutantes, cada uno de los cuales carece de células T maduras por una razón diferente. En ratones desnudos (*nu/nu*), el epitelio tímico no logra diferenciarse, mientras que en los ratones *scid*, los linfocitos B y T no se desarrollan debido a un defecto en el receptor de células T; por lo cual injertos recíprocos de timo y médula ósea entre ambas cepas inmunodeficientes muestran que en el ratón *scid* tiene un timo normal y en el ratón *nu/nu* hay un defecto en el estroma del timo, por lo cual el trasplante de timo de *scid* a ratón *nu/nu* conduce al desarrollo de células T maduras (Fig. 5, 2011).

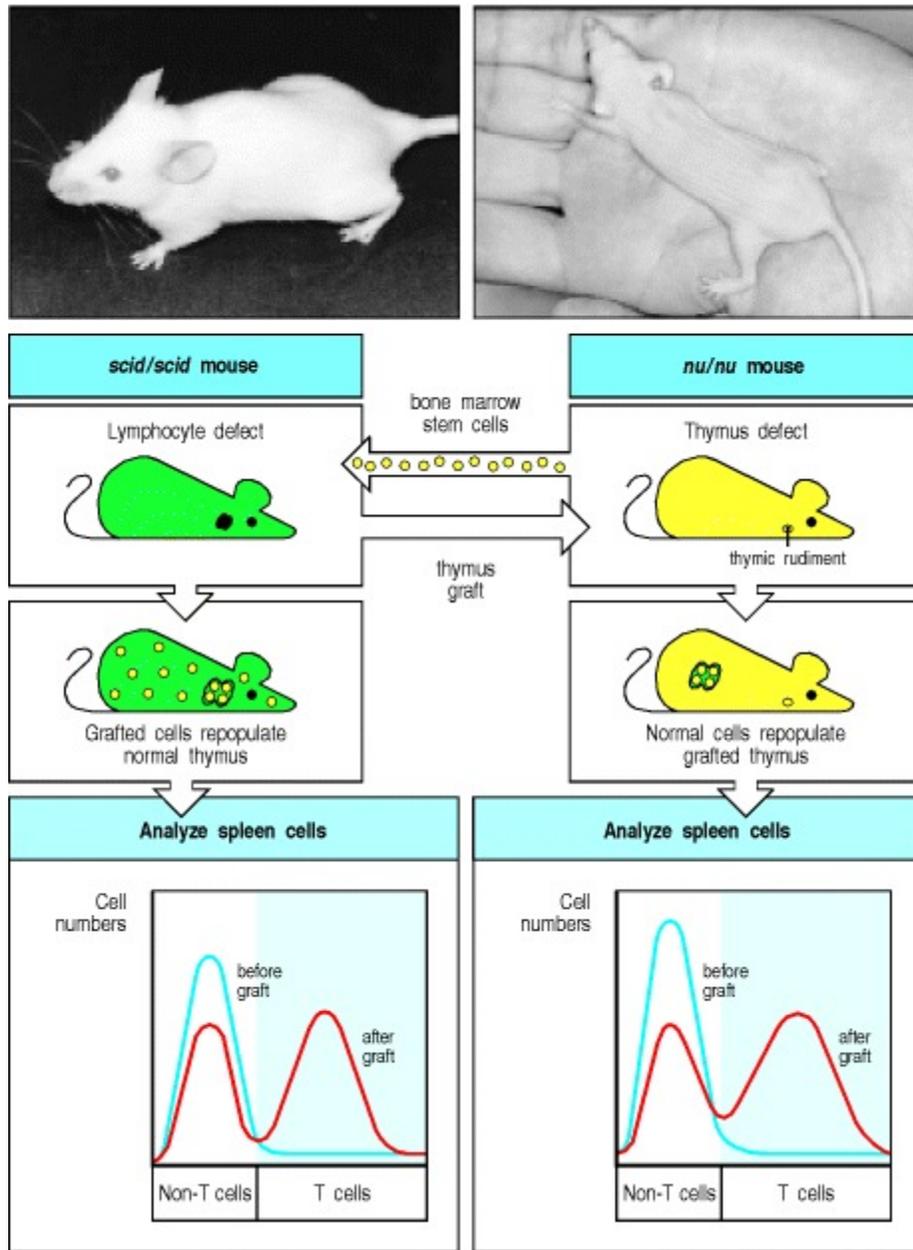


Fig. 5 Importancia del timo en la maduración de linfocitos T. Tomado de (Janeway CA, 2001)

El timo en humano pesa alrededor de 100-150 g al momento del nacimiento, 30-40 g en la pubertad y 10-15g a los 60 años. Este proceso se conoce como involución o hipoplasia fisiológica del timo. En un ratón macho CD1 el timo pesa 50 mg a los 3 meses de edad, reduciéndose aproximadamente 20 mg a los 20 meses. La involución fisiológica del timo se inicia muy temprano, tanto en el hombre como en el ratón y, aparentemente, es más rápida en machos que en hembras, lo cual

sugiere la existencia de factores hormonales en la involución. Después de la pubertad la influencia de las hormonas sexuales, particularmente cuando se producen en exceso durante el embarazo, inhiben la producción y expresión de las principales hormonas del timo (timulina y timosina $\alpha 1$) causando alteración fisiológicas y transitorias en la morfología del timo (Mocchegiani, y otros, 2002).

La involución fisiológica reduce dramáticamente el tamaño y la estructura del timo de modo que, en los individuos de edad avanzada, el timo queda convertido en unos cuantos lóbulos linfoides dispersos y rodeados de tejido fibroso y grasa. A medida que aumenta la edad de los ratones, los linfocitos T vírgenes disminuyen paulatinamente en un timo cada vez más atrofiado (Yao, 2003) (Paul, 2003). Proporcionalmente, a medida que los linfocitos T vírgenes disminuyen, las células de memoria expanden su número (Genhong & Hou, 2003).

El desarrollo y maduración de linfocitos T en el timo

Los linfocitos T se desarrollan a partir de un progenitor linfoide común en la médula ósea que también da lugar a los linfocitos B, pero los destinados a dar lugar a linfocitos T abandonan la médula ósea y migran hacia el timo. Esta es la razón por la que se les llama linfocitos o células T dependientes del timo.

Los timocitos en desarrollo pasan a través de una serie de fases que están marcadas por cambios en el estado de los genes receptores de células T y en la expresión de proteínas de la superficie celular como el complejo CD3 y los correceptores de las proteínas CD4 y CD8. Estos cambios en la superficie reflejan el estado de maduración funcional de la célula. Las combinaciones particulares de proteínas de la superficie celular se pueden usar como marcadores para las células T en diferentes etapas de diferenciación (Figs. 6 y 7, 2001) (Janeway CA, 2001).

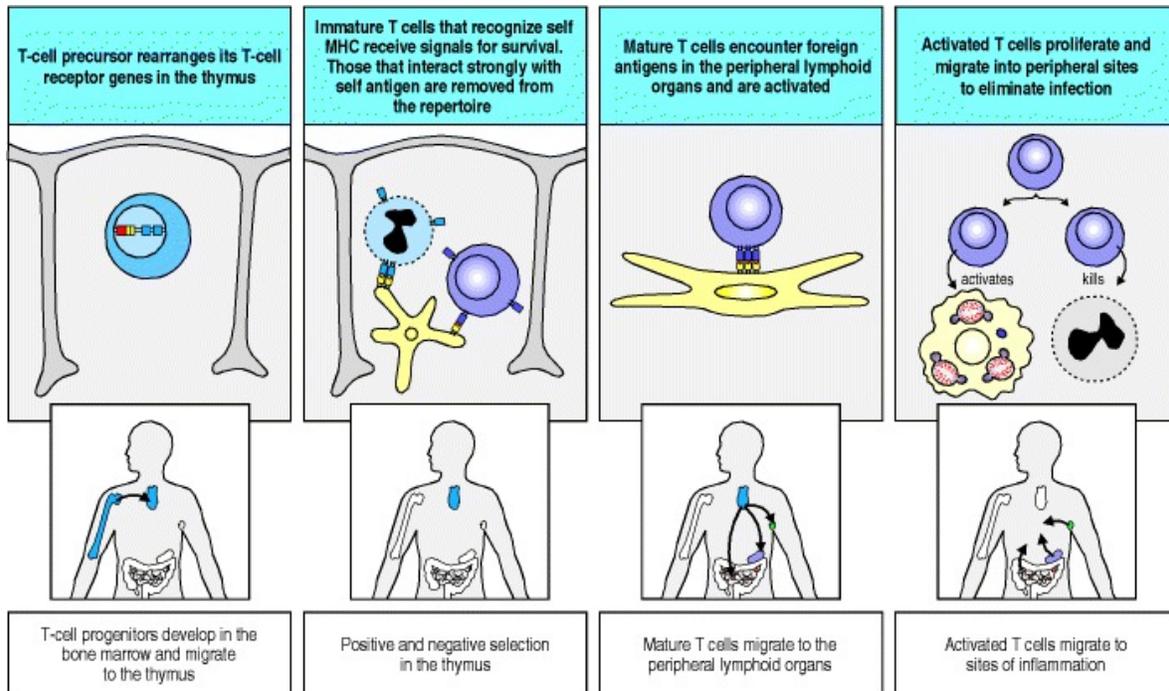


Fig. 6 Desarrollo de linfocitos T. Tomado de (Janeway CA, 2001)

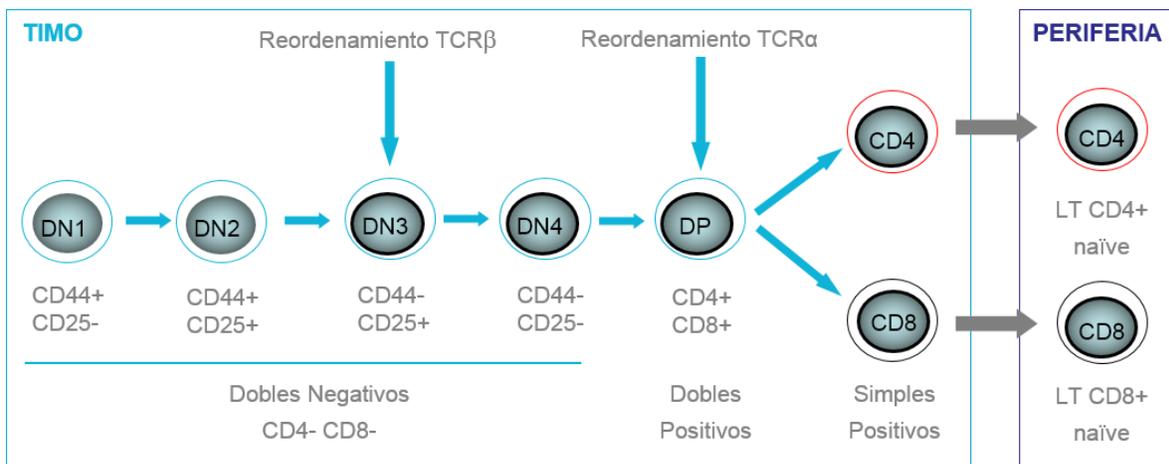


Fig. 7 Maduración de linfocitos T $\alpha\beta$. Se muestran los diferentes marcadores de superficie según las diferentes fases de maduración de los linfocitos T. Tomado de (Janeway CA, 2001)

Cuando las células progenitoras entran por primera vez en el timo desde la médula ósea carecen de la mayoría de las moléculas de superficie características de las células T maduras y sus genes receptores no están reordenados. Estas células dan lugar a la población principal de células T $\alpha\beta$ y a una población menor de linfocitos T $\gamma\delta$. Cuando estas células interactúan con el estroma del timo desencadenan la

fase inicial de diferenciación de células T expresando las primeras moléculas de superficie como el CD2 y Thy-1 (en ratones). Al final de esta fase, que dura una semana, los timocitos llevan marcadores distintivos del linaje de las células T, pero no expresan ninguno de los tres marcadores de la superficie celular que definen a las células T maduras, como son el CD3, CD4 y CD8, por lo cual a estos timocitos se les denomina doble negativo (Fig. 8, 2013).

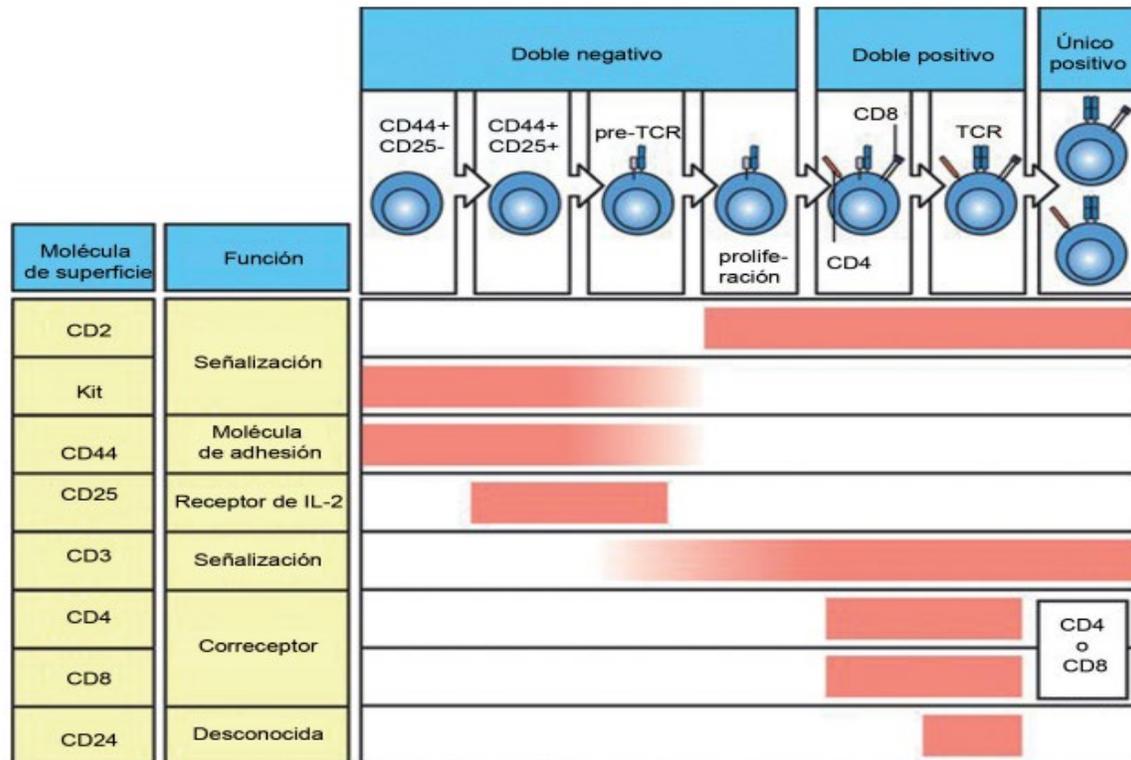


Fig. 8 Cambios en las moléculas de superficie que permiten diferenciar poblaciones de linfocitos dependiendo de su etapa de maduración. Tomado de (Pérez, Castrejon, Vargas, & Guido, 2013)

Este doble negativo inmaduros expresan c-kit y CD44, pero no CD25; conforme maduran más comienzan a expresar CD25 en su superficie y, más tarde, la expresión de CD44 y c-Kit se reduce, estas células reordenan la cadena β del receptor de células T, si no lo logran mueren por apoptosis.

Esta cadena β expresada por los timocitos ensambla el complejo molecular CD3, lo cual conduce a la proliferación celular y al reordenamiento y expresión de los genes CD8 y CD4. Estos timocitos dobles positivos constituyen la gran mayoría de los

timocitos. Posteriormente son retados para saber si son autorreactivos, si lo son, sufren apoptosis. Los dobles positivo no autorreactivos dejan de expresar una de las dos moléculas correceptoras y se vuelven simples positivas. Aproximadamente el 2% de los dobles positivos sobreviven y maduran como linfocitos T periféricos (Janeway CA, 2001).

En los ratones, los linfocitos Tímicos Migratorios Recién Formados (RTE por sus siglas en inglés) comienzan a abandonar el timo y pasan a sangre periférica en una proporción CD4:CD8 de 2:1 y a lo largo de su vida mantienen ese equilibrio. Los RTE dejan el timo con la capacidad de reconocer y responder a cualquier patógeno que encuentren en el hospedero.

Los linfocitos

Los linfocitos constituyen del 20 a 40% de los leucocitos en sangre periférica, cada linfocito tiene funciones específicas dentro de la respuesta inmune, éstos al madurar se encargan de reconocer y atacar de manera específica patógenos individuales. En general se dividen en tres categorías: linfocito B, Linfocito T y células NK.

Los linfocitos B y T que no han interactuado con un antígeno se denomina linfocitos no capacitados y son células pequeñas de aproximadamente 6 μm de diámetro. Una vez que interactúan con su antígeno se activan y crecen a aproximadamente 15 μm de diámetro y son conocidas como linfoblastos. (Barrett, Barman, Boitano, & Brooks, 2010)

Los diferentes linajes de linfocitos se distinguen por la expresión de receptores de membrana reconocidos por anticuerpos específicos que reaccionan a una molécula particular, conocidas como grupos de diferenciación o CD (del inglés *cluster of differentiation*) de las cuales se han descrito más de 250 tipos (Kindt, Goldsby, & Osbome, Inmunología de Kuby, 2013).

Los linfocitos T

Los linfocitos T se denominan así ya que requieren del Timo para su maduración, donde sufren una serie de procesos de selección hasta finalmente salir a sangre periférica como linfocitos maduros. Según el receptor específico TCR que presente se clasifican en linfocitos T en dos tipos: linfocitos $T\alpha\beta$, que representan más del

95% de los linfocitos en sangre periférica y los linfocitos $T\gamma\delta$. Expresan también CD2 y CD3, que son marcadores muy útiles para diferenciarlos de las células B. Otras moléculas como el CD4 y CD8 permiten diferenciar subtipos de linfocitos. Algunos de estos marcadores son moléculas de adhesión que van a permitir a las células entrar o no en los ganglios linfáticos o tejidos inflamados, o receptores de citocinas que permiten a las células activarse en presencia de las mismas. (González-Fernández & Lorenzo, 2005)

Linfocitos Th (CD4⁺)

Constituyen del 65 al 70% de los linfocitos T de sangre periférica. Su función es cooperar con otras células del sistema inmune, tanto secretando hormonas (citocinas), como interactuando directamente con otras células. Se denominan también linfocitos CD4⁺, ya que presentan ese marcador distintivo en su membrana. A través de su receptor específico TCR reconocen péptidos del patógeno en la superficie de macrófagos, células dendríticas o linfocitos B.

Dependiendo de las citocinas que producen los linfocitos CD4⁺ se subdividen en Th1 o Th2. Los Th1 secretan IL-2, INF- γ y factor de necrosis tumoral (TNF α) y participan fundamentalmente en respuesta de tipo celular frente a patógenos intracelulares. Por el contrario, los Th2 cooperan en la respuesta humoral ayudando a los linfocitos B a secretar anticuerpos, con las citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y factor de crecimiento transformante beta (TGF β). (González-Fernández & Lorenzo, 2005)

Linfocitos Tc (CD8⁺)

Su función es la eliminación de células infectadas por virus o tumorales y expresan CD8 en su membrana. Ya que matan a células propias del organismo, su función debe ser altamente controlada por el sistema inmune. Constituyen el 30 al 25% de los linfocitos T en sangre periférica, manteniéndose una proporción entre linfocitos CD4⁺/CD8⁺ por encima de 2 en condiciones normales. Los linfocitos Tc reconocen a través de su TCR a péptidos extraños procedentes del citoplasma presentados por moléculas propias de clase I del HLA en cualquier célula nucleada del organismo. (González-Fernández & Lorenzo, 2005)

Los linfocitos simples positivo

Las células T son componentes clave del sistema inmune adaptativo; en general, se considera que las células T maduras expresan el correceptor CD4 o CD8, además de su TCR, y, en consecuencia, el conjunto de células T se divide comúnmente en dos subconjuntos, en función de la expresión de CD4 o CD8. La molécula CD4, un miembro de la familia IgR, está codificada por un solo gen y se expresa en la superficie como un monómero transmembrana (Parel, Aurrand-Lions, & Scheja, 2007) (Maddon, Littman, & Godfrey, 1985). CD4 interactúa con el dominio $\beta 2$ de las moléculas MHC de clase II y también se ha demostrado que actúa como receptor para IL-16. El correceptor CD8 existe como CD8 $\alpha\alpha$ homodímero o un CD8 $\alpha\beta$ heterodímero; en ambos casos, los dómicos IG de las moléculas CD8 se unen a MHC de clase I (Chang, Tan, & Parisini, 2005).

El mecanismo para generar linajes CD4 y CD8 a partir de los precursores T de las células dobles positivas CD4CD8, está unido a la especificidad del receptor de antígeno de la célula T. Este proceso fue inicialmente considerado una selección aleatoria que generaba células simples positivas mediante la unión de sus precursores a los productos del MHC I o II (He, Vibhuti, Yi, & Xiang, 2005). Estudios recientes (Eljaafari A, 2013) indican que hay dos modelos de instrucción en la ontogenia del timo: el modelo de mosaico que mantiene la selección aleatoria y el modelo de la instrucción terminada, este último es el más aceptado y señala que funciona a través de un operador maestro que regula el compromiso de linaje, el cual ha sido identificado como el factor de transcripción Th-POK (Th- factor inductor POZ-Kruppel). La idea es que la fuerza o duración de la señal del RCR actúa activando a Th-POK, que entonces determina el linaje al cual la célula se comprometerá, el resultado es un cambio en la expresión genética mutuamente excluyente hacia CD4 o CD8 (Fig. 9, 2017) (He, Vibhuti, Yi, & Xiang, 2005) (Magalhaesa, Juntaa, & Mellob, 2004).

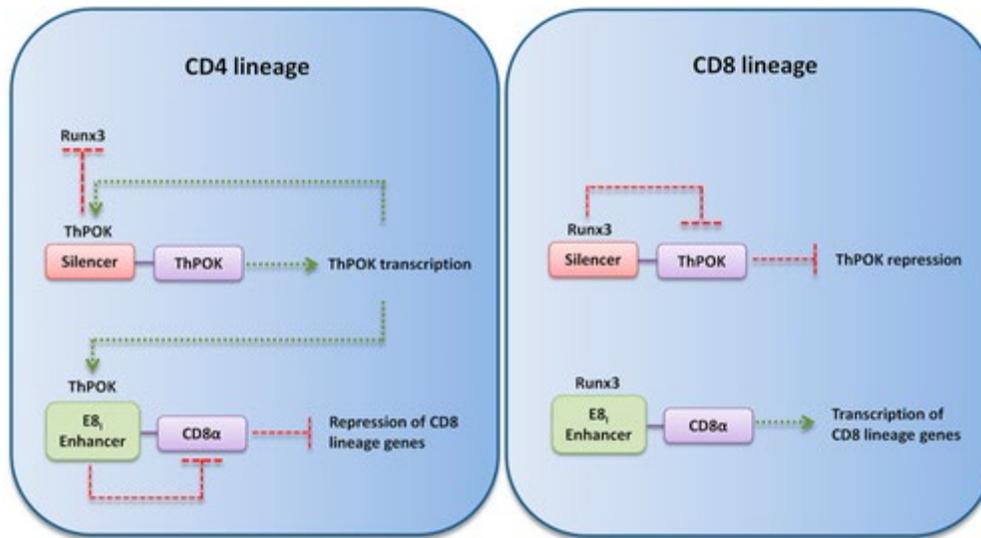


Fig. 9 Regulación de ThPOK y Runx3 para la expresión de CD4 y CD8. Tomado de (Clenet ML, 2017)

La coexpresión de CD4 y CD8: linfocitos dobles positivo

Normalmente se ha considerado que los linfocitos T diferenciados en sangre periférica se dividen en dos grandes subpoblaciones de acuerdo con la expresión mutuamente excluyente de los marcadores de membrana CD4 o CD8. No obstante, se ha encontrado la presencia de linfocitos CD4CD8 de forma normal, cuando su frecuencia rebasa el 5% se consideran aberrantes y están asociados a síndromes linfoproliferativos y de inmaduración tímica (Ortolani, Forti, & Radin, 1993) (Sala, Tonutii, & Feruglio, 1993) (Kin, Kim, & Yu, 2006). Algunos investigadores han reportado, la presencia de linfocitos doble positivos tanto en animales como humanos, tanto en individuos sanos, como en pacientes con enfermedades no linfoproliferativas. (Nam K. , Akari, Terao, & Shinbaa, 2000).

Se han hecho muy pocos estudios para evaluar el fenotipo de los linfocitos CD4CD8, sin embargo, se reportan diferencias importantes, como que los linfocitos dobles positivo expresan en mayor proporción las proteínas CD45RO y CXCR3 en comparación con los linfocitos mono positivos CD4 y CD8. (Fig. 10,; 2017) (Clenet, Gagnon, & Moratalla, 2017).

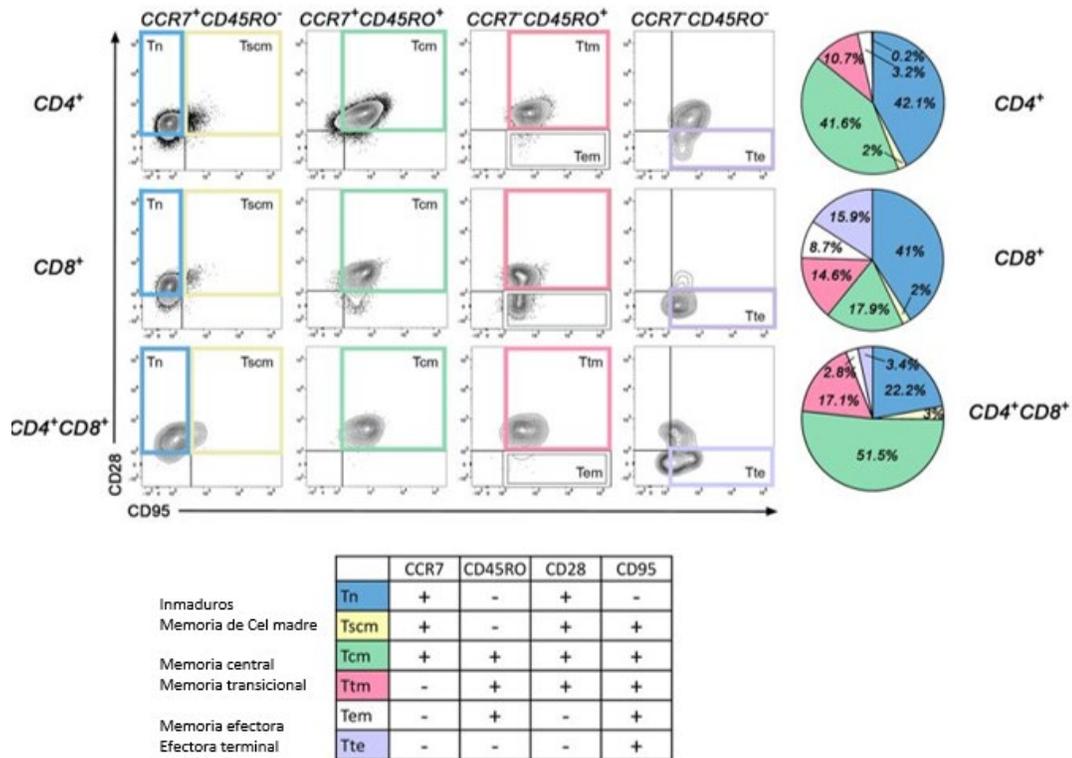


Fig. 10 Los linfocitos T CD4 +CD8 + constituyen una población diversificada compuesta predominantemente por subconjuntos de linfocitos T de memoria; El 75% de estas células exhibieron un fenotipo de Tcm, Ttm, Tem o Tte. Tomado de (Clenet ML, 2017)

Otras publicaciones reportan una mayor frecuencia de células dobles positivas en el envejecimiento, en enfermedades autoinmunes, infecciones virales y problemas de maduración tímica, así como en cáncer (Clenet, Gagnon, & Moratalla, 2017).

Los marcadores de superficie

Los linfocitos y otros leucocitos expresan un gran número de diferentes moléculas en su superficie. Algunas de estas moléculas aparecen en determinados estadios de la diferenciación o activación celular durante breves periodos, mientras que otras son características de distintas líneas celulares. (Koning, 1991).

Las moléculas que pueden utilizarse para identificar a las poblaciones celulares reciben el nombre de marcadores, en muchas de ellas esta identificación se puede realizar mediante anticuerpo monoclonales específicos (Berek & Ziegner, 1993).

Se ha aceptado la nomenclatura para estas moléculas de superficie, el CD (designación de agrupamiento; Cluster Designation) los marcadores se numeran como CD1, CD2, etc (Koning, 1991).

En términos de fisiología, las moléculas CD pueden actuar como receptores o ligandos importantes para la célula.

Las poblaciones celulares generalmente se definen utilizando un símbolo “+” o “-” para indicar si la expresa o carece de una molécula de CD.

El sistema de CD se usa comúnmente como marcadores celulares en la inmunofenotipificación, lo que permite que las células se definan en función de qué moléculas están presentes en su superficie. Las moléculas de CD se utilizan en la clasificación celular utilizando diferentes métodos, incluida la citometría de flujo (Ho, Tzong-Shyuan, & Sung-Yun, 2010).

Dos moléculas de CD comúnmente utilizadas son CD4 y CD8, que en general se usan como marcadores para células T auxiliares y citotóxicas respectivamente. Estas moléculas se definen en combinación con CD3⁺, ya que algunos otros leucocitos también expresan estos CD (Passlick, Flieger, & Ziegler-Heitbrock, 1989).

El marcador CD3

Este marcador es un complejo hexamérico formado por las moléculas CD3 γ , CD3 δ y CD3 ϵ , y la cadena ζ con un dominio extracelular corto (Fig. 11, 2013). Está asociado al TCR en células T y es el encargado de iniciar la transmisión intracelular

de las señales que se producen por el reconocimiento de ligando por el receptor (Owen, Punt, & Stranford, 2013). Tiene un par de dominios citoplasmáticos largos con múltiples copias de sitios de activación de inmunorreceptor basados en tirosina (ITAM, por sus siglas en ingles). La fosforilación de residuos de ITAM-tirosina permite el acoplamiento de moléculas adaptadoras, que dan lugar a las cascadas de señalización para la activación células (Murphy, 2012).

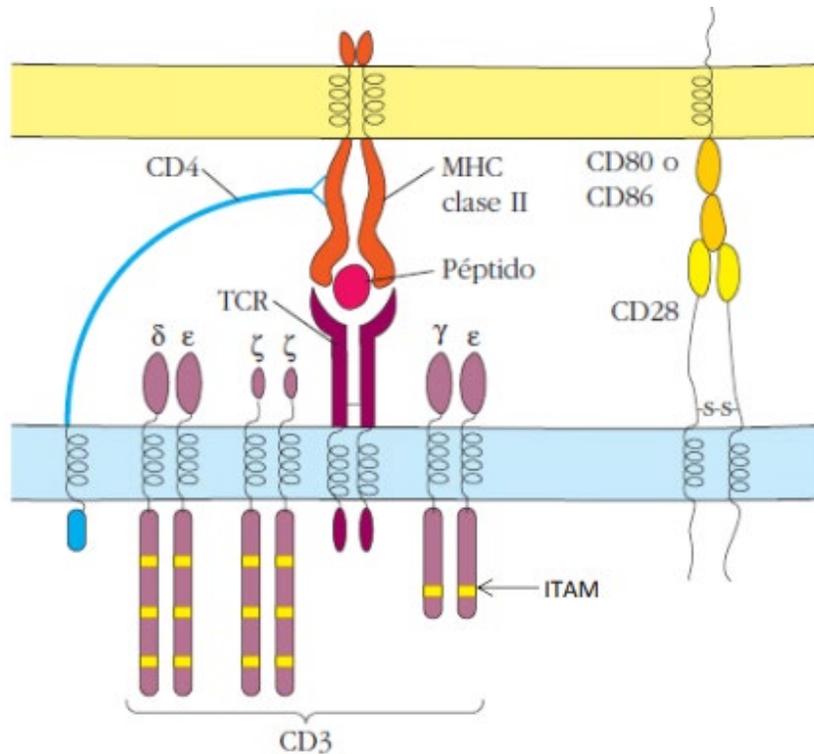


Fig.11. Cadenas γ , δ , ϵ y ζ del CD3 asociadas al TCR. En la figura se muestran los dímeros extracelulares, las barras amarillas que componen los dominios citoplasmáticos de los dímeros ITAM. Tomado de (Owen, Punt, & Stranford, 2013)

Los marcadores CD4 y CD8

Es una glicoproteína monomérica de membrana de 55 kDa que contiene cuatro dominios extracelulares tipo inmunoglobulina (D1 a D4), un dominio transmembranal hidrofóbico, y un dominio citoplasmático largo que contiene tres residuos de serina que pueden ser fosforilados (Fig.12). CD8 adopta la forma de un heterodímero $\alpha\beta$ u homodímero $\alpha\alpha$ enlazado con enlace disulfuro. Las cadenas tanto α como β del CD8 son glucoproteínas pequeñas de aproximadamente 30 a 38 kDa. Cada cadena consta de un dominio tipo inmunoglobulina, extracelular único, una región tallo, una región transmembrana hidrofóbica y una cola citoplasmática

que contiene 25 a 27 residuos, carios de los cuales pueden ser fosforilados. (Fig. 12, 2013)

Sus dominios extracelulares se unen a regiones conservadas de moléculas del MHC clase II y clase I respectivamente. Esta interacción aumenta la avidéz de la unión de la célula T a su blanco. También ayuda al acercamiento de los dominios citoplasmáticos de TCR/CD3 y su correceptor respectivo, para así iniciar la cascada de señalización de activación de la célula. (Owen, Punt, & Stranford, 2013)

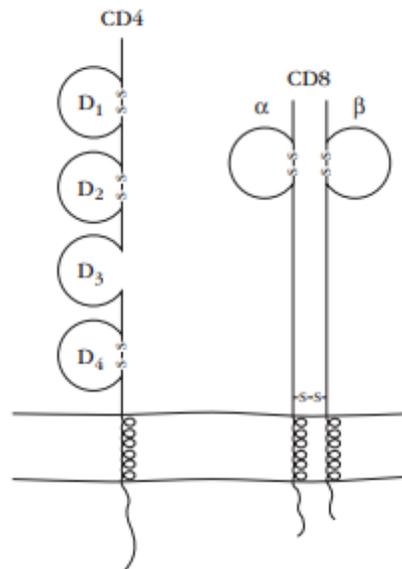


Fig. 12 Estructura general de los correceptores CD4 y CD8; los dominios tipo Ig se muestran como círculos. CD8 adopta la forma de un heterodímero $\alpha\beta$ o un homodímero $\alpha\alpha$. La molécula CD4 monomérica contiene cuatro dominios con plegamiento Ig; cada cadena en la molécula de CD8 contiene uno. Tomado de (Owen, Punt, & Stranford, 2013)

Objetivos

General:

Caracterizar las poblaciones de linfocitos de sangre periférica por citometría de flujo en los ratones hembra CD1^{et/et}. Por otra parte, se evaluará la funcionalidad de los linfocitos usando IL-2 midiendo su proliferación y actividad citotóxica contra células de carcinoma de cérvix INBL mediante un co-cultivo, y finalmente se determinará la susceptibilidad a la aparición de tumores exógenos por la inoculación de células INBL.

Específicos:

1. Extraer linfocitos de ratones hembra CD-1 y CD-1^{et/et} de 6, 12, 18, 24 y 48 semanas de vida.
2. Haciendo uso de los marcadores de membrana CD3, CD4 y CD8 caracterizar las poblaciones de estos linfocitos mediante citometría de flujo.
3. Hacer cultivos de los LSP en presencia de 100 UI de IL-2 y evaluar su proliferación.
4. Realizar co-cultivos de estos linfocitos con células INBL y determinar su actividad citotóxica.
5. Inducir tumores con células INBL en ratones CD1 y CD-1^{et/et} de 6, 12, 18, 24 y 48 semanas de vida.

Antecedentes

En el campo de la investigación, el uso de animales de laboratorio como modelos de trabajo es muy importante para la reproducibilidad de resultados. Por lo cual deben estar bien caracterizados.

El ratón CD1^{et/et} es una mutante de la cepa CD1, que ha sido usado como modelo del síndrome de Sjögren y para evaluar la susceptibilidad a diferentes agentes infecciosos.

Hasta el momento solo se han identificado algunas fracciones de las proteínas séricas del ratón CD1^{et/et}, por lo cual, es de interés continuar con la caracterización de este modelo determinando las poblaciones de linfocitos en sangre periférica y su posible aplicación en investigación oncológica.

Hipótesis

Se sabe que el ratón hembra CD-1^{et/et} al alcanzar las 12 semanas de vida sufre una involución en su timo, presentando un nódulo tímico; por lo cual, al realizar una caracterización de linfocitos a partir de esta edad se espera encontrar poblaciones de células inmaduras y por lo tanto una actividad citotóxica disminuida contra células de carcinoma de cérvix. La respuesta inmune deficiente contra las células tumorales permitirá proponer un nuevo modelo de inducción de tumores.

Material y método

Material biológico.

Ratones hembra de la cepa CD-1 y de su mutante CD-1^{et/et}, se mantuvieron en el bioterio de la FES-Zaragoza, con periodos de día y noche controlados y a libre demanda de alimento y agua.

Línea celular CaCu: INBL estadio IV B, VPH 18, establecida en el Laboratorio de Oncología Celular (LOCE) de la FES Zaragoza. La línea celular se cultivará en botellas triples con medio de cultivo RPMI 1640 (MICROLAB) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) (GIBCO) en una incubadora (Scientific) a una atmosfera de 5% de CO₂, a una temperatura de 37°C y con humedad saturante.

Cultivo Celular.

La línea celular INBL se cultivó en botellas de 525 cm² (Thermo Scientific). Para obtener las células a utilizar se usó Verseno durante 15 minutos para despegarlas de las botellas, se colocaron en tubos cónicos de 50 mL (Corning) y se centrifugaron por 5 min a 1500 rpm para obtener el botón celular. Se resuspendieron, se evaluó la viabilidad celular por exclusión con azul tripano (Sigma) y se calculó la densidad celular por conteo en la cámara de Neubauer (American Optical) para obtener la cantidad de células necesarias para cada ensayo.

Extracción de linfocitos

Con la finalidad de obtener linfocitos, los ratones hembra de la cepa CD-1 y CD-1^{et/et} de 6, 12, 18, 24 y 48 semanas fueron anestesiados y mediante un corte axilar se recolectaron de 1.0 a 1.5 mL de sangre en tubos con heparina (PiSA) como anticoagulante.

En un tubo cónico de vidrio se colocaron 5 mL de Histopaq (GE Healthcare) a los cuales se les agregó la sangre en proporción 1:1, dejándola caer por las paredes lentamente, cuidando de no romper la interfase formada entre el Histopaque y la sangre.

Una vez adicionada la sangre se colocaron los tubos en la centrífuga, sin agitarlos ni destaparlos; se centrifugaron durante 30 minutos a 2500 rpm y se sacaron al terminar el ciclo de centrifugación sin utilizar freno. Transcurrido el tiempo se retiró

el anillo de células mononucleares introduciendo con precaución la punta de la micropipeta para no romper las interfases formadas entre el suero-células mononucleares-Histopaque.

Las células recuperadas se centrifugaron nuevamente a 2500 rpm durante 15 minutos y el botón celular se resuspendió en 1 mL de medio RPMI 1640 al 20% de SFB dejándolos en cultivo durante 3 horas para que los monocitos se adhirieran a la superficie, los linfocitos que quedaron en el sobrenadante se recuperaron y se contaron usando la cámara de Neubauer.

Caracterización de las poblaciones de LSP

Se depositaron aproximadamente 1 millón de LSP en siete microtubos de 1.5 ML que se etiquetaron con las siguientes condiciones.

- Control
- Anticuerpo contra CD3 (por duplicado)
- Anticuerpo contra CD4 (por duplicado)
- Anticuerpo contra CD8 (por duplicado)

Se centrifugaron los micro tubos a una velocidad de 2500 rpm durante 5 minutos y se decantó el sobrenadante, se colocaron 100 μ L del anticuerpo Alexa Fluor 700 anti-mouse CD3, CD4 y CD8 (BioLegend) en el micro tubo correspondiente, se dejó incubar a 4°C durante 1 h, se lavaron las células dos veces mediante centrifugación 2500 rpm/5 min, se retiró el sobrenadante y se fijaron con 100 μ L de paraformaldehído durante 10 min a 4°C. Posteriormente las muestras se lavaron una vez más, se retiró el sobrenadante, se colocaron 500 μ L de PBS filtrado y se transfirieron a tubos FACS para analizar en citómetro de flujo.

Ensayo de citotoxicidad

En una placa de 96 pozos se colocaron 5000 células INBL y se fijaron con paraformaldehído durante 10 min, posterior a esto se retiró el sobrenadante, se colocaron 100 µL de medio RPMI al 20% de SFB, se adicionaron 50,000 LSP y se dejaron en co-cultivo durante 7 días. Pasado este tiempo se recuperaron los LSP del sobrenadante del cultivo y se colocaron en un nuevo pozo donde previamente se colocaron 5,000 células INBL, este nuevo co-cultivo se dejó incubar durante 3 horas. Por último, se retiró el sobrenadante y se lavaron los pozos con PBS para retirar restos celulares; se separaron las células INBL aun adheridas a la placa con verseno, se tomaron 10 µL de la suspensión celular la cual se transfirió a un microtubo y se resuspendió con 10 µL de una solución de azul tripano y se procedió a determina la densidad celular viable en la cámara de Neubauer.

Con estos datos se calculó de manera indirecta el porcentaje de citotoxicidad mediante el cálculo de la disminución de la densidad celular. Este ensayo se realizó por triplicado.

$$\%Citotoxicidad = \frac{\# \text{ células INBL finales}}{\# \text{ de células INBL iniciales}} * 100$$

Ensayo de proliferación

Se colocaron 3×10^6 LSP en cultivo con 100 UI de IL-2 en medio RPMI 1640 al 20% de SFB durante 48 hrs. Posterior a esto se tomaron 10 µL de esta suspensión celular y se trasfirió a un microtubo donde se re suspendió con 10 µL de azul tripano, se contaron los LSP obtenidos después del periodo de cultivo haciendo una cámara de Neubauer y eliminado los LSP muertos al excluir del conteo los teñidos por azul tripano. Así, de manera indirecta se determinó la proliferación de los LSP. Esto se realizó por triplicado.

Inducción de tumores en ratones CD1 y CD1^{et/et}

Se establecieron cultivos de la línea celulares de CaCu INBL en medio RPMI-1640 al 10% de SFB, cuando estuvieron en fase exponencial se despegaron de las cajas de cultivo con verseno y se resuspendieron 8 millones de células en 0.5ml de medio RPMI 1640 sin suero, por cada ratón a tratar. Se usaron 3 ratones de cada cepa (CD1 y CD1^{et/et}) de 6,12,18,24 y 48 semanas de vida. La suspensión de células se inyectó de inmediato a los ratones de forma intraperitoneal (i.p.) en el área abdominal cercana a las patas traseras. Después de la inyección de las células los ratones continuaron en sus jaulas con libre demanda de alimento y agua durante 15 días.

Posteriormente, los ratones fueron sacrificados por asfixia en cámara y dislocación craneal. Se realizó la disección del área abdominal y se buscaron los tumores dentro y fuera de la cavidad peritoneal, y se calculó la carga tumoral.

Análisis estadístico

Para realizar la comparación de medias entre las poblaciones de linfocitos y observar cómo cambian respecto a la edad se realizó un análisis de ANOVA seguido de una prueba de Tukey. Para saber si hay cambios significativos en los datos obtenidos del ensayo de proliferación y citotoxicidad se realizó una T de student para comparar las medias por cepa a las diferentes edades probadas. Se consideró una confianza de 95% utilizando el programa Statistical Package for Social Sciences (SPSS) versión 25.

Resultados

Poblaciones de LSP CD3, CD4 y CD8 en ratones hembra de la cepa CD1

En los histogramas de la Fig. 13 se observa que las poblaciones de linfocitos extraídos son CD3, CD4 y CD8 positivos y que tienden a cambiar su proporción en función de la edad de los ratones. En los ratones de 6 semanas de vida (Fig. 13-A) se observa la expresión de CD3, de la población positivo a este marcador 78.21% son CD4 positivos y 27.79% son CD8 positivos, es decir una proporción aproximada de 2:1 de linfocitos CD4:CD8. Los resultados obtenidos para los ratones de 12, 18 y 24 semanas son muy similares a los obtenidos para la muestra de 6 semanas (Fig. 13-B, C, D). Sin embargo, en los LSP de ratones de 48 semanas (Fig. 13-E) hay un aumento significativo, en el porcentaje de linfocitos CD4 positivos llegando a ser el 81% del total de CD3⁺, mientras que la población CD8 fue de 27%. El traslape en las poblaciones CD4 y CD8 en los LSP CD3⁺ nos permite especular que a esta edad aparecen linfocitos con una doble marca CD4-CD8⁺.

Una vez conocido el fenotipo de las poblaciones de linfocitos de la cepa CD1, se procedió a realizar la determinación, por citometría de flujo, de los LSP CD3, CD4 y CD8 en la cepa mutante del ratón CD1 conocida como CD1^{et/et}.

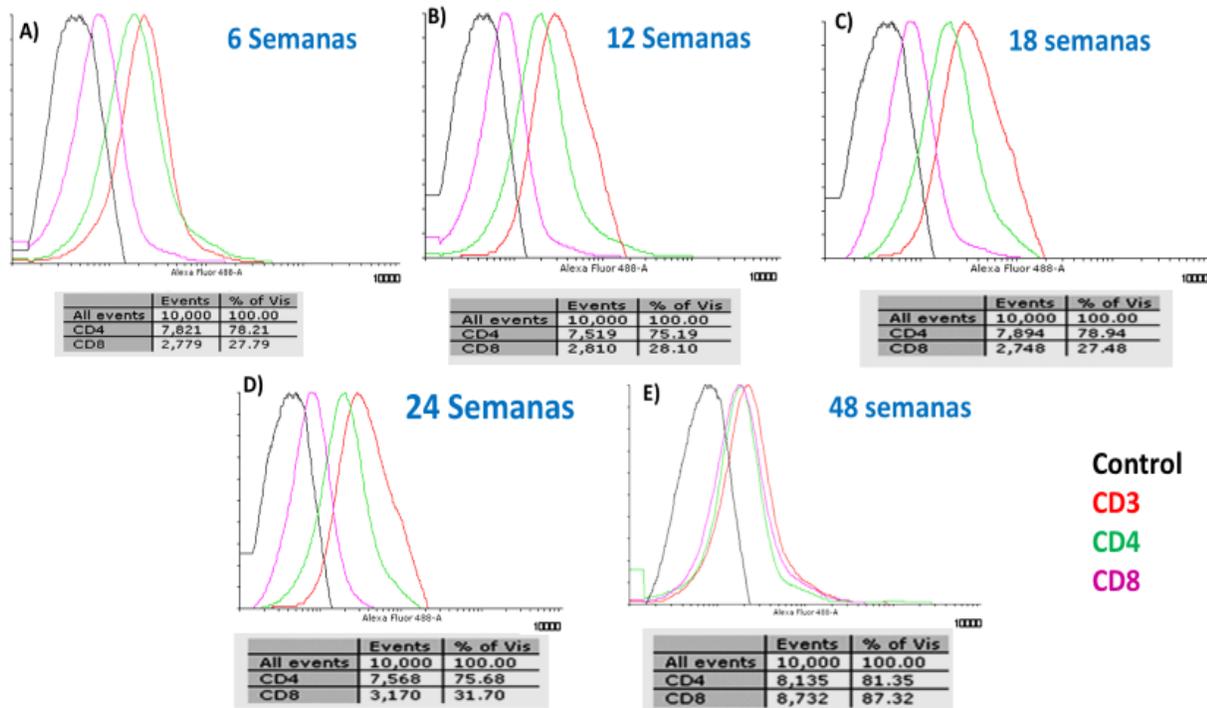


Fig. 13 Histogramas representativos de la expresión de los receptores CD3, CD4 y CD8 en LSP de ratones hembra de la cepa CD1. Análisis de la expresión de CD3, CD4 y CD8, A) Ratones de 6 semanas. B) Ratones de 12 semanas C) Ratones de 18 semanas. D) Ratones de 24 semanas. E) Ratones de 48 semana. Ensayo realizado por triplicado

Poblaciones de LSP CD3, CD4 y CD8 en ratones hembra de la cepa CD1^{et/et}

La muestra de sangre de ratones de 6 semanas de vida (Fig. 14-A) indica que de la población de LSP positiva a CD3 el 64% son CD4 mientras que el 33% son CD8, en una relación 2:1 de CD4:CD8. En la muestra de sangre de ratones de 12 semanas (Fig. 14-B) se observa un incremento de la población de linfocitos CD8 positivos con un 56%. En las muestras de ratones de 18 semanas (Fig. 14-C), de forma inesperada la población de linfocitos CD4 y CD8 presentan el mismo porcentaje con 96%, de igual manera que con el modelo CD1, estos datos sugieren la presencia de un linfocito doble positivo. En la muestra de 24 semanas (Fig. 14-D) aumentó 2% el porcentaje de linfocitos CD4 positivos, con respecto a la muestra de 18 semanas, obteniendo 98%, mientras que los linfocitos CD8 positivos se mantienen en 96%. En la muestra de sangre de ratones de 48 semanas (Fig. 14-E)

los LSP no muestra cambio en la proporción de las poblaciones de CD4 y CD8 en comparación a la muestra de 24 semanas. Estos datos nos permiten especular la presencia de linfocitos doble positivos.

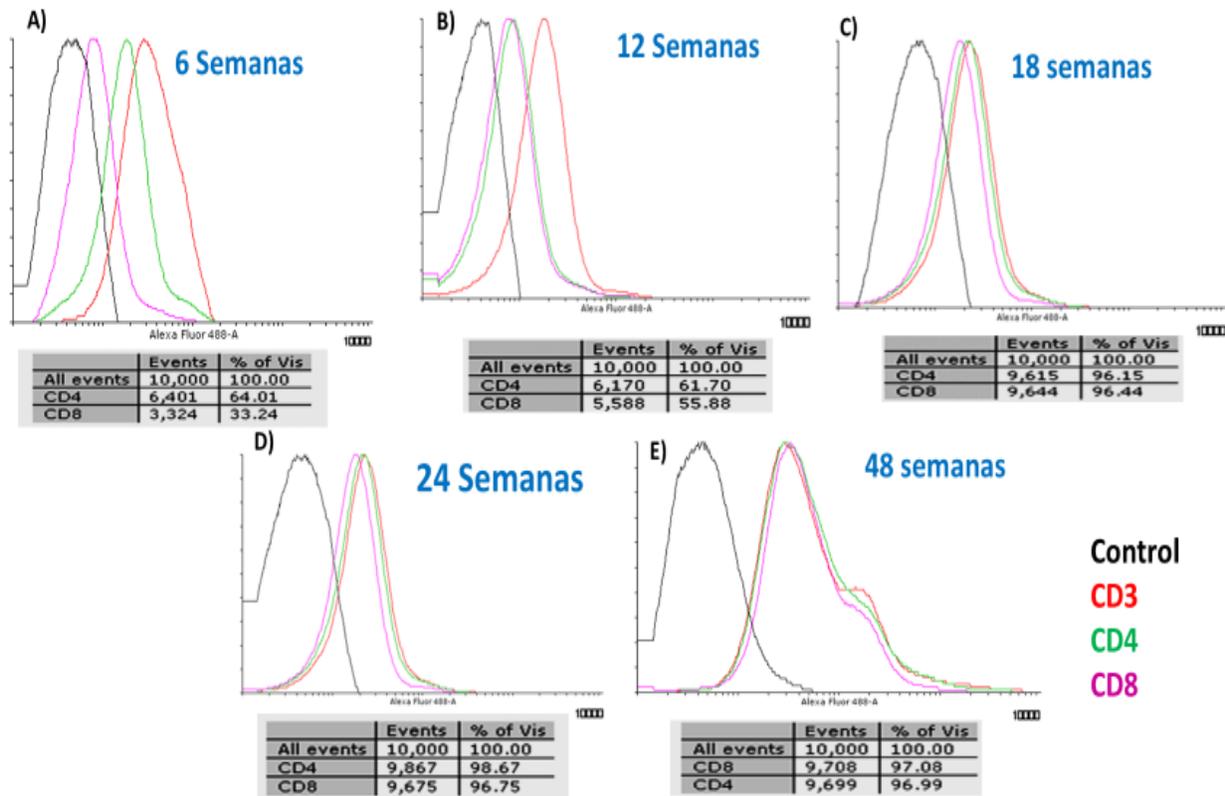


Fig. 14 Expresión de los receptores CD3, CD4 y CD8 en LSP de ratones hembra de la cepa CD1^{et/et}. Análisis de la expresión de CD3, CD4 y CD8, A) Ratones de 6 semanas. B) Ratones de 12 semanas C) Ratones de 18 semanas. D) Ratones de 24 semanas. E) Ratones de 48 semanas.

A manera de resumen y para observar con mayor claridad la tendencia de la relación de LSP CD4:CD8 en ratones de diferentes edades de las cepas CD1 y CD1^{et/et} se graficaron los porcentajes de ambas poblaciones (Fig. 15). Se observa en los ratones CD1 de las 12 y 24 semanas una proporción semejante, a las 48 se ve un incremento en ambos fenotipos, sugiriendo la presencia de linfocitos dobles positivos; lo mismo se observa en el ratón CD1^{et/et} desde las 18 semanas de vida.

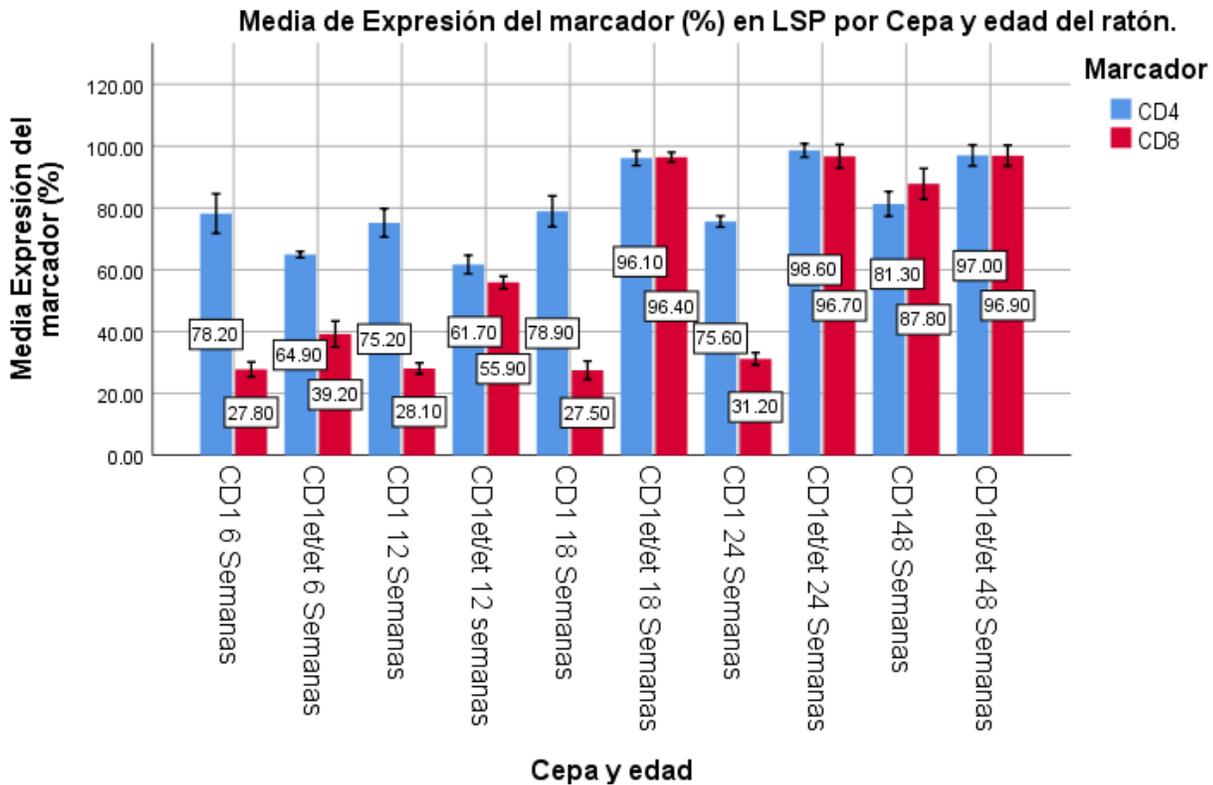


Fig. 15 Porcentaje de expresión de los receptores de membrana CD4 y CD8 de LSP de ratones hembra CD1 y CD1^{et/et} a diferentes edades. Azul: CD1/CD4+. Naranja: CD1/CD8+. Gris: CD1^{et/et}/CD4+. Amarillo: CD1^{et/et}/CD8+. Representación promedio de 3 repeticiones realizadas.

Se realizó una prueba estadística de ANOVA, en el modelo CD1 no se observaron diferencias significativas ($p=0.054$) en el porcentaje de expresión de CD4, para el receptor CD8, no hay cambios significativos ($p=0.084$) desde las 6 a las 24 semanas, siendo hasta las 48 semanas donde se ve un incremento en el porcentaje de expresión ($p=1.0$) como se observa en la Fig. 15.

En el caso de la cepa CD1^{et/et} se observan diferencias estadísticas en la expresión del marcador CD4, en la cual las edades 18, 24 y 48 semanas quedan agrupadas ($p=0.188$) como las de mayor porcentaje de expresión teniendo diferencias significativas ($p=0.00$) con las edades 6 y 12 que son agrupadas como las de menor porcentaje de expresión ($p=0.068$). Respecto al marcador CD8 se comportó de manera semejante al CD4, agrupando a las edades 6 y 12 ($p=0.092$) y 18,24 y 48 ($p=1.00$), por lo cual, hay diferencias en la expresión de este marcador ($p=0.00$) desde las 12 semanas manteniéndose incrementado hasta las 48 semanas.

Ensayo de proliferación

Se evaluó la capacidad proliferativa de los LSP extraídos de los ratones, para ello y se cultivaron *in vitro* en presencia de 100 UI/ml de IL-2. Los resultados obtenidos por conteo con azul tripano muestran que los LSP obtenidos de los ratones de ambas cepas conservaron la capacidad de proliferar en presencia de IL-2. La proliferación en LSP de los ratones CD1 es mayor a cualquier edad comprada con los obtenidos de los ratones CD1^{et/et}; además, la proliferación va decreciendo en ambas cepas conforme avanza su edad (Fig. 16). En ambas cepas se observa un patrón de decaimiento en el número de LPS conforme el ratón crece.

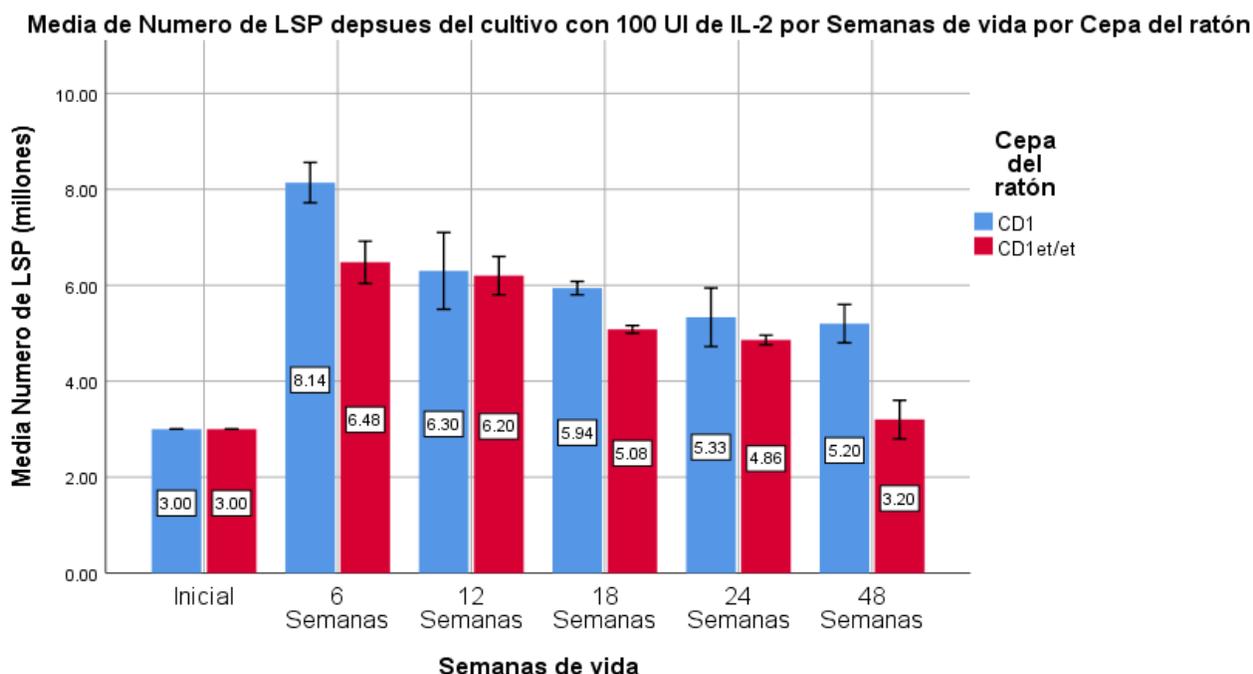


Fig. 16 Efecto de la IL-2 sobre la proliferación de linfocitos de sangre periférica (LSP). Se cultivaron 3 millones de linfocitos en presencia de 100U IL-2. La proliferación de los linfocitos fue evaluada en 48 horas de cultivo por conteo. Representación promedio de 3 repeticiones.

Para saber si hay diferencias significativas se analizaron por medio de una T de Student las medias entre cada edad de ratón. A las 12 y 24 semanas no hay diferencias significativas en la cantidad de LSP después del cultivo ($p=0.718$, $p=0.057$ respectivamente). en el caso de las 6, 18 y 48 semanas se observan diferencias manteniéndose en mayor cantidad los LSP de la cepa CD1 ($p=0.001$, $p=0.000$, $p=0.000$).

Citotoxicidad de los linfocitos de las cepas CD1 y CD1^{et/e}

Una vez confirmada la capacidad de proliferación de los linfocitos obtenidos de la sangre de ambas cepas de ratón, se procedió a evaluar de manera indirecta la actividad citotóxica de los LSP sobre células tumorales de la línea INBL, calculando la viabilidad de las células tumorales después de un cultivo con LSP previamente activados. Para ello se realizaron co-cultivos con células de carcinoma de cérvix INBL, con LSP con células INBL fijadas. Los resultados indican que los LSP provenientes de ratones de la cepa CD1 de 24 semanas de vida, tienen activada citotóxica de 94.3% sobre células INBL. Es importante mencionar que los linfocitos provenientes de ratones CD1 de 48 semanas muestran una disminución de su capacidad citotóxica que llega a 51.3% de lisis de células INBL. En cuanto a los linfocitos provenientes de ratones de la cepa CD1^{et/et} de 12 semanas de vida, podemos mencionar que tienen una actividad citotóxica semejante a la cepa CD1; a la semana 18 y 24 de vida del ratón CD1^{et/et} se disminuye en aproximadamente un 60% la citotoxicidad, mientras que en el modelo CD1 se mantienen sin cambios. A las 48 semanas de vida de ambas cepas, se observa una disminución significativa de la capacidad citotóxica, en el caso de la cepa CD1 se pierde un 50% y en la cepa CD1^{et/et} la citotoxicidad disminuyó 25% (Fig. 17).

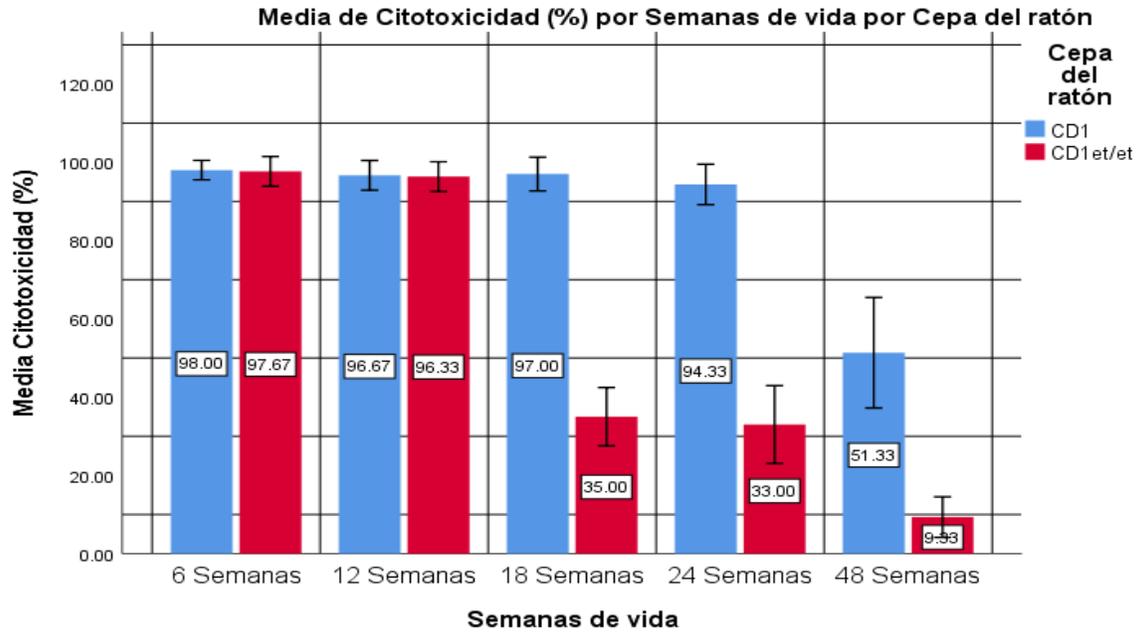


Fig. 17 Porcentaje de citotoxicidad. Se realizó un co-cultivo de LSP capacitados y células INBL vivas en placas de 96 pozos. El porcentaje de células INBL vivas se evaluó después de 3 horas por conteo con azul tripano. Representación promedio de 3 repeticiones realizadas.

La prueba de T de Student mostro que no hay diferencias significativas en las 6 y 12 semanas de vida entre ambas cepas ($p= 0.678$, $p=0.802$): sin embargo, las edades 18, 24 y 48 mostraron diferencias entre ambas cepas ($p=0.000$, $p=0.000$, $p= 0.001$) comprobándose la disminución de la citotoxicidad en la cepa CD1^{et/et}.

Inducción de tumores en ratones de la cepa CD1

Morán H, 2000 (Moran, 2000) usó la cepa CD1 para probar si es un buen modelo para inducir tumores, en esa oportunidad ella reporta que los ratones hembras de la cepa CBA desarrollaron tumores de tamaño pequeño. Con base a estos datos en el presente trabajo se utilizaron las mismas edades de ratones hembras de 6, 12, 18, 24 y 48 semanas para la inducción de tumores con células de la línea INBL. Después de 15 días de la inoculación de las células de carcinoma de cérvix se sacrificaron los ratones y se realizó la disección en busca de masas tumorales. En ningún ratón de esta cepa se encontraron crecimientos tumorales.

Inducción de tumores en ratones de la cepa CD1^{et/et}

Una vez obtenidos los datos del crecimiento tumoral en ratones de la cepa CD1, se procedió a realizar la inducción en ratones CD1^{et/et}. En los ratones de 6 y 12 semanas no se observó crecimiento tumoral después de los 15 días (Fig. 18). En cuanto a los ratones de 18 semanas en dos ratones se observaron crecimientos tumorales en intestino delgado uno de 4 mm y otro de 3mm. (Fig. 19). En los ratones de 24 semanas se observaron crecimientos tumorales en los 3 ratones usados en intestino e hígado de 6, 3 y 1 mm de diámetro en todos los ratones. (Fig. 20). De igual manera, en los ratones de 48 semanas se observaron crecimientos tumorales en intestino e hígado de 1, 4 y 6 mm de diámetro (Fig. 21)

Con las medidas obtenidas de cada tumor se procedió a calcular la carga tumoral, los datos obtenidos se graficaron (Fig. 22), y se observa que en la cepa CD1 no hay carga tumoral a ninguna edad. En cuanto a los ratones de la cepa CD1^{et/et} se observa una carga tumoral que muestra un aumento directamente proporcional a la edad del ratón.



Fig. 18 Ratón CD1^{et/et} de 6 semanas de vida. Se observa una morfología normal, sin crecimientos tumorales.

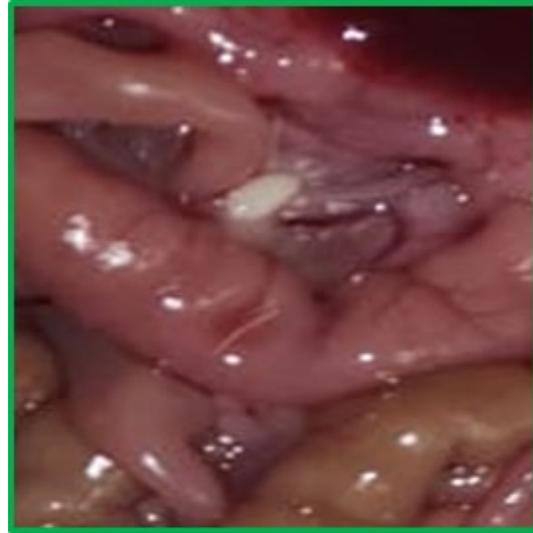


Fig. 19 Ratón CD1^{et/et} de 18 semanas de vida. Se observan dos crecimientos tumorales, ambos en intestino delgado. A.- 4 mm de diámetro. B.- 3 mm de diámetro

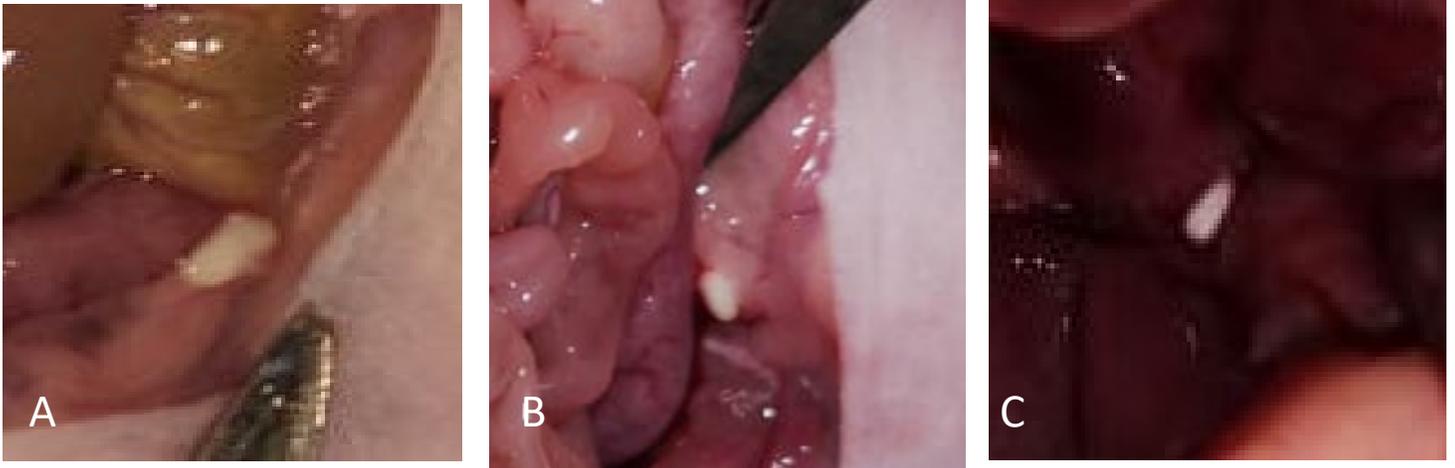


Fig. 20 Ratón CD1^{et/et} de 24 semanas. Presenta tres crecimientos tumorales. A.- 6mm en intestino. B.- 1 mm en intestino. C.- 3 mm en hígado.

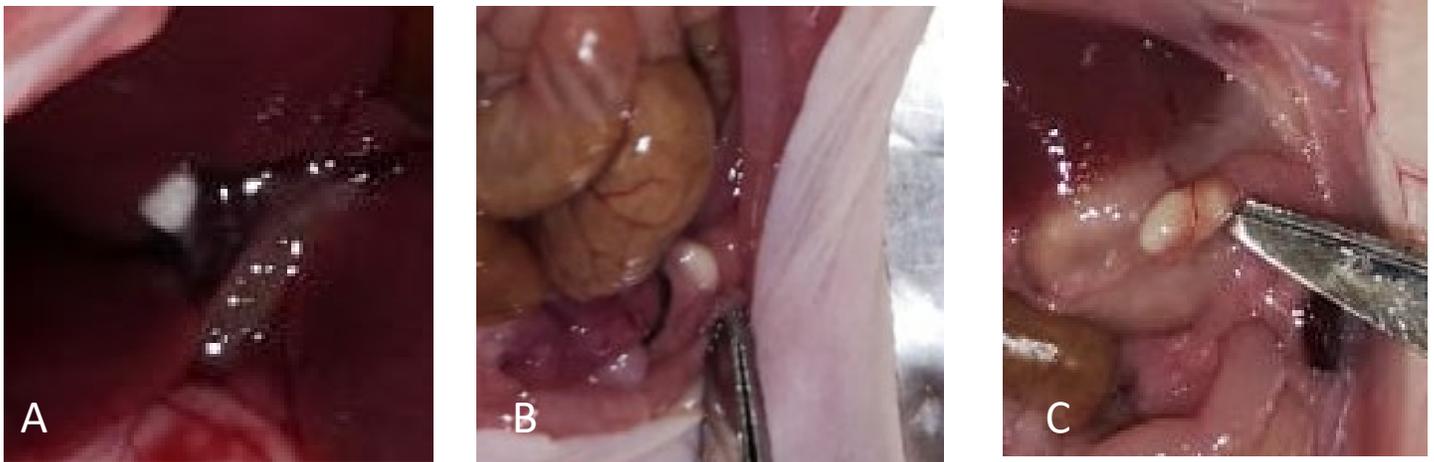


Fig. 21 Ratón CD1^{et/et} de 48 semanas. Presento 3 crecimientos tumorales. A.- 1mm en hígado. B.- 4 mm en intestino. C.- 6 mm en intestino

F

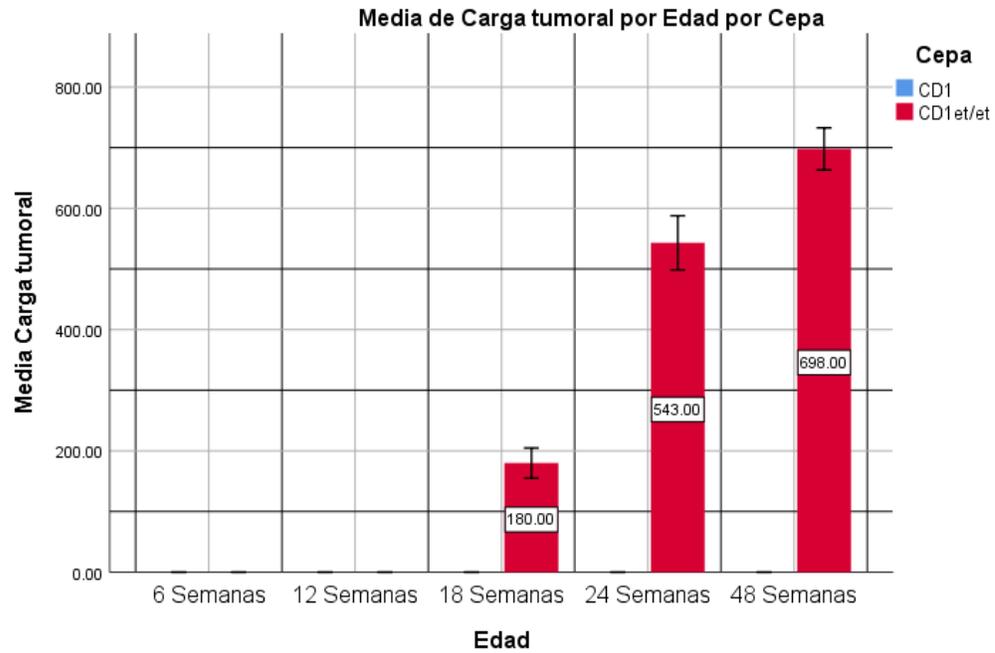


Fig. 22 Carga tumoral promedio por edad de ratón de cada cepa. El volumen tumoral se estimó a partir de la fórmula $\frac{4}{3}\pi r^3$, donde r es el radio del tumor en mm.

Discusión de resultados

En la actualidad se cuenta con dos modelos murinos consanguíneos importantes y útiles en la investigación de trasplantes e investigación en cáncer, que son los ratones *nu/nu* y *scid*. Los cuales tienen un sistema inmunitario deficiente o nulo respectivamente. Debido a su inmunodeficiencia estos ratones son capaces de recibir injertos tumorales y tisulares de muchas especies diferentes sin sufrir una reacción de rechazo, además de generar crecimientos tumorales en un tiempo corto de alrededor de 10 a 15 días (Janeway CA, 2001). Por la dificultad de reproducción y mantenimiento en condiciones de esterilidad, estos ratones son costosos. Es por ello que se realizaron trabajos de investigación (Moran, 2000), en otras cepas de ratones que ofrezcan un sistema inmune deficiente y que sean de fácil reproducción y mantenimiento en el bioterio, que permitan la inducción de tumores en 10 o 15 días, tal es el caso de la cepa de ratones CD1^{et/et}

Con esta metodología se buscó comprobar si el modelo CD1^{et/et} que tenemos de forma accesible y económica en el bioterio de la Facultad, es una opción adecuada para la inducción de tumores sin tener que inmunodeprimirlo.

Con este propósito y para conocer las poblaciones CD4 y CD8 se realizó un análisis de LSP de las cepas de ratones CD1 y CD1^{et/et}. Los resultados obtenidos en los ratones CD1 mostraron que los linfocitos de ratones de 6 hasta 24 semanas de vida mantienen una proporción aproximada de 2:1 de linfocitos CD4:CD8, esto concuerda con lo reportado por Basurto y colaboradores (2000) quien realizó la comparación de estas poblaciones; sin embargo, su estudio no especifica la edad del ratón. Por otro lado, la determinación de poblaciones de LSP de ratones hembra de 48 semanas de vida, sorprendentemente presentan un incremento en ambas poblaciones sugiriendo la presencia de linfocitos dobles positivos CD4 y CD8 que propone la involución del timo y por lo tanto pérdida de su actividad citotóxica. Con estos resultados contribuimos al conocimiento del estado de las poblaciones de linfocitos CD4 y CD8 en la cepa de ratones CD1.

De manera sorprendente e importante observamos que los LSP de ratones CD1 de 48 semanas muestran lo que pueden ser poblaciones con un fenotipo doble

positivo, lo que implica que a esta edad el ratón sufre la involución de su timo, dato que es congruente con el envejecimiento ya que se ha reportado (Kindt, Goldsby, & Osbome, 2013) que los mamíferos al envejecer su timo sufren una involución gradual, por lo cual, la maduración de los pre linfocitos no se completa y quedan con un fenotipo doble por la falta de actividad de ThPOK. Además, se ha reportado (Clenet, Gagnon, & Moratalla, 2017) que un linfocito doble positivo también expresa el marcador CD45RO y CCR7, lo que los caracteriza como linfocitos de memoria central que circulan en el organismo con la actividad citotóxica de un linfocito de memoria normal, lo que permite, en el envejecimiento, que se conserve la capacidad citotóxica contra patógenos ya reconocidos, pero impidiendo la respuesta inmune contra patógenos que no han sido reconocidos (Clenet, Gagnon, & Moratalla, 2017).

Por otro lado, Kin y colaboradores en 2006 (Kin, Kim, & Yu, 2006), sugirieron que los linfocitos dobles positivo expresan inicialmente el marcador CD4, por un mecanismo aun no aclarado completamente ya que algunos autores mencionan que los LSP doble positivo se originan por una regulación ascendente de Runx3 y una posterior regulación descendente de ThPOK. Otra teoría sugiere que la expresión de CD8 se da por la pérdida de la expresión de ThPOK sobre el linfocito CD4 al salir del timo, por lo cual se teoriza que la aparición temprana de CD4 es la responsable de que muy pocas veces se observen, en sangre linfocitos doble positivo con capacidad citotóxica y se presenten con mayor frecuencia como linfocitos reguladores. (Overgaard & Steptoe, 2014) (Egawa & Littman, 2008).

El modelo CD1^{et/et} posee linfocitos dobles positivo de memoria, hecho que se puede explicar porque a pesar de no tener un timo funcional este modelo de ratón se puede reproducir perfectamente en condiciones de bioterio a diferencia del modelo nu/nu (Vigano, Lissoni, & Barni, 1997). De igual manera que en el modelo CD1, los linfocitos dobles positivo expresan CD45RO que les permite conservar memoria inmunológica contra patógenos que ya han estimulado el sistema inmune.

Por ello sería importante comprobar si los linfocitos en este modelo presentan memoria efectora, para lo cual Sala y colaboradores (Sala, Tonutii, & Feruglio, 1993) han propuesto una técnica en donde se produce una infección en animales

inmunocompetentes para luego generar una inmunodeficiencia en la que se expresen linfocitos doble positivos y evaluar su capacidad de memoria efectora.

Clenet y colaboradores (Clenet, Gagnon, & Moratalla, 2017), propusieron que los linfocitos dobles positivos a pesar de ser linfocitos inmaduros conservan la capacidad de responder al estímulo con IL-2 e IL-15. Nuestros resultados indican que la estimulación con 100 UI de IL-2 activa los linfocitos de ambas cepas de todas las edades a proliferar, lo que podría explicarse ya que se ha publicado (Janeway CA, 2001) que el receptor de la IL-2 se expresa en etapas muy tempranas del proceso de maduración del linfocito, por lo cual, los LSP de los ratones CD1^{et/et} siguen teniendo la capacidad de proliferar, esto sugiere que aunque la timo involucionó aún conserva la capacidad de favorecer la expresión el receptor para la IL-2 (Janeway CA, 2001).

Los datos obtenidos por citometría y los proporcionados por los experimentos de proliferación de los LSP, nos permitieron realizar un ensayo de citotoxicidad para comprobar si los linfocitos de los ratones CD1 conservan su actividad citotóxica contra células de carcinoma de cérvix de la línea INBL.

Tomando el modelo de citotoxicidad reportado por Rangel y colaboradores (Rangel, 1995), que muestran que linfocitos activados en co-cultivo con células tumorales previamente fijadas y posteriormente estos LSP son retadas con células tumorales vivas fueron 100% eficaces para eliminarlas; se utilizó este mismo modelo para evaluar la actividad citotóxica de los linfocitos extraídos de ratones de 48 semanas de las cepas CD1 y CD1 et/et

Los LSP de ratones CD1 de menos de 48 semanas de vida, mostraron una eficaz actividad citotóxica contra las células tumorales, con una disminución aproximada de 50%, probablemente atribuible al envejecimiento de éstos LSP, provocada por la involución del timo que evitaría una correcta maduración de los linfocitos (Mocchegiani, y otros, 2002).

Respecto a los linfocitos provenientes de los ratones CD1^{et/et} que mostraron una pérdida muy acelerada de su actividad citotóxica, teniendo su mejor actividad

citotóxica a las 12 semanas comparable a la actividad disminuida del modelo CD1 de 48 semanas, podemos sugerir que el modelo CD1^{et/et} produce LSP dobles positivos con una capacidad reducida para lisar células tumorales comparada con el modelo CD1, ya que se observó una pérdida de aproximadamente el 60% de citotoxicidad desde las 18 semanas de vida en las muestras de ratones de la cepa CD1^{et/et} estos datos nos sugieren que esta cepa a partir de las 18 semanas de vida podría ser un modelo útil para inducción de tumores.

Tomando el modelo de inducción de tumores reportado por Moran (Morán H, 2000) se realizó un experimento preliminar de inducción de tumores en ratones de la cepa CD1 y CD1^{et/et} sin la inmunodepresión previa a la inducción.

Se usó el modelo CD1 como control de ratón con un sistema inmune funcional y como se esperaba no hubo crecimientos tumorales en este modelo.

En el caso del ratón CD1^{et/et} se observaron crecimientos tumorales desde las 18 semanas de vida. El haber obtenido crecimiento tumoral en ratones CD1^{et/et} es un excelente hallazgo ya que son ratones que no tiene que ser inmunodeprimidos para desarrollar tumores de fuentes exógenas.

El número de tumores obtenidos en promedio es menor a los obtenidos por Hirán Morán (Moran, 2000), en el modelo CD1 inmunodeprimido; sin embargo, logramos obtener una carga tumoral mayor, ya que (Moran, 2000) informó de una carga tumoral máxima de 170mm³, mientras que en el modelo CD1^{et/et} desde las 18 semanas de vida obtuvimos una carga de 180mm³ y ésta aumentó con la edad.

Lo anterior indica que este modelo es mucho mejor porque no requiere tiempo previo de inmunodepresión y se obtiene una carga tumoral mayor lo que facilita los estudios de regresión tumoral.

Cabe resaltar que aunque obtuvimos mejor crecimiento tumoral que con ratones inmunodeprimidos con hidrocortisona, los ratones inmunodeficientes nu/nu mejorados o los scid son los modelos ideales para inducción de tumores, ya que aunque los ratones CD1^{et/et} no presentan un timo funcional, la respuesta inmune de este ratón a edades avanzadas puede ser mediada por células asesinas activadas

por linfocitos (LAK) y células asesinas naturales (NK) (Vigano, Lissoni, & Barni, 1997). Por lo anterior, sería importante realizar la determinación de poblaciones de linfocitos NK en el modelo CD1^{et/et} e investigar si la cantidad de estas células es dependiente de la edad pues en estudios realizados en humanos se han detectado variaciones en la inmunidad innata durante el envejecimiento, se reporta que el número de células NK se incrementa con la edad, pero que producen menos INF- γ y quimiocinas como respuesta a la IL-2 y a la IL-6. (Solana & Mariana, 2000). Lo que implicaría que estos linfocitos NK pierdan la capacidad de responder a estímulos, por lo cual se podría ver una disminución en la respuesta contra las células tumorales en el modelo CD1^{et/et} adulto o envejecido.

Los datos obtenidos en esta investigación resaltan la importancia de continuar con estudios relacionados con el modelo CD1^{et/et}.

Conclusiones

La caracterización de las poblaciones de LSP del modelo CD1^{et/et} sugiere la presencia de linfocitos con un fenotipo doble positivo a partir de las 24 semanas de vida, lo cual se observa hasta las 48 semanas en el modelo CD1.

Los LSP de ambas cepas conservaron la capacidad de proliferar en presencia de 100 UI de IL-2, a todas las edades probadas con una tendencia de disminución al avanzar la edad.

La actividad citotóxica disminuye en la cepa CD1^{et/et} a partir de las 18 semanas, lo que se observa en la cepa CD1 hasta las 48 semanas de vida.

Sin duda, uno de los aportes más importantes de este trabajo es dar evidencia del uso del modelo CD1^{et/et} para inducción de tumores de carcinoma de cérvix.

Referencias

- (US), N. R. (1998). *Use of Laboratory Animals in Biomedical and Behavioral Research*. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK218262/>
- Aysun, A., Gunel, A., Yugmue, B., & Yusuf, B. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 163-176.
- Balls M. (1994). Replacement of animal procedures: alternatives in research, education and testing. *Lab Anim*, 193-211.
- Barquera, S., & Tolentino, L. (2005). Geography of the diseases associated with nutrition in Mexico: A perspective of epidemiological transition. *Population*, 133-149.
- Barrett, K., Barman, S., Boitano, S., & Brooks, H. (2010). *Ganong. Fisiología Médica*. México: McGraw-Hill.
- Basurto, F., Mondragon, R., & Atilano, D. (2000). Comparación de las constantes fisiológicas sanguíneas de los ratones CD1, heterocigoto et/+ y desnudo et/et. *Vet*, 31(3).
- Batista-Duharte, A. (2003). Función del sistema inmune en la defensa contra tumores malignos. *MEDISAN*, 75-88.
- Benavides, F., & Guénet, J. (2003). *Manual de genética de roedores de laboratorio: Principios básicos y aplicaciones*. Madrid: SECL.
- Benavidez, F., & Genet, J. (2001). Modelos murinos de enfermedades humanas. *Medicina*, 215-231.
- Berek, C., & Ziegner, M. (1993). The maturation of the immune response. *Immunol Today*, 400-404.
- Beura, L., Hamilton, S., Bi, K., Odumade, O., & Casey, K. (2016). Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice. *Nature*, 532, 512-516.
- Blach, C., Bleyer, A., & Krakoff, I. (1990). The vital role of animal research in advancing cancer diagnosis and treatment. *Cancer Bulletin*, 42, 266-269.
- Bosch, F., & Broket, T. (2013). Comprehensive control of human papillomavirus infections and related diseases. *Vaccine*, 11-31.
- Bray, F., & Ferlay, M. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *Cancer Journal for Clinicians*, 394-424.
- Brostoff, J., Male, D., & Roitt, I. (2000). *Inmunología* (5 ed.). Madrid: Elsevier.
- ccac.ca. (2016). *Ottawa: Canadian Council on Animal Care in Science*. Obtenido de http://www.ccac.ca/en_/standards/guidelines
- Chang, H., Tan, K., & Parisini, E. (2005). Structural and mutational analyses of a CD8alpha beta heterodimer and comparison with the CD8alpha alpha homodimer. *Immunity*, 661-667.

- Clenet, M., Gagnon, F., & Moratalla, A. (2017). Peripheral human CD4+CD8+ T lymphocytes exhibit a memory phenotype and enhanced responses to IL-2, IL-7 and IL-15. *Nature*, 1-15.
- Cooper, G. (2000). *The cell: molecular approach* (2ds ed.). Sinaure Associates.
- Council, I. o. (2002). *Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio*. México: Academia Nacional de Medicina.
- Di, V., C, Mikulak, J., Zaghi, E., & Marcenaro, E. (10 de May de 2019). NK cells to cure cancer. *Seminars in Immunology*, 1-44.
- Doke, S., & Dhawale, S. (2015). Alternatives to animal testing: A review. *Saudi Pharm J.*, 223-229.
- Doorbar, J. (2012). The Biology and Life-Cycle of Human Papillomaviruses. *Vaccine*, 55-70.
- Egawa, T., & Littman, D. (2008). ThPOK acts late in specification of the helper T cell lineage and suppresses Runx-mediated commitment to the cytotoxic T cell lineage. *Nat. Immunol.*, 1131-1139.
- Eljaafari A, Y. O. (2013). Isolation of human CD4/CD8 double-positive, graft-versus-host disease-protective, minor histocompatibility antigen-specific regulatory T cell and of a novel HLA-DR7-restricted HY-specific CD4 clone. *J Immunol*, 184-194.
- Euhus. (1986). Tumor measurement in the nude mouse. *Journal of surgical oncology*, 229-234.
- F, A.-S., & P, P.-P. (2015). Mortalidad por cáncer en México: actualización 2015. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 28-34.
- Festing, M. (2000). Reduction of animal use: experimental desig and quality of experiment. *Laboratory animal*, 28.
- Festing, M., & Vaughn, S. (2004). The choice of animal model and reduction. *Alternatives to laboratory animal*, 34.
- Foltz, J. (1999). Guidelines for assessing the health condition of mice. *Lab Animal*, 28-31.
- Fritz EA, G. J. (2008). Cellular immune response to marburg Virus infection in Cynomolgus Macaques. *Viral Immunol*, 355-364.
- Genhong, Y., & Hou, Y. (2003). Thymic atrophy via estrogen-induced apoptosis is related to Fas/FasL pathway. *Immunopharmacology*, 4, 213-221.
- Gent, N. (2006). A study in refining husbandry techniques for the in house breeding of rats and mice. *Animal technology and welfare*, 5(1).
- González-Fernández, A., & Lorenzo, S. (2005). Linfocitos T y B. Clasificación. Receptores. Generación de diversidad: mecanismos moleculares. Capacidades funcionales. *Medicine*, 1-24.
- Guillen, J. (2012). FELASA guidelines and recommendations. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 311-321.
- Hanahan, D., & Weinberg, R. (2011). The hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 646-674.

- He, X., Vibhuti, P., Yi, Z., & Xiang, H. (2005). The zinc finger transcription factor Th-POK regulates CD4 versus CD8 T-cell lineage commitment. *Nature*, 826-833.
- Heinonen, T. (2015). Better science with human cell-based organ and tissue models. *Altern Lab Anim*, 29-38.
- Hendriksen, C. (2009). Replacement, reduction and refinement alternatives to animal use in vaccine potency measurement. *Expert Review Vaccines*, 313-322.
- Ho, I., Tzong-Shyuan, T., & Sung-Yun, P. (2010). GATA3 and the T-cell lineage: essential functions before and after T-helper-2-cell differentiation. *Immunol*, 125-135.
- James, S., & Anderson, D. (2015). *Human Histology* (4 ed.). New York: Mosby.
- Janeway CA, T. P. (2001). *Inmunobiología: El sistema inmune en salud y enfermedad*. Nueva York: Garland Science.
- Kariya, R., Matsuda, K., & Gotoh, K. (2014). Establishment of Nude Mice with Complete Loss of Lymphocytes and NK Cells and Application for In Vivo Bio-imaging. *In Vivo*, 28(5), 779-784.
- Kin, Y., Kim, I., & Yu, D. (2006). CD4/CD8 double positive, acute type of adult T-cell leukemia/lymphoma with extensive cutaneous involvement. *Int J Dermatol*, 1193-1195.
- Kindt, T., Goldsby, R., & Osborne, R. (2013). *Inmunología de Kuby* (7a ed.). México: McGraw-Hill.
- Kindt, T., Goldsby, R., & Osborne, B. (2007). *Inmunología de Kuby* (6 ed.). México: McGraw-Hill.
- Kollmus, H., Post, R., Briemeier, M., & et al. (2012). Structural and functional concepts in current mouse phenotyping and archiving facilities. *J Am Assoc Lab Anim Sci*, 418-435.
- Koning, F. (1991). Lymphocyte of the canon design? *Immunol Today*, 100-101.
- Macey, M. (2010). FLOW cytometry: principles and applications. *Principles of flow cytometry*, 1-15.
- Maddon, P., Littman, D., & Godfrey, M. (1985). The isolation and nucleotide sequence of a cDNA encoding the T cell surface protein T4: a new member of the immunoglobulin gene family. *Cell*, 93-104.
- Magalhaesa, D., Juntaa, C., & Mellob, S. (2004). Hybridization signatures during thymus ontogeny reveals modulation of genes coding for T-cell signaling proteins. *Molecular immunology*, 1043-1048.
- Marroquin, R., & Martinez, C. (2007). Autoanticuerpos anti-Ro/ssa, anti-La/ssb y anticuerpos antifosfolipidos, en suero de ratones mutantes et/et que muestra exocrinopatía. *Vet*, 38(3), 347-357.
- Marroquín, R., & Rosas, P. (2000). Comparación de las constantes fisiológicas sanguíneas de los ratones CD11, heterocigótico et/+ y desnudo et/et. *Veterinaria México*, 209-216.
- Marroquin, R., Lara, M., & Calvillo, R. (2003). Exocrinopatía mostrada en el ratón hipotímico CD1 et/et que asemeja el síndrome de Sjogren. *Vet*, 34(2), 130-141.

- Marroquin, R., Wek, K., Reyes, E., Arce, P., & Rojas, O. (1998). Susceptibility of "et" the spontaneously mutating CD1 derives Nude Mouse, to infection of *M. lepraemurium*. *International Journal of Leprosy*, 67(1), 46-51.
- Martínez, C., & Leal, G. (2000). The epidemiological transition in Mexico: A case of poorly designed health policies and lack of evidence. *Demographic and Urban Studies*, 547-569.
- Martín-Zúñiga J, O.-M. J. (2009). *Ciencia y tecnología del animal de laboratorio. vol. I /II: 2*. Madrid: Universidad de Alcalá.
- McGuire, W., Blessing, J., & Moore, D. (1996). Paclitaxel has moderate activity in squamous cervix cancer. A Gynecologic Oncology Group study. *J Clin Oncol*, 792-795.
- Merlo, M., Peppe, W., & Reid, J. (2006). Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer*, 924-935.
- Miller, R. (2011). Transgenic mice: beyond the knowckout. *Am J Physiol Renal Physiol*, 291-300.
- Mocchegiani, E., Cipriano, C., Gasparini, N., Orlando, F., Stecconi, R., Muzzioli, M., . . . Carpené, E. (2002). Metallothioneins (I+II) and thyroid-thymus axis efficiency in old mice: role of corticosterone and zinc supply. *Mechanims of ageing and development*, 123, 675-694.
- Mohar-Betancourt, A., & Reynoso-Noveró, N. (2017). Cancer Trends in Mexico: Essential Data for the Creation and Follow-Up of Public Policies. *Journal of global oncology*, 740-748.
- Moran, H. (2000). *Reduccion de tumores de carcinoma de cervix inducidos en ratones de la cepa CBA por la administración de IL-2 encapsulada en liposomas positivos*. Ciudad de México : UNAM.
- Morton, D. (2000). A systemic approach for establishing humane endpoints. *ILAR J*, 80-86.
- Murphy, K. (2012). *Immunobiology*. USA: Garland Science.
- Nam, K., Akari, H., & tereo, K. (1998). Age-dependent remodeling of peripheral blood CD4+ CD8+ T lymphocytes in cynomolgus monkeys. *Developmental & Comparative Immunology*, 22(2), 239-248.
- Nam, K., Akari, H., Terao, K., & Shinbaa, H. (2000). Peripheral blood extrathymic CD4(+)CD8(+) T cells with high cytotoxic activity are from the same lineage as CD4(+)CD8(-) T cells in cynomolgus monkeys. *int Immunol*, 1095-1103.
- Nana H, J. J. (2014). CD4+/CD8+ double-positive T cells: more than just a developmental stage? *Journal of Leukocyte Biology*, 31-38.
- Nascimbeni, M., Pol, S., & Saunier, B. (2011). Distinct CD4CD8 double-positive T cell in the blood and liver of patients during chronic hepatitis B and C. *PLoS One*.
- Navarro-Hernández, J., Ramírez, R., & Villagrán, C. (2012). *Manual de procedimientos recomendables para la investigación con animales*. México: SAMSARA.
- OMS. (22 de Enero de 2015). OMS. Obtenido de www.who.int/medicacetre/factsheets/fs297/es

- OMS. (18 de 02 de 2020). *GLOBOCAN*. Obtenido de <https://gco.iarc.fr/today/home>
- Ortolani, C., Forti, E., & Radin, E. (1993). Cytofluorimetric identification of two populations of double positive (CD4+, CD8+) T lymphocytes in human peripheral blood. *Biochem Biophys Res Commun*, 601-609.
- Overgaard, N., & Steptoe, R. (2014). CD4+/CD8+ double-positive T cells: more than just a developmental stage? *Leukocyte biology*, 31-38.
- Owen, J., Punt, J., & Stranford, S. (2013). *Inmunología* (7a ed.). Ciudad de México: McGrawHill.
- Parel, Y., Aurrand-Lions, M., & Scheja, A. (2007). Presence of CD4+CD8+ double-positive T cells with very high interleukin-4 production potential in lesional skin of patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum*, 3459-3467.
- Passlick, P., Flieger, D., & Ziegler-Heitbrock, H. (1989). Identification and characterization of a novel monocyte subpopulation in human peripheral blood. *Blood*, 2527-2534.
- Paul, W. (2003). *Fundamental immunology* (5 ed.). Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins.
- Pérez, M., Castrejon, M., Vargas, M., & Guido, R. (2013). Determinación de concentraciones de subpoblaciones de linfocitos en donadores adultos sanos del CMN 20 de Noviembre, ISSSTe. *Rev Esp Med*, 228-234.
- Rangel, R. (1995). Generation of memory CD4, CD8, CD45RO and CD16- lymphocytes activated with IL-2, INF, and TNF a with specific cytotoxicity against autologous cervical cancer cells in a mixed leukocyte-tumour cell culture. *Cytokine*, 6(3), 195-200.
- Ravasi, T., Suzuki, H., & Cannistraci, C. (2010). An atlas of combinatorial transcriptional regulation in mouse and man. *Cell*, 744-752.
- Rossi, J., Ceballos, P., & Lu, Z. (2019). Immune precision medicine for cancer: a novel insight based on the efficiency of immune effector cells. *Cancer Communications*, 1-16.
- Russell, W., & Bursh, R. (2005). *The Principles of Humane Experimental Technique*. London: Methuen.
- Sala, P., Tonutti, E., & Feruglio, C. (1993). Persistent expansions of CD4+CD8+ peripheral blood T cells. *Blood*, 1073-1077.
- Smith, J., Van den Broek, F., Martorell, J., Hackbarth, H., Ruksenas, O., Zeller, W., & al., e. (2007). Principles and practice in ethical review of animal experiments across Europe: summary of the report of a FELASA working group on ethical evaluation of animal experiments. *Lab Anim.*, 143-160.
- Solana, R., & Mariana, E. (2000). NK and NK/T cells in human senescence. *Vaccine*, 18(16), 1613-1620.
- Solis-Gonzalez, A. (2005). Determinación de constantes de unidades del complemento via clásica y alternas en ratones CD1 et/et y su relación histopatológica de daño renal. *Tesis de licenciatura*.

- Surh C. (2005). Regulation of mature T-cell homeostasis. *Seminars in immunology*, 183-191.
- Taborda, N., Hernandez, J., Montoya, C., & Rugeles, M. (2014). Las células natural killer y su papel en la respuesta inmunitaria durante la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana tipo-1. *Inmunología*, 11-20.
- Tian, Y., Zhang, G., & Yao-Ren, D. (2003). Melatonin rejuvenates degenerated thymus and redresses peripheral immune functions in aged mice. *Immunology Letters*, 88, 101-104.
- Verinaud, L., & Nieto, B. (2004). Thymic atrophy in infectious diseases. *Brazilian Journal of Morphological Sciences*, 21(2), 111-116.
- Vigano, M., Lissoni, P., & Barni, S. (1997). Lymphocyte levels before treatment with subcutaneous interleukin-2 and drug maintenance treatment in relation to the clinical efficacy in metastatic renal carcinoma. *Ital. Uro. Androl*, 67(2), 143-147.
- Von Hoosier, G. (1999). The age of biology: opportunities and challenges for Laboratory Animal Medicine. *Scand J Lab Anim Sci*, 26(4), 176-184.
- Wallace, J. (2000). Humane Endpoints in cancer research. *ILAR J*, 87-93.
- Wang L, w. K. (2008). The zinc finger transcription factor Zbtb7b represses CD8-lineage gene expression in peripheral CD4+ T cells. *Immunity*, 876-887.
- Wertz, I., & Dixit, V. (2010). Regulation of death receptor signaling by the ubiquitin system. *Cell death and differentiation*, 14-24.
- Woodman, C., & Collins, S. (2007). The natural history of cervical HPV infection: inresolvable issues. *Nat Rev Cancer*, 11-22.
- Yao, G. (2003). Thymic atrophy via estrogen-induced apoptosis is related to Fas/FasL pathway. *International Immunopharmacology*, 213-221.
- Zuñiga, J., Tur, M., Milacco, S., & Piñero, R. (2001). *Ciencia y tecnología en protección y experimentación animal*. Mexico: McGraw-Hill.