

# El timo en el envejecimiento

Dres A. Alonso, K. Mouchian, J. F. Albónico, P. A. Riquelme

Div. Alergia e Inmunología - Hospital de Clínicas - Universidad de Buenos Aires - Sociedad Científica Argentina  
Asociación Química Argentina - Academia Nacional de Ciencias de Buenos Aires.  
Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina.

## Resumen

Se presentan datos sobre la utilidad de proteínas extraídas de timos humanos y de animales sobre la producción linfocitaria de IL-4 e IFN-gamma en cultivos celulares de atópicos y no atópicos.

**Palabras claves.** Timoestimulinas; IL-4; IFN-gamma; cultivos celulares.

## Thymus in aging

### Summary

Data are presented on the usefulness of proteins extracted from human and animal thymus for lymphocyte production of IL-4 and IFN-gamma in atopic and non-atopic cell cultures.

**Keywords.** Thymostimulins; IL-4; IFN-gamma; cell culture.

### Introducción

Los griegos tuvieron dos voces para significar el alma o la mente con igual énfasis (*psiqué* y *timós*), tratando de desentrañar con especial empeño cual

era el asiento misterioso de la anatomía del alma. En esos intentos no faltaron quienes atribuyeron al corazón y a la aorta ese refugio inmanente. Otros, al observar un pequeño órgano cercano (el timo), pensaron que él era el responsable de tan ansiada búsqueda. Aunque *timo* proviene del griego *thymos*, sus raíces son aún más profundas. Si nos remontamos más allá del mundo de Sócrates y de Platón, vemos que *thymos* procede de la raíz indoeuropea *dheu*, que forma parte de muchos derivados, cuyo significado es “elevarse en llamas”, “elevarse en forma de nube”, “hacer humo”, y en sánscrito la palabra *dhuma* de la que proceden tanto “humo” como “perfume”. Según Julián Jaynes, *thymos* o *thumos* fue, con otros seis términos traducidos como “mente”, “espíritu” o “alma”, un ingrediente clave de la conciencia homérica. Significaba “movimiento” o “actividad”, tal como se perciben externamente.

Esa tensión o estrés provocaba cambios físicos, un aumento de la adrenalina segregada, una taquicardia, y por ello una “agitación en el pecho”. De allí que el *thymos* era una especie de fuerza o vigor; el hombre le hablaba al *thymos*, y este lo dotaba de fuerzas para guerrear y lo instaba al amor y a la victoria. Quizás Ajax no estuviese deseoso de combatir, pero su *thymos* sí; y no era Eneas sino su *thymos* quien se regocijaba en la victoria.

En la *Iliada*, Aquiles dice: “Despertándose como humo en los pechos de los hombres incluso cuando Agamenón me provocaba; pero olvidemos el pasado y aplaquemos al *thymos* en nuestros pechos”. Metafóricamente, se aprecia el empleo de la palabra *thymos* y sus raíces indoeuropeas.

En el siglo II, Galeno dio el nombre de *thymos* al órgano formado por dos lóbulos de color gris rosado, que recordaba a un manojo de tomillo. Curiosamente, a esta planta se la quemaba en el altar de los dioses a manera de incienso. *Thymos* significaba “humo ascendente”, incienso quemado en sacrificio a los dioses, en el *thymele* o altar y en el *thymiaterion*

**Correspondencia:** Dr. Ángel Alonso  
Correo electrónico: aalonsomed@gmail.com

o incensario. Este ritual equivalía a elevación, cantos de alabanza, espíritu y demostraciones de amor, siendo identificado con el hálito o alma de los dependían la energía y el valor de los hombres.

Por su parte, él sostenía que el timo servía como almohadilla para proteger a los grandes vasos contra eventuales traumatismos. Sin embargo, luego se reconoció su naturaleza linfóidea y, en 1777, Hewson lo describió como el centro de dicha actividad, observando que el timo existe durante el curso de los primeros períodos de la vida precisamente cuando las células del tipo linfóideo aparecen y juegan un papel importante en la sobrevivencia del individuo.

Beard, en 1900, sugirió que, por lo menos desde el punto de vista embriológico, el timo estaba relacionado íntimamente con el sistema linfático (hoy en día también es asociado con el sistema nervioso central), y señaló: "La suerte ha querido que haya caído en la cuenta de que los primeros leucocitos (en realidad linfocitos) provienen del timo a partir de sus células epiteliales, y de que el timo debe ser considerado como el punto de partida de todas las estructuras linfáticas del organismo".

Más adelante, en 1935, Gregorie realizó la timectomía a humanos y permitió sostener esta argumentación, habida cuenta de que no se producían cambios que pusieran en peligro la vida aunque en el hombre se observara una ligera linfopenia que no se vinculaba con ninguna otra patología. En la década de 1940, cuando aún no se había descubierto el porqué de la transmisión genética de los caracteres hereditarios, los bioquímicos llamaron "ácido timonucleico" al que más tarde bautizarían como ácido desoxirribonucleico (ADN), cuyo nombre se debió al hallazgo de esta sustancia en gran cantidad en el timo de los terneros; y llamaron "timidina" al nucleósido que se forma de la combinación de una nueva base pirimidínica aislada: la timina y la desoxirribosa. Hoy es claro el porqué del alto contenido de ADN del timo fetal o infantil. Los timocitos o linfocitos que pueblan el timo están entre las células de núcleo más grande y, por ello, son muy ricos en ADN. Sin embargo, las experiencias de Glick, Claman y Talmage (1963), al someter a animales adultos a la timectomía, y luego a la inyección de bacterias, otros antígenos particulados e injertos de tejidos de otros animales, lograron demostrar que la ablación del órgano producía ciertos cambios desfavorables en la respuesta inmune, sobre todo en la capacidad de sintetizar anticuerpos específicos, y en el rechazo de tejidos ajenos.

Si bien estas experiencias conmovieron el saber de entonces, había pasado inadvertido el hecho descrito por McEndy, Boon y Furth (1944), quienes habían señalado que la timectomía prevenía el desarrollo de la leucemia linfóidea en familias consanguíneas de ratones, que, espontáneamente desarrollaban la enfermedad al llegar los animales a cierta edad.

En su libro clásico de 1969, *Timo, inmunición y*

*alergia*, el Dr. Plutarco Naranjo, profesor de Inmunología de la Facultad de Medicina de Ecuador, nos manifestó en su visita al Centro de Alergia del Hospital de Clínicas de Buenos Aires (UBA), la importancia del timo aun en la edad adulta, en contraposición con otros autores que desestimaban su valor en la senectud. Miller, en 1966, sostuvo que "el timo no deja de existir durante el resto de la vida...". Stoner (1963), Clark (1966), Hoshino (1966) y Weiss (1963) señalaron que con la microscopía electrónica de la época las células epiteliales tímicas conservaban cierta viabilidad independientemente de la edad de la muestra analizada. Esto entusiasmó a Miller (1961 a 1966) a iniciar una serie de timectomías neonatales que le permitieron esclarecer ciertas funciones tempranas del timo. Conjuntamente con Gaburro y Golpató, establecieron una serie de graves alteraciones que ocasionaba la extirpación precoz del órgano, que sintetizaron en: 1) sobre el crecimiento; 2) sobre los órganos linfáticos; 3) sobre los linfocitos; 4) sobre la respuesta inmune en sí misma; 5) sobre la supervivencia, y 6) sobre el metabolismo.

En los animales, se describen la *wasting disease* (síndrome caquético) y la *runt disease* (envejecimiento prematuro y muerte) como consecuencia de la timectomía neonatal. Hoy en día, nadie duda de que la aplasia o hipoplasia del órgano en el ser humano (similar a una timectomía neonatal) produce una grave deficiencia en la funcionalidad T, llamada síndrome de Di George, que no es una enfermedad genética ni existe un patrón hereditario pues es una alteración del desarrollo embrionario durante las 8-12 semanas de gestación de la 3ª y 4ª bolsas faríngeas, que también dan origen a las paratiroides, a la tiroides, al arco aórtico y, por extensión, al tubérculo del oído y el filtrum labial.

Se discute su origen viral, tóxico (etilismo materno) o farmacológico sin precisión; puede ser parcial (la más común) o completa, y presenta ausencia de la sombra tímica en la radiografía del tórax del niño. El trasplante de timo fetal de menos de 14 semanas de gestación es una buena opción, pero debe realizarse lo antes posible. Su recuperación es notable en aquellos infectados con virus, hongos o parásitos, aunque el peor problema es la hipocalcemia y la cardiopatía.

Las pruebas cutáneas de hipersensibilidad retardada suelen estar ausentes, aunque ello es difícil de valorar en la corta edad, y los trasplantes, en general, son bien aceptados por la falla del sector LT.

### Aspectos actuales

En un meduloso estudio histopatológico del timo a distintas edades, un grupo de investigadores argentinos de la U.N.N.E. (Dres. María L. Piuzy y A. Cerdera Noguera) realizó la caracterización citológica de timos entre el nacimiento y los 5 años, entre los 5 y los 10 años, y en los adultos. Los órganos

fijados en formol se colorearon con hematoxilina-eosina para una primera observación sobre su estructura, conservación y viabilidad. A los buenos ejemplares se los sometió a técnicas de inmunoperoxidasa, empleando como sistema de detección el de avidina-biotina y como revelador la diaminobencidina. Los anticuerpos monoclonales utilizados fueron: el anti-CD45RO, marcador de timocitos; el CD68, marcador de histiocitos; el CK o marcador de citoqueratinas en células epiteliales; el S-100 o marcador de células retículo-epiteliales e histiocitos, y el ACL o antígeno leucocitario común. Los resultados se describen de la siguiente manera: en el grupo de **0 a 5 años**, con hematoxilina-eosina se observó una delgada cápsula de tejido conectivo con numerosas trabéculas y una abundante población de timocitos en diferentes estadios de proliferación. Se advierte una distinción entre las zonas cortical y medular. Hay células retículo-epiteliales de aspecto normal con corpúsculos de Hassall conservados, y unos pocos pseudoquísticos. Estos hallazgos son coincidentes con los nuestros, publicados oportunamente. La inmunomarcación reveló positividad con el monoclonal CK en las células retículo-epiteliales y en los Hassall; con ACL y CD45RO en los timocitos presentes; con CD68 y S-100 en los histiocitos, y en las células retículo-epiteliales interdigitadas.

En niños **de 10 años**, con hematoxilina-eosina se observa que el timo presenta una estructura conservada, destacándose la corteza sobre la médula y las células linfocitarias proliferantes. En la primera, se visualizan células reticulares de los tipos I y II, numerosas formaciones pseudoquísticas delimitadas, y con material amorfo, focos de calcificación distrófica y escasos Hassall típicos (células reticulares del tipo VI). Con inmunoperoxidasa se observó positividad en las retículo-epiteliales y en los Hassall con el monoclonal CK, en linfocitos con ACL y CD45RO y con CD68 y S-100 en los histiocitos y en las retículo-epiteliales.

Por fin, en el **adulto** (hombre de 64 años) se apreciaron islotes de tejido tímico con corteza y médula diferenciadas. Con hematoxilina-eosina se observó un incremento de adipocitos y tejido conectivo denso. Los linfocitos están conservados en relación con el menor parénquima tímico. Los macrófagos abundan. Los Hassall son pequeños y compactos con estructura laminar conservada. La inmunoperoxidasa reveló similares

imágenes a las anteriores descritas para el niño de 10 años.

De todos estos hallazgos, se puede concluir que la **celularidad** disminuye con la edad y se incrementan los adipocitos, hecho que es frecuente en otros órganos. Los Hassall aparecen más rudimentarios, pero responden satisfactoriamente al inmunomarcado. La presencia de pseudoquistes con necrosis central se debe a la involución de los Hassall, cuyo origen se halla en discusión entre quienes sostienen que

derivan de las células interdigitadas y aquellos que abogan por una relación con las células neuroectodérmicas (teoría del eje-hipotálamo-hipófisis-timo). Lo concreto es que, por la inmunomarcación (más sensible que las técnicas comunes), se puede sostener que **el timo aun en la etapa involutiva conserva potencialmente su importancia funcional**.

Investigadores de la Universidad de La Plata están estudiando las relaciones entre el timo y el sistema nervioso central, sosteniendo la hipótesis de un **eje hipotálamo-hipófisis-timo**, al igual que la restitución de la función "endocrina" tímica por gene terapia a ratones envejecidos que recuperan los niveles séricos de timulina de su juventud. Muy probablemente, estas "hormonas tímicas" sean necesarias para una apropiada estimulación de las **células dendríticas** en el proceso de presentación antigénica al linfocito virgen, y activar así toda la respuesta inmune específica.

Se ha probado que la linfoquina **TSLP** (*thymic stromal lymphopoietin*) actúa sobre las **CD CD11c+** que son inductoras potentes de los **LTCD4-Th2**, cuyo rol en las patologías alérgicas es indiscutido. Recientemente, Kleinjan (2011) confirmó que la **TSLP** está presente en la mucosa nasal, y, que influencia la interacción **CD → LT** a favor de los **LTCD4-Th2**. Otro grupo de investigadores evalúa la actividad de la hormona del crecimiento humana recombinante en pacientes portadores del HIV, al observar la reconstitución del timo por mecanismos no muy claros aún. En los últimos años, se demostró que el receptor para la **IL-7 (IL-7R)** es un objetivo transcripcional de Notch, que controla el temprano desarrollo de los **LT** humanos con la consiguiente expansión de los progenitores **T intratímicos**. Las células **no-T** del timo son dendríticas que expresan **p33** y el factor de transcripción **Runx 3**. Estas células tienen una función tolerogénica, tanto sean convencionales o plasmocitoides, generando **LT-reguladores (LT-reg)** naturales, que son esenciales para la adquisición de tolerancia y prevención de la autoinmunidad.

Numerosos trabajos de investigación sostienen que las citoquinas elaboradas por las células epiteliales influyen notoriamente sobre los procesos inmunológicos, como pueden ser la activación, los patrones de migración celular, la quimiotaxis, la diferenciación y la proliferación de los tipos celulares participantes en la inflamación alérgica o no.

La **TSLP**, una citoquina similar a la **IL-7**, se probó en ratones y en humanos. En los primeros, su efecto es sobre la progenie linfoidea mientras que, en los segundos, lo hace sobre la mieloide. En particular, la **TSLPh** se comporta como un activador potente de las células dendríticas inmaduras de linaje mieloide. No obstante, se ha visto que la **TSLP** varía su accionar según la composición del infiltrado celular. Así, la **TSLP** secretada por las células epiteliales titulares condiciona a las **CD** para la producción de moléculas que favorezcan la inflamación alér-

gica. La secreción de eotaxina e IL-8 atraen a los eosinófilos, y las CD favorecen la polarización de los LT-CD4-Th2 inflamatorios productores de altas concentraciones de TNF $\alpha$ . Estas células inflamatorias son atraídas por quimiocinas secretadas por las CD, tales como MDC y TARC, que favorecen la amplificación de la inflamación alérgica. Se ha demostrado que la **TSLP**, de acuerdo con su localización y el microambiente existente, regula la generación de LT con diferentes funciones efectoras. En el timo (órgano linfático primario) induce la producción de LT reguladores involucrados en el mantenimiento de la tolerancia a lo propio. En la mucosa intestinal permite el equilibrio homeostático Th2 o la generación de la respuesta inflamatoria Th1, y en la piel la expresión de **TSLP** se relaciona con el eccema atópico.

En el ratón, esta citoquina segregada por las células epiteliales tímicas no solo afecta a las células involucradas en la llamada inmunidad innata, sino también en la vertiente adaptativa. Fue originalmente clonada de la línea celular estromal tímica Z201R.1, que, al ser cultivada con precursores linfoides de hígado fetal murino, favorece el desarrollo de LB IgM $^{+}$  (Sims, 2000). Igualmente, el cocultivo con timocitos no fraccionados resultó en un aumento de la proliferación de los timocitos en concentraciones subóptimas de anticuerpos anti-CD3 (Friend, 1994). Si se cultivan células estromales tímicas aparece en su sobrenadante la IL-7 y otra molécula que por cromatografía de intercambio iónico con un perfil de elución distinto a la IL-7 permitió identificar a la **TSLP**. La IL-7 induce LB 220 $^{+}$  IgM $^{-}$ , mientras que la **TSLP** induce LB 220 $^{+}$  IgM $^{+}$  (Levin, 1999). El receptor para IL-7 (IL-7R) y otra cadena similar a la **TSLP** (Pandey, 2000; Fujio, 2000) se expresan en hígado, cerebro, médula ósea, timo y testículos (Al-Shami, 2004). La creación de un ratón deficiente en **TSLPR** mostró que la celularidad linfohematopoyética era normal, pero que su recuperación luego de emplear radiaciones subletales, a las 4 semanas, mostraba una disminución con respecto al ratón normal, con defecto notorio de LTCD4 $^{+}$ , LTCD8 $^{+}$  y LB del timo y bazo.

Por el contrario, la inyección diaria de **TSLP** en dicho ratón incrementaba la celularidad tímica y esplénica con acumulación de LTCD4 $^{+}$  en la periferia (Al-Shami, 2004). Todos los estudios realizados en los seres humanos (**TSLPh**) señalan que el receptor para esta citoquina es también un heterodímero constituido por el IL-7R y un nuevo miembro de la familia de las hemopoyetinas bautizado receptor para la **TSLP**.

La transfección de la línea celular proB Ba/F3 con este receptor induce respuesta celular a la **TSLPh**, pero no a la IL-7 o a la **TSLP** murina (Reché, 2001).

A diferencia de la expresión del **TSLPR** en el ratón, en los humanos es expresado por las células de linaje mieloides, en especial por las células dendríticas

(CD) y los monocitos. La activación del complejo receptor-ligando en estas células lleva a la fosforilación de los factores de transcripción STAT-5 y STAT-3, y la liberación de quimiocinas como TARC (*thymus and activation-regulated chemokine* o CCL 17) o como MDC (*macrophage-derived chemokine* o CCL 22) que atraen a LT. De igual manera, se demostró que CD mieloides tratadas con **TSLP** incrementan la expresión de moléculas coestimuladoras como CD40 y CD80, y poseen una gran capacidad para hacer proliferar LTCD4 $^{+}$  vírgenes alogénicos (Reché, 2001; Isaksen, 2002; Urashima, 2005). Funcionalmente, las CD activadas por la **TSLP** poseen la capacidad para activar LTCD4 $^{+}$  vírgenes alogénicas hacia un fenotipo Th2 con secreción de altas concentraciones de IL-13, IL-15 y TNF- $\alpha$ , en menor medida de IL-4, pero nada de IL-10 ni de IFN- $\gamma$ .

Además, las CD activadas por la **TSLP** expresan OX40L y no producen IL-12. La interacción de OX40L con el OX40 del LT es necesaria para la generación de un fenotipo Th2 (Soumelis, 2002). Por ende, la actividad reguladora de **TSLPh** en la inmunidad adaptativa se logra por su acción sobre la CD (presentadora por excelencia) y ulterior polarización de los LT hacia Th2. Ello no ocurre con las células linfoides del ratón que no responden a la **TSLPh**.

Los corpúsculos de Hassall son grupos de células epiteliales localizadas dentro de la médula tímica que segregan citocinas, y **TSLP**, que influyen en el desarrollo de los timocitos y sobre las CD mieloides colocalizadas que expresan un marcador de maduración, el DC-LAMP, mientras que las CD inmaduras se ubican en la corteza y en la unión córtico-medular del timo y no lo expresan (Watanabe, 2005).

Las CD derivadas del timo que se expusieron a la **TSLP** aumentan la expresión de marcadores como DC-LAMP, HLA-DR, CD80 y CD86, que favorecen la presentación antigénica a las células linfoides. Por otra parte, segregan quimioquinas como TARC y MDC que atraen Th2, pero no eliminan IL-12 ni TNF- $\alpha$ , que son proinflamatorias e inducen gran expansión de timocitos. Estos son principalmente CD4 $^{+}$  CD8 $^{-}$ , y la mayoría expresan CD25, fenotipo vinculado con los LT reguladores naturales que controlan en la periferia la respuesta de los LT efectores (Watanabe, 2005). Los timocitos CD4 $^{+}$  CD25 $^{+}$  estimulados por **TSLP**-CD presentan una baja proliferación frente a un estímulo, expresan el factor de transcripción Fox-p3 e inhiben la capacidad proliferativa de los LTCD4 $^{+}$  CD25 $^{-}$ , estimulados por un anti-CD3 o un anti-CD28. Además, se demostró que la inducción de estos LT – reg depende de la interacción con moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), de CD80 y de CD86, al igual que de la IL-2. Los estudios hechos con LT vírgenes de la periferia estimulados con **TSLP**-CD muestran que, a diferencia de los timocitos, los LT periféricos NO se diferencian en un fenotipo regu-



lador CD4+ CD25+ Fox-p3+, lo que asevera la importancia del microambiente tímico en la diferenciación. Esto sugiere que las células autorreactivas que superan el umbral de afinidad para la selección NEGATIVA estarían sometidas a un proceso de selección adicional al final de su maduración que, a través de TSLP-CD, posibilitaría su diferenciación en el LT-reg que mantienen la tolerancia periférica. En los órganos linfoides periféricos o secundarios, se mantienen las células maduras y se encuentran con el antígeno sin generar un fenómeno inflamatorio, lo que Jameson definió en 2002 como “expansión homeostática de las células T”. En el compartimiento de las células T de memoria se definieron subpoblaciones que se distinguen en su capacidad proliferativa, los patrones de migración y sus funciones efectoras. Así, se reconoce actualmente la existencia de LT de memoria central (LT-mc) y LT de memoria efectora (LT-me). Los primeros tienen patrones de migración a los órganos linfáticos secundarios, una función efectora limitada, pero proliferan y adquieren funciones efectoras frente a un nuevo desafío antigénico. Los segundos migran a los tejidos periféricos no linfoides, secretan rápidamente citoquinas efectoras frente a la estimulación antigénica, pero poseen una capacidad proliferativa limitada (Lanzavecchia, 2005). Se identificó una subpoblación de LTCD4+ que expresan el receptor para la **prostaglandina D2** que, a su vez, pertenecen a los LT-mc con un potencial de polarización hacia una respuesta Th2, por las citoquinas que segregan. Por su parte, las TSLP-CD inducen una expansión sostenida después de múltiples estimulaciones de estos LT hacia el fenotipo Th2, aunque ocurre lo contrario si se los trata con anti-CD3/anti-CD-28, que los lleva a LT-me y luego a Th1 (Wang, 2006). Se describió que las CD presentes en la lámina propia intestinal emiten prolongaciones a través de las uniones de las células epiteliales para detectar las bacterias de la flora intestinal que se hallan en el lumen (Rescigno, 2001). En ausencia de un patógeno, estas células poseen la capacidad de promover la diferenciación de los LT hacia los Th2 (Alpan, 2001). También inducen a los LB →plasmocitos IgA+ en un microambiente no inflamatorio Th2. Este condicionamiento de las CD intestinales depende del microambiente local, ya que las CD del colon inducen una respuesta Th2, aun en presencia de un estímulo antigénico inductor de respuesta Th1. En la piel sana en condiciones no inflamatorias la gran mayoría de LT son Th1 y expresan el marcador CLA (*cutaneous lymphocyte antigen*), y son células T-me (Clark, 2006).

La primera evidencia de la asociación de **TSLP** con enfermedades alérgicas humanas fue descrita en la dermatitis atópica que presenta una respuesta a LTCD4-Th2. Biopsias de piel con dermatitis por sulfato de níquel corroboraron ambos hallazgos: el de la citoquina y el de la subpoblación Th2. En esta piel se detectan además CD con el marcador

de activación LAMP, que, al parecer, migraron de la epidermis a la dermis. Estos casos se acompañan de niveles séricos de IgE elevados. Los ratones deficientes del TSLPR no desarrollan inflamación pulmonar a antígenos inhalados y tienen una respuesta Th1 con altos niveles de IL-12, IFN- $\gamma$  y bajos valores de IL-4, IL-5, IL-13 e IgE. Todo ello refuerza el papel de la **TSLP** en la atopía.

**Relación entre el sistema nervioso central y el timo y la médula ósea.** El primero es el más estudiado, dado que la médula ósea presenta dificultades para identificar a aquellos que estén vinculados estrechamente con los vasos sanguíneos. En el timo humano, fibras nerviosas liberadoras de TH (tirosina hidroxilasa), DBH (dopamina b-hidroxilasa), NPY, SP, neuroquininas A and B, CGRP, VIP y NA fueron halladas, siendo la última la más abundante. El NPY se localiza junto a las fibras de NE que entran al timo por la cápsula o con las arteriolas superficiales. Las fibras de SP, CGRP y de VIP se ubican cerca de los mastocitos.

Ya Szent-Gyorgy, en 1964, y Vittadini, en 1966, postularon una relación entre el hipotálamo-hipófisis y el timo, que hoy adquiere interesante relevancia en varios grupos de investigación. La hipófisis a través de la TSH→T4 = estimulación tímica y, por el contrario, ACTH→corticoides más gonadotrofinas→testosterona = inhibición tímica. Casi medio siglo después, los investigadores sostienen la existencia de un eje hipotálamo-hipofisario-tímico, con nuevos elementos, y con actividad de neuropéptidos no descubiertos en aquel entonces. Ello abre infinitas posibilidades de investigación tanto a nivel inmunológico como farmacológico por el desarrollo de estas dos ciencias en la actualidad.

### **Histofisiología del timo y de los órganos linfáticos**

Estos órganos son aquellos en los que los linfocitos maduran, se diferencian y proliferan. Se dividen en dos grandes grupos: los *primarios* o centrales y los *secundarios* o periféricos.

Células primitivas totipotenciales o pluripotenciales o *stem-cells* o células reticulares primitivas o hemocitoblastos provenientes del saco vitelino y del hígado fetal dan origen a las progenies eritroidea y mieloidea, que originan a los eritrocitos y a los granulocitos, ya que los linfocitos derivan de un progenitor linfóideo.

Los primarios o centrales son el **timo** y la **médula ósea**, mientras que los secundarios o periféricos son el bazo, los ganglios linfáticos, el apéndice, las amígdalas, las adenoides, las placas de Peyer del intestino y el tejido linfóideo asociado a las mucosas (MALT), cuyos más grandes exponentes son el intestinal (GALT) y el bronquial (BALT).

En los *primarios* maduran los LT y los LB sin estar presente el antígeno ni necesitarlo.

El **timo** es un órgano linfoepitelial, bilobulado que deriva del endodermo y –como ya se expresó– de las 3ª y 4ª bolsas faríngeas. Durante el desarrollo fetal, aumenta mucho de tamaño y alcanza su máximo en el nacimiento, y luego involucrena lentamente hasta la pubertad para mantenerse muy pequeño en la edad adulta. Posee una corteza y una médula, y la primera se divide en superficial y profunda. La corteza exhibe linfocitos de varios tamaños (timocitos), la mayoría de ellos inmaduros que, al madurar, entran a la médula y de allí a la circulación sanguínea donde son transportados a los órganos linfoides secundarios para encontrar en ellos –y no en otro lugar– al antígeno.

El **timo** posee células no linfoides; así, existen células epiteliales especializadas o células nodriza o *nurse*, células dendríticas epiteliales y células dendríticas interdigitadas.

Las dos primeras abundan en la corteza, y las últimas en la médula donde hay células epiteliales adyacentes a los corpúsculos de Hassall. Los macrófagos se encuentran en la unión córticomedular.

Las células *nurse* albergan en sus senos citoplasmáticos a los timocitos; las dendríticas epiteliales con moléculas del CMH de las clases I y II seleccionan a las células útiles para el reconocimiento antígeno.

Las células epiteliales forman las “hormonas” involucradas en la maduración T (timopoyetina, timopentina, timosina  $\alpha$ -1 o  $\beta$ -1, fracción 5 y **TSLP**). La corteza superficial contiene entre un 5% y un 10% de timocitos; la profunda (que es la más rica) entre un 75% y un 80% y la médula de un 8% a un 10% de los timocitos. La célula madre entra al **timo** y allí sufre una serie de transformaciones que se conocen con el nombre de ontogenia T, es decir, unos pasos fisiológicos que los llevan a la maduración como célula T.

Así, el **PRO-T** exhibe la enzima TdT o desoxinucleotidil-transferasa-terminal, los marcadores CD2, cCD3, CD5, CD7, CD45RO, genes de la cadena  $\beta$  del R $\alpha$ T, son doble negativas porque no tienen ni CD4 ni CD8, y se pueden subdividir en CD25-CD44+, CD25+CD44+ y CD25+CD44-; el **PRE-T** muestra a la TdT, los CD2, cCD3, CD5, CD7, CD45RO, cadena  $\beta$  del R $\alpha$ T y genes de cadena  $\alpha$  del R $\alpha$ T, CD4 y CD8 (doble positivas) y CD1.

Por fin, el **T maduro** o simple positiva tiene CD4 o CD8, sCD3, CD2, CD5, CD7, CD45RA que pasa a CD45RO si activa al antígeno, y, R $\alpha$ T  $\alpha\beta$  o R $\alpha$ T  $\gamma\delta$  según el caso.

El 70%-75 % son CD4 y el 25%-30% son CD8.

Los R $\alpha$ T  $\alpha\beta$  son de ontogenia tímica tardía y, excepcionalmente, extratímica, mientras que los R $\alpha$ T  $\gamma\delta$  son de ontogenia tímica muy temprana y extratímica probable.

Se llama “selección positiva” cuando los LT aprenden a “ver” y reconocer al CMH propio, mientras que se llama “selección negativa” cuando reco-

nocen a antígenos propios con alta afinidad y, por ende, deben ser deleccionados para evitar los fenómenos de autorreactividad y autoinmunidad ulterior a través de la apoptosis o muerte celular programada.

Cuando el LT “toca” a una molécula de clase I en la dendrítica epitelial, expresará CD8 y, viceversa, si “toca” a una de clase II solo expresará CD4; por eso las dendríticas tienen gran contenido de moléculas del CMH. Si quedase algún LT autorreactivo que no fuera deleccionado y “escapase” a estos mecanismos de control de la tolerancia central, las células epiteliales interdigitadas y los macrófagos tratarán de inducirles un estado de “anergia” clonal o no respuesta ante autoantígenos, para conservar la tolerancia.

El CD3 constituye una importante molécula accesoria en la estructura del R $\alpha$ T; es un pentámero compuesto por 5 cadenas proteicas ( $\gamma$  de 21 kDa;  $\delta$  de 25 kDa;  $\epsilon$  de 25 kDa y 2  $\delta\delta$  de 16 kDa) que envían señales al interior de la célula.

### Las “hormonas” tímicas

En 1855, el fisiólogo Starling acuñó el vocablo *hormona* para el concepto fisiológico de mensaje químico, que desde entonces quedó firmemente establecido. Desde 1961, Auerbach, Nossal y Levey sostuvieron que el organismo tendría otro mecanismo de mensaje fisiológico que sería el celular y enfatizaron en que sería el timo el responsable de dicha función. Células originadas en el timo o que en este órgano reciben un mensaje o código químico irían luego a otros órganos linfoides a cumplir con su papel fisiológico, fuera este constituir un nuevo clon o familia celular, o transferir a otras células el código químico que portaban. Esta sería la función celulomissática (de *missaticum* = “mensaje”, y este a su vez de *mittere* = “enviar o mandar un mensaje u orden”). Esta interpretación no dista mucho de los conceptos actuales acerca de las funciones del timo y sus presuntas relaciones con el sistema nervioso central y el sistema endocrino, aunque haya todavía mucho por esclarecer.

1. La **timulina** es un nonapéptido que posee el ion zinc (Zn), tan importante en la inmunología, producido por las células epiteliales tímicas exclusivamente. El Zn parece ser el responsable de la actividad biológica de esta molécula que está involucrada con la diferenciación linfocitaria T tanto intra como extratímica. También se demostró que su producción y secreción está fuertemente influenciada por el sistema neuroendocrino, y también se presume que la timulina ejercería acciones sobre el eje hipotálamo-hipofisario.

En un modelo experimental animal, se unió el gene de la timulina a un vector de adenovirus y se inyectó intramuscularmente a ratones “desnudos” (*nude*) y a ratas envejecidas, restituyendo la función linfocitaria en ambos casos a partir de los miocitos inoculados. Llamada antiguamente *facteur thymique serique* por Bach en 1977, sigue un ritmo circadiano,

y los niveles fisiológicamente elevados de ACTH se correlacionan de forma positiva con los niveles plasmáticos de timulina. Recientemente, la timulina sería un efector de los mediadores proinflamatorios o citoquinas. Un péptido análogo de la timulina (PAT) posee efectos analgésicos en altas concentraciones y especialmente efectos neuroprotectores antiinflamatorios en el sistema nervioso central y en particular sobre los astrocitos. Fue asociada por Wade (1985) con la anorexia nerviosa.

2. La **timosina**, fracción 5, de origen bovino, con un peso molecular (PM) entre 1000 y 15.000, constituye una familia de polipéptidos termo y ácido estables, que provoca la diferenciación T y potencia la función inmunitaria en modelos experimentales y humanos. Se la subdivide en timosina  $\alpha 1$ , timosina  $\alpha 2$ , timosina  $\alpha 3$  y timosina  $\beta 4$ , con similares efectos biológicos dependiendo del modelo experimental animal utilizado para tal fin.

3. La **timopoyetina**, de origen bovino, con un PM de 5560, que comprende a un residuo de 49 aminoácidos, es termoestable y produce la diferenciación de los linfocitos pretímicos, aunque determina in vivo una alteración retardada de la transmisión neuromuscular.

4. La **timosina  $\alpha 1$** , de origen bovino, con un PM de 3100, que abarca un residuo de 28 aminoácidos termoestables, aumenta la respuesta de los linfocitos de rata a los mitógenos con incremento de células Thy 1, 2 + y Lyt 1,2,3 +, modulando la actividad de la TdT.

5. La **timoestimulina**, de origen bovino, con un PM de 12.000, es una familia de polipéptidos poco caracterizada, y produce marcadores y funciones específicos de los LT tanto en el animal inmunosuprimido como en el paciente con déficit inmunitario; en la rata incrementa la producción de IFN provocada con Poli IC.

6. El **factor humoral tímico**, de origen bovino, con un PM de 3200, es un polipéptido (residuo de 31 aminoácidos) termolábiles, restaura la reacción GVH en esplenocitos de ratones timectomizados neonatalmente y aumenta la respuesta a la Con-A y a la PHA de los esplenocitos normales.

7.- El **factor tímico sérico**, de origen porcino y murino, con un PM de 860, y que corresponde a un residuo de 9 aminoácidos termolábiles, aumenta la generación de células citotóxicas T *in vivo* e *in vitro*.

8.- La **timosina-alfa-1 ( $\alpha 1$ )** es un péptido recombinante análogo al natural sintetizado en el timo, que inhibiría la replicación viral, el crecimiento neoplásico y aumentaría la diferenciación linfocitaria T y de NKC con producción de IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-3, reduciendo la apoptosis de los LT.

Los niveles de hormonas tímicas circulantes, tanto en el hombre como en el animal de experimentación, tienden a bajar con la edad paralelamente a la involución morfológica del timo hasta llegar a ser prácticamente indetectables en el hombre después de los 60 años de edad.<sup>1-2-3-4-5-6-9-10-11-12</sup>

Aquí, se exponen los datos obtenidos *experimentalmente* con "hormonas tímicas": 1) de origen **humano** (timoestimulina), 2) de origen **bovino** (timo-modulina), y 3) un péptido recombinante de **síntesis de laboratorio** (timosina alfa-1) sobre la actividad de los linfocitos de pacientes atópicos y no atópicos de diversas edades, cuantificando los niveles de la **IL-4** y del **IFN-gamma** producidos en un medio de cultivo celular.

## Materiales y métodos

### 1. "Hormona tímica humana o timoestimulina humana"

Se obtuvo a partir de timos humanos de niños entre los 5 y los 10 años de edad fallecidos por accidentes viales en pleno estado de salud, merced a una acordada de la Corte Suprema de Justicia de la Nación tramitada a través de la Morgue Judicial de la ciudad de Buenos Aires bajo la dirección del Prof. Dr. Haroldo Nelson Donnewald (en su momento), luego de presentarse un protocolo de investigación aprobado éticamente por dicho organismo. Los órganos obtenidos fueron pesados y estudiados histopatológicamente (cortes parafinados coloreados con hematoxilina-eosina) para valorar la viabilidad e integridad de los tejidos antes de proceder a la separación de las células constitutivas. De tal manera, los órganos muy deteriorados o hemorrágicos fueron descartados en consideración al sufrimiento celular y a una presunta alteración de la producción de los factores tímicos a estudiar.

### 2. Homogeneización de los tejidos

Los órganos seleccionados en buen estado fueron cortados en trozos pequeños y sometidos a un homogeneizador del tipo Virtis a bajas revoluciones, para lograr una papilla que posibilitara los pasos ulteriores. El único agregado posible en este paso fue la solución fisiológica a pH 7,2, a razón de 3 ml por cada gramo de tejido. Una vez obtenido este homogenado fue sometido a centrifugación a 14.000 g en centrífuga refrigerada, separándose un depósito y un sobrenadante. Este, a su vez, fue tratado con acetona para lograr su deslipidización, y con sulfato de amonio al 50% para eliminar las proteínas séricas contaminantes. Todo precipitado fue eliminado, y ulteriores diálisis contra solución fisiológica a pH 7,2 prepararon el producto para ser sometido a las columnas de Sephadex G-50.

### 3. Cromatografía en columnas de Sephadex G-50

Se utilizó una columna de Sephadex G-50 que tenía 780 mm por 22 mm y que se equilibró y se eluyó con buffer fosfato y ClNa 0,15 M a pH 8 y a 4° C. Tres y medio mililitros del sobrenadante fueron sembrados, y alícuotas de un mililitro del eluido fueron recogidas en el colector de fracciones con una velocidad de 20 ml/min. El contenido proteico de cada eluido fue determinado por absorbancia a 280 nm de densidad óptica en un espectrofotómetro Metrolab y medido cuantitativamente por el método de Bradford.



#### 4. Pesos moleculares

Una serie de proteínas de peso molecular conocido usadas como marcadores proteicos, tales como la lisozima (PM. 19,5 kDa), el inhibidor de la tripsina (PM. 28,8 kDa), la anhidrasa carbónica (PM. 37,1 kDa), la ovoalbúmina (PM. 54,5 kDa), la albúmina sérica bovina (PM. 97 kDa), la  $\beta$ -galactosidasa (PM.115 kDa) y la miosina (PM. 205 kDa) (Bio-Rad lote 161-0318), se aplicaron a una columna de Sephadex G-200 de 780 mm por 22 mm que se equilibró, y se eluyó con un buffer PBS-ClNa 0,15 M a pH 8 y a 4° C. Un mililitro de cada sustancia fue recogida y sometida al espectrofotómetro Metrolab a una densidad óptica de 280 nm. La concentración proteica de los marcadores fue de 13,5 mg en un volumen de 1,5 ml, mientras que el extracto de timoestimulina tenía 147 mcg en un volumen de 3,5 ml (42 mcg/ml).

#### 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida

El SDS-PAGE fue preparado por el método de Laemmli empleando el gel al 15% y corriéndolo en un aparato Mini-Protean II durante 2 horas a 120 V. Veinte microlitros de timoestimulina fueron cargados en orificios separados en condiciones diferentes de reducción y calentamiento para la detección de proteínas con azul brillante de Coomassie R-250 y luego la transferencia a una membrana de nitrocelulosa.

#### 6. Pacientes y muestras de linfocitos

Se seleccionaron 30 sujetos afectados de rinitis perenne, de rinitis estacional y de asma bronquial extrínseca, con antecedentes heredofamiliares de **atopía**, y con valores de IgE sérica total superiores a  $210 \pm 74$  KU/L. Presentaron pruebas cutáneas de hipersensibilidad inmediata francamente positivas a ácaros, blátidos, hongos anemófilos y pólenes de diversas familias autóctonas. Sus edades estaban comprendidas entre los 22 y los 78 años y eran 20 mujeres y 10 varones en buen estado de salud general, y oólo sometidos a medicación antialérgica convencional (anti-H1 y  $\beta$ 2 agonistas).

Al momento de la toma de la muestra sanguínea, para separar sus linfocitos no estaban recibiendo inmunoterapia específica con alérgenos ni ningún medicamento inmunomodulador. Al mismo tiempo, como **controles**, se seleccionó a otros 20 sujetos de edades similares, 10 mujeres y 10 varones, no atópicos, cuyas IgE séricas totales eran de  $18 \pm 15$  KU/L, carentes de enfermedad respiratoria y/o dermatológica alguna ni de antecedentes heredofamiliares sospechosos de atopía cuyos linfocitos fueron sometidos a idéntico experimento que el de los atópicos. Así, 10 ml de sangre venosa obtenida en ayunas fueron sometidos a la técnica de Boyum<sup>7</sup> para separar los linfocitos en un gradiente de Ficoll-Hypaque (densidad 1.077 g/cm<sup>3</sup>) y luego conservarlos en un medio de cultivo tal como el RPMI 1640 (Gibco).

Todos los linfocitos estuvieron separados por pa-

ciente para valorar el efecto etario y su relación con la activación por las 3 “hormonas tímicas”. Estos péptidos fueron esterilizados (salvo los de la industria farmacéutica que estaban envasados en viales) por pasaje a través de un filtro Millipore de 0,22  $\mu$  antes de ser incorporado al cultivo celular.

#### 7. Dosajes de IL-4 e IFN-gamma en el cultivo celular

A un mililitro de la suspensión linfocitaria, cuya viabilidad se valoró microscópicamente mediante un frotis coloreado con Giemsa, se lo incubó con 10 mcg/ml de timoestimulina humana, con 4 mg/ml de timomodulina bovina y con 1,6 mg/ml de timosina- $\alpha$ -1, separadamente durante 24 horas, al cabo de las cuales se centrifugó la suspensión y se midió la cantidad de IL-4 e IFN-gamma producidos, por el método de ELISA,<sup>29</sup> empleando un antisuero de ratón contra la IL-4 e IFN-gamma humanas (Sigma Chemical Co. Clone n° 34019.111). Un sistema indicador enzimático PAP-anti-PAP facilitó su medición en la lectora correspondiente. Esta metodología se aplicó con los linfocitos provenientes de sujetos atópicos y de las personas no atópicas que sirvieron de grupo control de la experiencia.

#### 8. Análisis estadístico de los resultados

La comparación entre los grupos en estudio fue realizada por medio del método de la t de Student y del análisis de la varianza. Todos los métodos estadísticos presentaban dos colas; el valor de la p menor a 0,05 fue considerado de significación.

### Resultados

1. Los timos humanos obtenidos pesaron entre 4,4 gr y 50,5 gr en un paralelismo con la edad del occiso, consignándose un promedio de 26,86 gr para los 21 órganos viables estudiados histológicamente y que exhibieron integridad morfológica tanto de la corteza como de la médula.

2. El fraccionamiento del sobrenadante del homogeneizado humano a través de la columna de Sephadex G-50 exhibió la presencia de 3 picos proteicos correspondientes a los tubos 12-17; 33-37 y 39-43, cuyos contenidos proteicos medidos por el método de Bradford fueron de 42 mcg /ml en total.<sup>8</sup>

La sumatoria de estos picos proteicos fue denominada aleatoriamente como timoestimulina humana”, con la cual se realizaron los experimentos con los linfocitos de normales no-atópicos y de atópicos sintomáticos de diferentes edades para valorar el efecto estimulante si lo hubiere.

3. El SDS-PAGE reveló la presencia de por lo menos 3 grupos de bandas proteicas con pesos moleculares aproximados de 15-20 kDa el primero, de 28-30 kDa el segundo y de 50-60 kDa el tercero.

4. Las concentraciones de la IL-4 en el medio de cultivo linfocitario de las diferentes muestras analizadas reveló resultados dispares según el grupo estudiado. Así, los linfocitos controles de



**no atópicos** estimulados con timoestimulina humana mostraron valores decrecientes con la edad, pero con una media de 3,5 UI/ml y un DE  $\pm 1,643$ , dado que el valor máximo fue de 5,20 UI/ml (a los 30 años de edad) y el menor de 0,80 UI/ml (a los 70-79 años de edad). Los valores del IFN-gamma revelaron una media de 5,2 UI/ml y un DE de 0,82 con un máximo entre los 30 y 55 años y un mínimo entre los 70-79 años. Por su parte, los linfocitos de **no atópicos** fueron tratados con la timomodulina bovina, observándose una media de 3 UI/ml y un DE  $\pm 1,623$  con un valor máximo de 5,40 UI/ml (a los 30-39 años) y un mínimo de 1,50 UI/ml (a los 70-79 años). El IFN-gamma fue de 4,1 UI/ml y el menor de 0,98 UI/ml, a los 45 y 65 años. Por último, al incubarlos con timosina  $\alpha$ -1 se observó un promedio de 1,791 UI/ml con un DE  $\pm 1,487$  con un valor máximo de 3,15 UI/ml (a los 20 años) y un valor mínimo de 0,20 UI/ml (a los 70 años), mientras que el IFN-gamma fue de 2,95 UI/ml a los 20 años y de 0,90 UI/ml a los 70 años. La significación estadística de estos hallazgos fue la siguiente:

$p = 0,50$ ,  $p = 0,10$  y  $p = 0,50$ , respectivamente, en los 3 grupos descriptos.

Dentro del grupo de linfocitos **atópicos**, los valores hallados fueron muy distintos. Así, los incubados con la timoestimulina humana expresaron un promedio de 19,80 UI/ml con un DE  $\pm 3,46$ , mostrando un pico máximo a los 40 años y un mínimo a los 70 años; los estimulados con la timomodulina bovina exhibieron una media de 7,258 UI/ml con un DE  $\pm 1,34$ , mostrando un pico a los 30 años y un mínimo a 70 años, mientras que, por último, aquellos estimulados con timosina- $\alpha$ 1 revelaron un promedio de 5,866 con un DE  $\pm 3,02$ , con un máximo a los 20 años y un mínimo a los 70 años. Valores muy similares se lograron con el IFN-gamma a predominio de la timoestimulina humana con un pico entre los 30 y 50 años y un mínimo a los 79 años, con valores de 23 UI/ml como máximo y un mínimo de 8 UI/ml. La significación estadística de estos hallazgos fue la siguiente:  $p \leq 0,0001$ ,  $p \leq 0,001$  y  $p = 0,50$ , respectivamente, para los 3 grupos estudiados. (Tablas 1 y 2).

**Tabla 1.** Valores de la *il-4* en el sobrenadante del cultivo celular de linfocitos de atópicos (en UI/ml).

| Edades  | Incubados con timoestimulina humana | Incubados con timomodulina bovina | Incubados con timosina $\alpha$ -1 recombinante |
|---------|-------------------------------------|-----------------------------------|---|
| 20 - 29 | 16,20                               | 8,10                              | 6,20  |
| 30 - 39 | 20,00                               | 10,70                             | 8,10  |
| 40 - 49 | 24,10                               | 9,25                              | 10,00   |
| 50 - 59 | 22,55                               | 8,70                              | 5,20  |
| 60 - 69 | 20,70                               | 4,10                              | 4,40  |
| 70 - 79 | 15,30                               | 2,70                              | 1,30  |
|         | X: 19,80<br>DE: $\pm 3,46$          | X: 7,258<br>DE: $\pm 1,34$        | X: 5,866<br>DE: $\pm 3,02$                      |

**Significación estadística:**

Entre timoestimulina humana y bovina  $p \leq 0,0001$ .

Entre timoestimulina humana y recombinante  $p \leq 0,001$ .

Entre timomodulina bovina y recombinante  $p = 0,50$ .

**Tabla 2.** Valor del IFN- $\gamma$  en el sobrenadante del cultivo celular de linfocitos de no-atópicos (en UI/ml).

| Edades  | Incubados con timoestimulina humana | Incubados con timomodulina bovina | Incubados con timosina $\alpha$ -1 recombinante |
|---------|-------------------------------------|-----------------------------------|---|
| 20 - 29 | 38,50                               | 22,70                             | 18,70   |
| 30 - 39 | 35,20                               | 5,40                              | 2,90  |
| 40 - 49 | 35,10                               | 4,70                              | 2,50  |
| 50 - 59 | 32,70                               | 2,20                              | 1,20  |
| 60 - 69 | 31,10                               | 2,00                              | 0,80  |
| 70 - 79 | 32,78                               | 1,50                              | 0,20  |
|         | X: 3,50<br>DE: $\pm 1,643$          | X: 3,00<br>DE: 0,623              | X: 1,791<br>DE: $\pm 1,227$                     |

**Significación estadística:**

Entre timoestimulina humana y bovina  $p = 0,50$ .

Entre timoestimulina humana y recombinante  $p = 0,10$ .

Entre timomodulina bovina y recombinante  $p = 50$ .

## Discusión

Desde hace varias décadas que se conoce el papel crucial que desempeña el timo en la ontogenia y en la homeostasis del sistema inmunológico, tal como se resumiera en la introducción.

Desde que se sospechó que el timo podía desempeñar un papel “endocrino”, se efectuaron numerosas investigaciones tendientes a identificar la posible “hormona” y, así, Metcalf (J. Cancer. 1956;10:442) encontró que los extractos (muy crudos por cierto) de la zona medular eran mucho más activos que los de la corteza, hallazgo experimental que concuerda con la naturaleza histológica de las dos porciones tímicas.

Este autor demostró que un extracto acuoso termolábil de timo de rata era capaz de aumentar el número de linfocitos circulantes en ratas de poca edad.

Levey, Trainin y Clark (J. Natl. Cancer Int. 1963; 31:199) demostraron, por otra parte, que la administración de extractos tímicos de conejo a ratas adultas incrementaba la incorporación de precursores radioactivos en el ADN y proteínas a nivel de los ganglios linfáticos, hecho no lográble con la inyección de otros órganos linfoides.

El período crítico durante el cual el timo influye en el desarrollo inmunológico debe situarse en la vida embrionaria y en el período perinatal inmediato. De hecho, numerosas experiencias clásicas así lo avalan, pues la timectomía realizada en estas fases tiene consecuencias gravísimas en los animales de experimentación, del mismo modo que las deficiencias primarias (totales o parciales) en el ser humano condicionan cuadros clínicos de déficit de la inmunidad celular (T-dependiente) de indudable trascendencia aunque, en estos casos, los mecanismos puedan ser más complejos e involucren otros factores en su génesis. Por el contrario, esta intervención en la edad adulta no provoca grandes modificaciones (Miller (Nature [Londres]. 1961;191:248) y, hasta en casos muy especiales (miastenia gravis con timoma), su resección induce mejorías clínicas indudables.

Los astrocitos y las células epiteliales tímicas parecen poseer un origen común y elaboran un grupo de péptidos, transmisores, hormonas y citoquinas que funcionan como reguladores paracrinós y autocrinos.

El timo y las quimioquinas **TARC**, **TSLP** y **CTACK** son responsables de la atracción y el tráfico de los LTCD4-Th2 en la piel de los pacientes atópicos que sufren de eccema crónico, y parecen cumplir un papel relevante en el mantenimiento de dicha afección con las modificaciones histológicas *in situ* que ello significa.

Burnet (Scient. Am. 1962;206:50), intentando resaltar lo más importante de lo tratado sobre el timo en un simposio, señaló que sus factores hormonales eran responsables de:

1. la regulación de la linfopoyesis *in situ*; 2. el

mantenimiento de la viabilidad del timocito que va a colonizar un órgano linfopoyético, y 3. la estimulación de la linfopoyesis en los tejidos linfoides con producción de plasmocitos, que son los que sintetizan las inmunoglobulinas, y de linfocitos pequeños responsables de la alergia tardía, pero era prematuro sostener que una misma hormona era capaz de ejercer todas estas funciones.

Así, trató de establecer una función timotrópica y otra linfotrópica, más con criterio pedagógico y con prudencia investigativa que con pruebas concretas de su hipótesis.

Sin embargo, las interrelaciones (timo vs. sistema endocrino) fueron sospechadas desde 1964 con los trabajos de Levey (Scient. Am. 1964;211:66).

Se desconoce si el hipotálamo-hipófisis ejerce una influencia sobre el timo, en especial durante la vida fetal. No obstante, la acción del ACTH y de los corticoesteroides es bien conocida. Estas hormonas producen en forma dosis dependiente inhibición del timo, y es posible que la hidrocortisona tenga un papel regulador de la secreción tímica y de su actividad celulomisiática. La inyección de cortisol produce un aumento de las inclusiones PAS-positivas y la disminución del número de timocitos en mitosis.

Esta relación inversa también se observó en el último trimestre del embarazo; en cambio, durante el parto, hay una rápida caída de las inclusiones y de los corpúsculos de Hassall y un renacer de la actividad mitótica. Esto lleva a reflexionar acerca de que las inclusiones son depósitos de material secretado que estimularía la mitosis timocítica y que los corticoides inhiben su liberación, tal como lo postularon Csaba, Toro y Bodoky (Z. Mikorsk-anat. Forsch., 1963;69:467).

Según Szent-Gyorgy (Perspect. Biol. Med.1964; 7:279), un factor humoral producido por el timo estimularía el crecimiento y retardaría la maduración sexual. Tanto los estrógenos como la progesterona y los andrógenos ejercen efectos inhibidores e involutivos sobre el timo, aunque la mayoría de las experiencias se desarrollaron con estrógenos. En animales irradiados, los estrógenos pueden retardar y potenciar la actividad timolítica de las radiaciones.

La acción inhibidora de las hormonas sexuales sobre el timo se realizaría a través de las suprarrenales, pero no se descarta cierta acción directa, tal como se probó en animales a los cuales se les había extraído la hipófisis y las adrenales. Vittadini (Medicina & Higiene.1966;112:6.) demostró que en niños pequeños con hipertrofia tímica la estrogénoterapia inducía una rápida reducción del tamaño del timo.

Un hallazgo histopatológico de Damesheck (Ciba Foundation Symposium, Londres, 1966) es la hiperplasia del timo en pacientes con tirotoxicosis, lo cual fue corroborado en animales de experimen-

tación al suministrarles tiroxina; ello podría significar que esta hormona tendría un efecto estimulante sobre el órgano. Esto no implica que el timo funcione como glándula de secreción interna autónoma, pero sí que varias hormonas podrían ejercer efectos positivos o negativos sobre su funcionamiento.

Así, mientras que la tiroxina tendría un efecto estimulante, los corticoides y la gonadotrofina exhibirían un efecto inhibitorio. Las nuevas investigaciones acerca de un eje *hipotálamo-hipófiso-tímico* tendrían sustento sobre la base de experimentos realizados décadas atrás.

En varios trabajos se discute el condicionamiento Pavloviano de la respuesta inmune.

Las ratas a las que se les administra sacarina como estímulo condicionado junto con el inmunodepresor ciclofosfamida como estímulo no condicionado (pero que en este caso se usa porque produce náuseas) se detectó más tarde que se condicionaban para supresión inmunitaria con la sacarina sola. Esta observación llevó a una serie de experimentos, en los cuales la inmunidad mediada por anticuerpos y por células se deprimieron por condicionamiento.

En un experimento inverso, se utilizó con éxito también el condicionamiento para reducir significativamente la dosis de ciclofosfamida que se requiere para controlar el lupus sistémico en ratones.

Más alejadamente, los mediadores de los mastocitos también se han podido liberar in vivo por estímulo condicionado a un olor en cobayos y a un estímulo audiovisual en ratas.

Este trabajo es la segunda presentación en nuestro país del empleo de “hormonas tímicas” humanas valorando su actividad sobre los linfocitos, tal como lo hicieron en su momento Bena y Mordoh (Medicina. Buenos Aires. 1980;40:5-10) sobre la síntesis del ADN de linfocitos periféricos de pacientes con cáncer, no valorando en aquel momento la producción de citoquinas, dada la carencia de los reactivos específicos correspondientes.

En este caso, planificamos puntillosamente el experimento, habida cuenta de los datos discordantes de la bibliografía acerca de la utilidad o no de los tratamientos con factores u hormonas tímicas de cualquier origen, generalmente animal, en las enfermedades atópicas.<sup>13-14-15-16-19-20-21-22-23</sup>

Al compararse los hallazgos entre los diferentes grupos de linfocitos, se destaca que los controles no atópicos tratados con la timoestimulina humana mostraron una producción sostenida de IL-4 (3,50 UI/ml, DE  $\pm$  1,643) con un descenso paulatino hacia los pacientes de edad proveya (grupo de 70 – 79 años), lo cual no resulta una novedad con respecto a los hallazgos de la literatura médica y del prejuicio sobre la involución tímica. Estos mismos linfocitos controles tratados con timomodulina bovina presentan un comportamiento muy parecido al anterior, con un promedio productivo de IL-4 de

3,00 UI/ml con un DE  $\pm$  1,623 y un descenso no tan marcado con el avance de los años.

Por su parte, el empleo de timosina- $\alpha$ 1 parece ser el menos relevante en la síntesis de IL-4, pues se logra un promedio de 1,791 UI/ml con un DE  $\pm$  1,487 y el valor mínimo en el grupo de 70-79 años, que obligaría a valorar la liberación de otras citoquinas linfocitarias ante su empleo farmacológico tan promocionado en infecciones virales crónicas (hepatitis B y C, HIV) y en neoplasias.

Cuando se analizan los resultados obtenidos en el grupo de atópicos, se valora que espontáneamente estos linfocitos producen más IL-4 que los controles, aun a edades avanzadas, lo cual es coherente con la condición de atopía de los linfocitos donantes y, curiosamente, la posibilidad de la capacidad de reacción independiente de la edad.

Al comparar los grupos no atópico y atópico estimulados con timoestimulina humana, se detectó una significación con una  $p \leq 0,00001$ , lo cual ratifica la notable estimulación de la “hormona tímica” sobre los linfocitos de los atópicos, medida en función de la producción de IL-4. La comparación entre los 2 grupos al ser estimulados con timomodulina bovina la significación de la  $p$  fue de  $\leq 0,001$ , y al emplear timosina- $\alpha$ -1, la  $p$  fue de  $\leq 0,05$ . O sea que todas las hormonas empleadas indujeron una liberación de IL-4, aunque la más notoria fue la de la humana, luego la bovina y, por último, la timosina- $\alpha$ -1.

Todos estos hallazgos demuestran las propiedades linfoestimulantes de las “timoestimulinas” empleadas, no obstante su parcial purificación y la valoración de otras acciones sobre los linfocitos humanos.

El objetivo de trabajar con una población de linfocitos de atópicos pretendió valorar su presunta utilidad en el tratamiento de las enfermedades alérgicas, tal como algunos autores especularon en su momento, pero los incrementos de la IL-4 serían **contraproducentes** en dichos tratamientos por la mayor síntesis de la IgE sérica de los tratados, con las consecuencias clínicas que se podrían presentar. El aumento del IFN-gamma, con su gran importancia biológica, no parece contrarrestar los efectos negativos del incremento de la IL-4.

Estos datos concordarían con los de Lurie y su equipo, que no encontraron ningún beneficio al tratar a niños asmáticos atópicos ( $n = 40$ ) con timulina, ya que otros autores habían encontrado valores séricos muy bajos de las “hormonas”, atribuyendo este hallazgo a la disfunción LTCD4-Th1 atribuida al proceso respiratorio.

De acuerdo con nuestros datos, las timoestimulinas humana y bovina y, en menor grado, la recombinante, favorecerían la funcionalidad LTCD4-Th2, lo cual es contraproducente, según Romagnani y su equipo, sobre el balance entre ambas subpoblaciones linfocitarias, que, por otra parte, la inmunoterapia

convencional con aero-alergenos permite corregir en la mayoría de los casos, como lo asevera el informe de la OMS de 1998 (Allergy. 1998;44(53):2-42).

La timoestimulina **heteróloga** fue probada en infecciones virales como el herpes zóster y en reacciones graves a vacunas con virus atenuados, en las enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoidea y el LES, en patologías neoplásicas acompañando a los fármacos citotóxicos y a las radiaciones, en la sarcoidosis, en la candidiasis crónica, en el síndrome de Di George, en el defecto de la nucleósido-fosforilasa y de ADA, en la reacción de injerto versus huésped, en el síndrome de Wiskott-Aldrich y en el sida, con resultados poco convincentes la mayoría de las veces con su aplicación.<sup>24-25-26-27-28-30</sup>

Como estos productos son proteínas heterólogas, su aplicación reiterada puede desencadenar cuadros clínicos correspondientes a los tipos I y III de Gell & Coombs, tal como lo documentamos en un paciente con herpes zóster oftalmofacial en la época anterior a los fármacos antivirales (por ej., aciclovir) que sufrió brotes de urticaria aguda con angioedema y rinohidrorrea profusa luego de la aplicación reiterada de timoestimulina **bovina**.

El paciente presentó pruebas cutáneas positivas inmediatas al producto convenientemente diluido según técnica e IgE-RAST > de 0,35 PRU/ml contra dicho antígeno (dato no publicado), mejorando con tratamiento sintomático y supresión total del fármaco sospechoso.<sup>55-56-57-58-59-60</sup>

No obstante los hallazgos obtenidos, la purificación y mejor caracterización de estas "hormonas tímicas" podrían permitir conocer si alguna de ellas posee una actividad más específica sobre tal o cual citoquina o si responde a un fenómeno general de respuesta del todo o nada.<sup>17-18</sup>

Como se advierte, todos estos datos abren un panorama muy interesante en la revalorización del timo y su presunta participación en mecanismos reguladores poco conocidos todavía.<sup>33-34-35-36-37-38-39-40</sup>

Por otro lado, se intentará vincular los hallazgos en el timo con la detección en los astrocitos de los mismos animales de las modificaciones de la GFAP o proteína gliofibrilar ácida y del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) como índice de su activación específica, tal como se señaló en trabajos previos en el envejecimiento de ratas normales.<sup>31,32,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,5</sup>

## Bibliografía

1. Aiuti F. Immunologic and clinical investigation on a bovine thymic extract. *Pediat. Res.* 1979;13:797.
2. Aiuti F., Businco L. Effects of thymic hormones on immunodeficiency. *Clin. Immunol. Allerg.* 1983;3:187.
3. Aiuti F. A placebo-controlled trial of thymic hormone treatment of recurrent herpes simplex labialis infection. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1984;30:11.
4. Alonso A. Temas de Inmunoalergia. Tomos I al VI. Ed. CTM. Buenos Aires. 1998-2006.
5. Ammirati P. Immunoterapia con un estratto di timo bovino. *Folia Allerg. Immunol. Clin.* 1977;24:195.
6. Bernengo M.G. Thymostimulin therapy in melanoma patients. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 1983;28:311.
7. Bistoni F. Enhancement of natural killer cell activity in mice by a thymic factor. *Cancer Immunol. Immunother.* 1984;17:51.
8. Boyum A. Ficoll-Hypaque method for separating mononuclear cells from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 1966;sup.77.
9. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976;72:248.
10. Caputo G. Effect of a thymic extract in a case of angioimmunoblastic lymphadenopathy. *Haematologica.* 1982;67:64.
11. Consolini R. Primary thymic endocrine failure in HIV-1 infected children. *Pathobiology.* 2000;68:251.
12. Daddi G. A thymic hormone in pneumology. *Ind. J. Tuberc.* 1984;31:78.
13. Davies E. Treatment of cell mediated immunodeficiency with calf thymic hormone. *Pediat. Res.* 1982;16:573.
14. Falchetti R. Pharmacological and biological properties of a calf thymus extract. *Drug Exp. Clin. Res.* 1977;3:39.
15. Filchakov F.V. Mechanisms of inhibiting thymus endocrine function in tumor growth. *Fiziol. Zh.* 2003;49:56.
16. Franchi F. La timostimulina nel trattamento del lupus eritematoso sistemico. *Progr. Med.* 1977;33:893.
17. Goldstein A.L. Thymosins. *Clin. Immunol. Allerg.* 1983;3:119.
18. Goya RG. Thymus and aging. *Gerontology.* 2002; 48:325.
19. Goya RG. Thymulin and the neuroendocrine system. *Peptides.* 2004;25:139.
20. Labunets I.F. Age related characteristics of the thymus and adrenal cortex function in CBA mice immunized by T-dependent antigen. *Fiziol Zh.* 2005;51:77.
21. Labunets IF. The pineal gland's peptides factors and the rhythms of functions of the thymus and bone marrow in animals during aging. *Adv. Gerontol.* 2004;13:81.
22. Laemmli U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970; 277: 680.
23. Lauria F. Effect of a thymic factor on T cells in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood.* 1984;64:667.
24. Lurie A. Serum thymic hormone thymulin activity is normal in children with asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 1989;84:386.
25. Martelli MF. The in vivo effect of a thymic factor in Hodgkin disease. *Cancer.* 1982;50:490.
26. Merlino PG. Evidence for the direct action of thymulin on avian NKC. *Dev. Comp. Immunol.* 2001;25:337.
27. Playfair J y Chain B. *Immunology at a glance.* Blackwell Ed. Londres. 2005.
28. Santarelli L. Reduced thymulin production during occupational exposure to lead. *G. Ital. Med. Lav. Ergon.* 2005;27:68.



29. Savino W. Abnormal thymic microenvironment in insulin-like growth factor II transgenic mice. *Neuroimmunomodulation*. 2005;12:100.
30. Trainin N. Biochemical and biological properties of THF in animal and human models. *Annals of the New York Academy of Sciences*. Vol. 332. Ed. H. Friedman. 1979.
31. Vanzani M.C., Caccuri R., Iácono R., Alonso A., Berría M.I.: Acerca de la astrocitosis espontánea y de su componente proliferativo en curso del envejecimiento. *Medicina (Buenos Aires)*. 2001;61:699.
32. Vanzani MC, Iácono R, Alonso A, Berría MI. Análisis cuantitativo de la expresión del antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA) en cultivos astrocitarios a largo tiempo. *Medicina (Buenos Aires)*. 2004;64:678.
33. Wada S. Improved ELISA to measure thymosin alpha 1. *Int. J. Immunopharmacol*. 1988;10:795.
34. Wara DW. Thymic hormones in primary immunodeficiencies. *Clin. Immunol. Allerg.* 1983;3:169.
35. Cuéllar A. Linfopoyetina estromal tímica: regulación de la respuesta inmune y la enfermedad alérgica. *Universitas Scientiarum*. 2007;12(1):5-13.
36. Naranjo P. "Timo, inmunización y alergia". Ed. Universidad de Quito - Ecuador. 1969.
37. Ziegler SF. Thymic stromal lymphopoietin in normal and pathogenic T cell development and function. *Nat. Immunol*. 2006;7:709-14.
38. Zhou B. Thymic stromal lymphopoietin as a key initiator of allergic airway inflammation in mice. *Nat. Immunol*. 2005;6:1047-53.
39. Yoo J. Spontaneous atopic dermatitis in mice expressing an inducible thymic stromal lymphopoietin transgene specifically in the skin. *J. Exp. Med*. 2005;202:541-9.
40. Watanabe N. Human thymic stromal lymphopoietin promotes dendritic cell mediated CD4+ T cell homeostatic expansion. *Nat. Immunol*. 2004;5:426-34.
41. Watanabe N. Hassall's corpuscles instruct dendritic cells to induce CD4+ CD25+ regulatory T cells in human thymus. *Nature*. 2005;436:1181-5.
42. Wang YH. Maintenance and polarization of human Th2 central memory T cells by thymic stromal lymphopoietin-activated dendritic cells. *Immunity*. 2006;24:673-5.
43. Urashima M. Gene expression profiles of peripheral and cord blood mononuclear cells altered by thymic stromal lymphopoietin. *Pediatr. Res*. 2005;57:563-9.
44. Stock P. Induction of T helper type 1 like regulatory cells that express Foxp3 and protect against airway hyperactivity. *Nat. Immunol*. 2004;5:1149-56.
45. Soumelis V. Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP. *Nat. Immunol*. 2002;3:673-80.
46. Rimoldi M. Intestinal immune homeostasis is regulated by the crosstalk between epithelial cells and dendritic cells. *Nat. Immunol*. 2005;6:507-14.
47. Ito T. TSLP activated dendritic cells induced an inflammatory Th2 cell response through OX40 ligand. *J. Exp. Med*. 2005;202(9):1213-23.
48. Reche PA. Human thymic stromal lymphopoietin preferentially stimulates myeloid cells. *J. Immunol*. 2001;167:336-43.
49. Gray D.H. Controlling the thymic microenvironment. *Curr. Opin. Immunol*. 2005;17:137-43.
50. Jameson SC. Maintaining the norm: T cell homeostasis. *Nat. Rev. Immunol*. 2002;2:547-56.
51. Lanzavecchia A. Understanding the generation and function of memory T cell subsets. *Curr. Opin. Immunol*. 2005;17:326-32.
52. Levin S.D. Thymic stromal lymphopoietin: a cytokine that promotes the development of IgM+ B cells in vitro and signals via a novel mechanism. *J. Immunol*. 1999;162:677-83.
53. Liu Y.J. Thymic stromal lymphopoietin: master switch for allergic inflammation. *J. Exp. Med*. 2006;203:269-73.
54. Bach J. Biochemical characterization of a serum thymic factor. *Nature*. 1977;266(5597):55-7.
55. Hadley A.J. Thymulin stimulates corticotrophin release and cyclic nucleotide formation in the rat anterior pituitary gland. *Neuroimmunomodulation*. 1997;4(2):62-9.
56. Dardenne M. Role of thymulin or its analogue as a new analgesic molecule. *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 2006;1088:153-63.
57. Wade S. Thymulin (Zn-facteur thymique serique) activity in anorexia nervosa patients. *Am. J. Clin. Nutr*. 1985;42(2):275-80.
58. Alonso A. "Fundamentos de Alergia para el Médico General". Ed. El Ateneo. Buenos Aires. 1996.
59. Alonso A, Albónico JF, Mouchián K, Pionetti CH, Varela MR. Alergia atópica. Ed. H. Macchi. Buenos Aires. 1987.
60. Alonso A, Pionetti CH, Rodríguez SR, Regueiro MR, Mouchián K, Albónico JF. Efecto de las hormonas tímicas sobre la síntesis de IL-4. *Prensa Méd. Argent*. 2011;98:133-9.