

COMBINACIONES DE CÉLULAS DE TIMO Y MÉDULA ÓSEA: SINERGIA EN LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS

Traducción y modificación del trabajo original:

HENRY N. CLAMAN, EDWARD A. CHAPERON and R. FASER TRIPLETT. 1966. Thymus-Marrow Cell Combinations. Sinergism in Antibody Production. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 122:1167–1171.

G. POUSADA FERNÁNDEZ; N. CARBALLO FERNÁNDEZ & O. MARIÑO CRESPO

gupousada@alumnos.uvigo.es, inatcarballo@alumnos.uvigo.es, omarino@alumnos.uvigo.es

Alumnos 3º Bioloxía, Materia: Introducción á Historia da Inmunoloxía (2006-2007),

Universidade de Vigo. Profesor: José Faro Rivas.

Resumen: Inyectamos suspensiones que contenían células de timo, bazo o médula normales en ratones singénicos irradiados, a los cuales se les inyectó como antígeno glóbulos rojos de oveja (GRC). Las células de bazo normal dieron lugar a áreas discretas de producción de anticuerpos en los bazos receptores, y el número de áreas fue proporcional al número de células transferidas. Los ratones que recibieron tanto células de timo como de médula tuvieron más centros de actividad hemolítica en sus bazos que los ratones que las recibieron por separado.

Resumo: Inxectamos suspensións que contiñan células de timo, bazo e médula ósea normais en ratos sinxénicos irradiados, ós que se lles inxectou como antíxeno glóbulos vermellos de ovella (GRC). As células do bazo normal xeraron áreas discretas de produción de anticorpos nos bazos receptores, e ó número de áreas foi proporcional o número de células transferidas. Os ratos que recibiron tanto células do timo como de médula tiveron mais centros de actividade hemolítica nos seus bazos que os ratos que a recibiron por separado.

INTRODUCCIÓN

La fuente de células potencialmente inmunocompetentes y los mecanismos reguladores implicados en su maduración son problemas de gran interés sin resolver. Recientemente se han acumulado evidencias considerables que indican que el timo juega un importante papel en la linfocitopoyesis y en el desarrollo y mantenimiento del sistema inmunitario (Good y Gabrielsen 1964). Aunque en un timo sano se sintetizan pequeñas cantidades de anticuerpos (Landy et al. 1965), un papel más importante para esta estructura puede ser suministrar células linfoides potencialmente competentes que migran a otras estructuras linfoides como el bazo o los ganglios linfáticos, para diferenciarse en células inmunológicamente activas (Nossal 1964). También existen datos que muestran que el timo puede producir un producto semejante a una hormona difusible que promueve la multiplicación y maduración de las células linfoides en los tejidos linfoides periféricos (Metcalf 1956, Levey et al. 1963, Osoba y Millar 1964). Estos dos mecanismos no son mutuamente excluyentes.

Los experimentos aquí descritos buscaban probar la existencia de células potencialmente inmunocompetentes en el timo, de acuerdo con el método para células de bazo recientemente descrito por Playfair et al. (1965). Este método permite el estudio de células potencialmente inmunocompetentes mediante la demostración de clones discretos de células activas productoras de anticuerpos, procedentes de un cierto número de células progenitoras no sensibilizadas que son transferidas a hospedadores irradiados y estimulados con antígeno. En el transcurso de estos experimentos, hemos encontrado que la combina-

ción de células normales de timo y de médula ósea es mucho más activa produciendo hemolisinas que ambas por separado. La actividad injerto contra hospedador de las células se eliminó dado que usamos células donantes y receptoras de la misma cepa consanguínea.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se sometió a ratones LAF1 y CBA/J de entre 9 y 12 semanas de edad a una exposición de rayos X de entre 650-750 r (en el aire) y 250 kvp (30 ma, 0.5 mm CU, 1.0 mm Al, 100 cm) seguida de inyecciones intravenosas de células singénicas (bazo, timo, médula o timo y médula). El bazo donante o las suspensiones de timocitos se obtuvieron forzando al tejido a pasar a través de una malla de acero inoxidable en solución salina F fría. La médula se extrajo de fémures, forzando el paso de una solución salina a su través con una jeringuilla tras haber cortado las epífisis, y las suspensiones se obtuvieron pasando las muestras de médula a través de una aguja graduada número 26. Las células se lavaron en solución salina F fría y las contamos en un hemocitómetro. Se ajustaron las concentraciones de modo que cada animal recibió el número deseado de células en 0,5 mL de solución salina F. Cuando los ratones recibieron tanto células de timo como de médula, ambas poblaciones celulares se habían mezclado un poco antes de la inyección, en un volumen total de 0,5 mL. A todos los sujetos se les inyectó una muestra antes de que hubieran transcurrido dos horas tras la irradiación.

En el primer grupo de experimentos, se les inyectó a los ratones 0,2 mL de una suspensión al 10% de eritrocitos de oveja lavados durante el primer día tras la irradiación. Cinco días después de la irradiación se sacrificaron

los ratones y se les extrajo los bazos, cortamos éstos en fragmentos y los pusimos a continuación en placas siguiendo la técnica de Playfair et al. (1965), excepto que la pulpa roja no fue eliminada de los fragmentos. Tras dos horas de incubación a 37° C añadimos 2 mL de complemento de cobaya al 33% en cada placa. Se incubaron las placas 30 minutos más y se fijaron añadiendo formalina neutra al 10% sobre la superficie de los cultivos; a continuación se marcaron con un código y se contaron mediante un ensayo ciego usando dos métodos.

Los fragmentos de bazo con hemólisis circundante significativa (trozos activos), no estaban distribuidos aleatoriamente, sino que

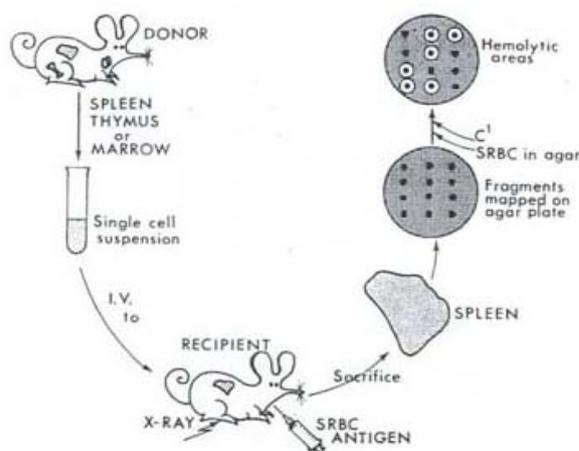


Fig. 1. Diseño experimental.

tendían a aparecer en grupos o “áreas activas”. Playfair et al. (1965) demostraron que un área activa probablemente deriva de un grupo de células precursoras, pero cuando hay muchos fragmentos activos la delimitación de áreas activas concretas resulta complicada ya que tienden a solaparse. Por esta razón, se calculó el porcentaje de fragmentos de bazo con hemólisis y se denominó “actividad específica”. Encontramos que estaba relacionado linealmente con el número de áreas activas y que permitía el conteo cuanti-

tativo de un amplio espectro de actividades. Durante la evaluación de los datos consideramos que dos errores estándar eran el intervalo de confianza del 95%.

Para determinar el porcentaje de células que alcanzaban los bazos receptores, se incubaron por separado suspensiones de células de bazo y timo CBA durante 6 horas y media con H³-timidina. Fueron lavadas las células y determinado el porcentaje de células marcadas mediante autoradiografías de las alícuotas. A los ratones receptores se les inyectó 10⁶ células de timo o de bazo por vía intravenosa y se sacrificaron 1 hora después. Con sus bazos se hicieron suspensiones simples y se determinó el número de células totales. Hicimos frotis de las alícuotas medidas y determinamos mediante autoradiografía el número de células marcadas. El número total calculado de células marcadas en el bazo fue de 6,5% de las inyectadas del bazo y el 2,9% de las de timo. Asumiendo que la distribución de las células marcadas reflejaba la distribución de todas las células donantes, aproximadamente el doble de células de bazo que de timo llegaron a los bazos receptores.

RESULTADOS

En la Tabla I se muestran los resultados del primer grupo de experimentos, usando células normales e inmunizadas de bazo y de timo. Cuando inyectamos 5 x 10⁶ células de bazo de ratones CBA/J no inmunizados en unos receptores singénicos irradiados, el número medio de áreas activas en el bazo 5 días después era unas 2,5 veces que el encontrado cuando inyectamos 2 x 10⁶ células de bazo. Aproximadamente 2,2 x 10⁶ células producían un área activa en ambos casos.

Quinientas mil células de bazo de donantes a los cuales se les habían inyectado eritrocitos de oveja 3 días antes producían tantas áreas activas como 2 millones de células de ratones no inmunizados. Las células de timo de donantes normales e inmunizados no produjeron un número significativamente distinto de áreas activas que los controles, a los cuales no se les inyectó ninguna célula.

En el siguiente grupo de experimentos, los receptores irradiados con rayos X recibieron inyecciones del antígeno en el primer y cuarto día y fueron sacrificados al octavo día tras la irradiación (Tabla II).

A algunos animales se les dio 10^7 células singénicas de médula, bien solas o junto con células de timo. Los bazos de los ratones que recibían 5×10^7 células de timo más 10^7 células de médula generaban más zonas de lisis y considerablemente más grandes que los animales que habían recibido sólo uno u otro tipo celular. La médula no producía actividad por sí sola mayor que el nivel basal, pero el timo

por sí mismo producía una ligera actividad a los 8 días.

En los subsiguientes experimentos se usaron ratones LAF1/J por su gran resistencia a los rayos X. La figura 2 presenta los datos combinados de 6 experimentos mostrando la actividad específica en función de la dosis de timocitos. Cuando los ratones recibieron 10^7 células de médula (Graf. 2, línea superior), la curva de respuesta era lineal por lo menos hasta los 5×10^7 timocitos, de los cuales $5,5 \times 10^6$ células generaron un área activa y un 10% de actividad específica. Las células de timo por separado (Graf. 2, línea inferior) eran mucho menos efectivas y se necesitaron aproximadamente $4,3 \times 10^7$ células para generar un área activa (10% de actividad específica).

En el experimento recíproco, evaluamos la respuesta hemolítica en función del número de células de médula inyectadas. En los grupos de ratones que recibieron un número variable de células de médula más 2×10^7 células de timo (línea superior), la respuesta fue

Tabla I. Producción de áreas activas de hemólisis en bazos de ratones CBA que fueron irradiados y se les inyectó células de bazo y timo en el día 0, eritrocitos de oveja en el día 1 y que fueron sacrificados en el día 5.

CÉLULAS INYECTADAS	Nº DE CÉLULAS ($\times 10^6$)	ÁREAS ACTIVAS POR BAZO	MEDIA DE ÁREAS ACTIVAS
Bazo normal	2	00111112	0.83
Bazo normal	5	111122222222334444	2.3
Bazo inmunizado	0.5	00113	0.80
Bazo inmunizado	5	*****	*
Timo normal	20	00000002	0.25
Timo normal	50	0000	0.0
Timo normal	90	00011	0.40
Timo inmunizado	100	000	0.0
Control	0	0000000000000001111	0.2

* Demasiadas áreas activas para contarse con precisión.

Tabla II. Actividad hemolítica en los bazo de ratones CBA que fueron irradiados y que se les inyectó células de bazo, timo y/o de médula en el día 0, eritrocitos de oveja (iv en el día 1 e ip en el día 4) y que fueron sacrificados en el día 8.

CÉLULAS INYECTADAS	Nº DE CÉLULAS (x 10 ⁶)	ÁREAS ACTIVAS POR BAZO	MEDIA DE ÁREAS ACTIVAS	ACTIVIDAD ESPECÍFICA MEDIA
Timo	30 – 50	000111112333	1.3	12.3 ± 3.9
Médula	10	00000000001111122	0.5	1.6 ± 0.5
Timo + Médula	50 + 10	1334*****	< 3.0	70.7 ± 3.3
Bazo	5	12334*****	< 3.0	66.1 ± 9.0
Ninguna		00000000111112	0.5	7.4 ± 2.9

ca

* Demasiadas áreas activas para contarse con precisión.

lineal entre 2×10^6 y 2×10^7 células de médula, pero se estabilizó a mayores dosis de médula. Los ratones que recibieron únicamente células de médula (Graf. 3, línea inferior) nun-

fueron significativamente más activos que los controles, a los cuales no se les suministró ninguna célula.

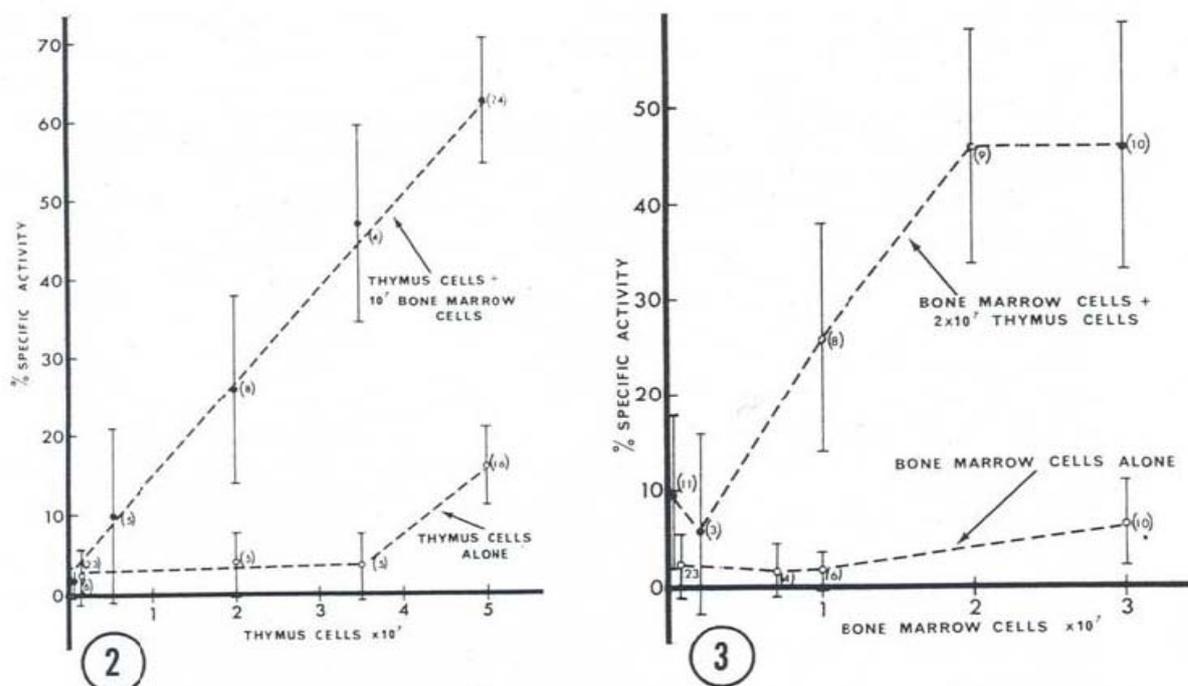


Fig. 2. Gráficas con el porcentaje de la actividad específica hemolítica.

Gráfica 2: Porcentaje de actividad específica hemolítica de receptores de fragmentos de bazo frente al número de células de timo o de timo y 10^7 células de médula inyectadas.

Gráfica 3: Porcentaje de actividad específica hemolítica de receptores de fragmentos de bazo frente al número de células de médula o de médula y 2×10^7 células de timo inyectadas.

En ambas gráficas, los números entre paréntesis son el número de ratones usados en cada punto. El intervalo indica dos errores estándar.

DISCUSIÓN

Los resultados confirman el trabajo de Playfair et al. (1965) mostrando la producción de grupos de células productoras de anticuerpos en los bazos de ratones singénicos irradiados a los cuales se les había suministrado células normales de bazo y luego el antígeno. En cuanto al rango testado, el número medio de áreas activas era directamente proporcional al número de células inyectado. 5×10^6 células de bazo produjeron más áreas activas en los experimentos de 8 días que en los experimentos de 5 días. Ya que $2,2 \times 10^6$ células normales de bazo producían un área activa, que presumiblemente contienen una célula precursora, y puesto que el 6,5% de las células de bazo transferidas (marcadas *in vitro*) aparecían en el bazo receptor, entonces hay un precursor por cada 143.000 células normales de bazo. Aunque es posible que más células puedan localizarse finalmente en el bazo después de ser retenidas temporalmente en los pulmones, el valor que presentamos aquí concuerda bastante bien con el 4% presentado por Playfair et al. (1965) en las 24 horas siguientes a la transferencia. Puesto que un bazo normal de ratón posee sobre 10^8 células nucleadas, equivaldría a unas 700 células precursoras. Esto es considerablemente más que los 50 precursores estimados por Maki-nodan y Albright (1962) o que los 100 precursores estimados por Jerne et al. (1963)

El timo no parece contener células semejantes potencialmente inmunocompetentes, puesto que los timocitos de donantes normales o inmunizados no producían actividad hemolítica significativa en los bazos receptores a los 5 días. A los 8 días había una ligera actividad en los ratones receptores de células de timo, pero ninguna en los que recibieron

células de médula. La combinación de células de timo y médula, sin embargo, produjo más áreas activas y una mayor actividad específica de las que pueden dar cuenta la suma de las actividades de las dos poblaciones donantes.

La interpretación más simple es que una población celular contiene células capaces de sintetizar anticuerpos ("células efectoras"), pero solamente en presencia de células de otra población ("células auxiliares"). Estos datos no establecen qué suspensión celular contiene las células efectoras o las auxiliares ni cómo interactúan estas células (Fishman 1959, Auerbach 1965, Globerson 1966).

Otros experimentos de transferencias han mostrado la producción de anticuerpos por las células del timo de donantes inmunizados, pero las células generalmente han sido transferidas muchas semanas después de que comenzara la inmunización del donante (Stoner y Bond 1963). La conocida actividad productora de anticuerpos de la médula de donantes inmunizados (Gengozian et al. 1963), junto con la evidencia de que las células de médula migran a través del timo (Harris y Ford 1964), hacen posible que la inmunocompetencia de timos transferidos de donantes inmunizados es debida a la presencia de células derivadas de la médula dentro del timo. Una cantidad creciente de datos muestra que la inmunocompetencia de las células de médula es debida a la presencia del timo (Globerson y Feldman 1964, Millar et al. 1964). En base a todos estos datos, nosotros creemos que es más probable que la célula efectora en nuestros experimentos derive de la médula, y que el timo suministre las células auxiliares.

BIBLIOGRAFÍA

- ALBRIGHT, J. F., MAKINODAN, T. 1966. *Growth and senescence of antibody-forming cells*. J. Cell. Comp. Physiol., 60 (suppl. 1): 185.
- AUERBACH, R. 1965. *Experimental analysis of lymphoid differentiation in the mammalian thymus and spleen*, p. 539. In *Organogenesis*, (R. De Haan and H. Ursprung, editors). Holt, Rinehart, and Wistar Press, New York.
- FELDMAN, M., GLOBERSON, A. 1964. *The role of the thymus in restoring immunological reactivity and lymphoid cell differentiation in x-irradiated adult mice*. Acad. Sci., 120: 182-190.
- FISHMAN, M. 1959. *Antibody formation in tissue culture*. Nature, 183:1200-1201.
- GENGOZIAN, N., MAKINODAN, T., SHEKARCHI, L. C. 1961. *Transplantation of antibody-forming cells in lethally irradiated mice*. J. Immunol., 86, 113-122.
- GLOBERSON, A. 1966. *Immunocompetence of spleen cells from neonatally thymectomized mice conferred in vitro by a syngeneic thymus extract*. J. Exp. Med., 130: 765-75.
- GOOD, R. A., GABRIELSEN, A. E., eds. 1964. En: *The Thymus in Immunobiology*, Hoeber-Harper, New York.
- HARRIS, J. E., FORD, E. E. 1964. *Cellular traffic of the thymus: experiments with chromosome markers. Evidence that the thymus plays an instructional part*. Nature, 201: 884-885.
- JERNE, N. K., NORDIN, A. A., HENRY, C. 1963. En: *Cell-bound Antibodies*, 1: 109. Wistar Inst. Press, Philadelphia.
- LANDY, M., SANDERSON, R.P., BERNSTEIN, M. T., LERNER, E. M. 1965. *Involvement of thymus in immune response of rabbits to somatic polysaccharides of gram-negative bacteria*. Science, 147: 1591-1592.
- LEVEY, R. H., TRAININ, N., LAW, L. W. 1963. *Evidence for function of thymic tissue in diffusion chambers implanted in neonatally thymectomized mice. Preliminary report*. J. Natl. Cancer Inst., 31:199-217.
- METCALF, D. M. 1956. *The thymic origin of the plasma lymphocytosis stimulating factor*. Br. J. Cancer., 10:442-457.
- MILLER, J. F. A. P., LEUCHARS, E., CROSS, A. M., DUKOR, P., ANN, N. Y. 1964. *Immunologic role of the thymus in radiation chimeras*. Acad. Sci., 120: 205-17.
- NOSAL, G. J. V. 1964. *Studies on the rate of seeding of lymphocytes from the intact guinea pig thymus*. Ann. NY Acad. Sci., 120:171-181.
- OSOBA, D., MILLER, J. F. A. P. 1964. *The lymphoid tissues and immune responses of neonatally thymectomized mice bearing thymus tissue in millipore diffusion chambers*. J. Exp. Med., 119: 177-194.
- PLAYFAIR, J. H. L., PAPERMASTER, B. W., COLE, L. J. 1965. *Focal antibody production by transferred spleen cells in irradiated mice*. Science, 149: 998-1000.
- STONER, R. D., BOND, V. P. 1963. *Antibody formation by transplanted bone marrow, spleen, lymph nodes and thymus cells in irradiated recipients*. J. Immunol., 91: 185-196.