

Aspectos citológicos del timo de conejo en cultivo organotípico

AURA JUDITH PEREZ-ZAPATA * e IRMA DELEON R *

Departamento de Morfología,
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas,
México, D. F.

PÉREZ-ZAPATA, A. J. e I. DELEÓN R.. 1980. Aspectos citológicos del timo de conejo en cultivo organotípico. *An. Esc. nac. Cienc. biol. Méx.*, 23: 155-162.

RESUMEN: Se describe la citología del timo de conejo de un día y de las siembras y re-siembras del mismo, manteniendo en cultivo organotípico *in vitro*, durante periodos que varían de 8 a 73 días; se comprueba que un medio a base de sales y extracto embrionario de pollo, con un soporte de gelosa, permite la supervivencia del órgano y favorece la diferenciación de algunos tipos celulares. Se presentan signos de degeneración celular en tiempos que varían de acuerdo con la edad del timo y con el tiempo de cultivo. Se manifiestan las interrelaciones estructurales que existen entre las células epiteliales reticulares y los linfocitos durante algunas etapas de la diferenciación de estos últimos.

INTRODUCCIÓN

La literatura inicial, relacionada con la descripción morfológica del timo, proporciona los conocimientos básicos sobre la estructura de este órgano (Flammar, 1921, 1936; Klemperer, 1938; Maximow, 1909, 1928). Posteriormente se han publicado numerosos informes sobre la estructura fina del timo en los que se establece la identidad de la célula epitelial reticular, el componente celular del timo con características singulares.

Sin embargo, todavía no se puede adoptar una posición definitiva en lo que respecta a la función de este órgano; muchos autores lo consideran exclusivamente linfoide, otros como un órgano de función mixta, es decir, productor de linfocitos y de una hormona que se supone influye sobre varios procesos en el organismo. Por otra parte, se discute el origen y la función de los linfocitos tímicos y las conclusiones a las que se llega son muy contradictorias (Ball y Auerbach, 1960; Hoshino y Takeda, 1969; Cabanie y Mirouze, 1969; Cesarini *et al.* 1968); la opinión general sobre las células epiteliales tímicas también está dividida respecto al papel que juegan en el funcionamiento del timo (Kostowiecki, 1968; Mandel, 1968; Clamon, 1966; Tomatis y Wang, 1965).

En contraste con la excelente literatura descriptiva, el número de trabajos experimentales sobre el desarrollo del timo es muy restringido. El conocimiento de

* Becarias de la C.O.F.A.A.

la diferenciación linfoide es un requisito esencial para la caracterización celular de muchos fenómenos biológicos cruciales tales como el rechazo de homoinjertos, la formación de anticuerpos, la génesis de la leucemia, la recuperación después de la irradiación (Auerbach, 1960, 1961, 1965, 1970); y básicamente el origen y función de los linfocitos tímicos (Moore y Owen, 1967a). La información específica sobre este aspecto se ha conseguido principalmente por el cultivo de los tejidos del rudimento embrionario del timo de ratón; Ball y Auerbach (1960), obtuvieron la diferenciación *in vitro* del rudimento del timo de embriones de ratón de 12 días, con formación de linfocitos.

En el presente trabajo se intenta establecer las condiciones adecuadas para el cultivo *in vitro* del timo de conejo de un día de edad, así como las características celulares de su comportamiento en cultivo, con objeto de hacer una contribución al esclarecimiento del origen de los linfocitos del timo. Se ha adoptado la técnica de Wolff y Haffen para el cultivo de órganos embrionarios, porque se creyó que proporcionaría al timo en vías de desarrollo un medio adecuado de crecimiento (Wolff y Haffen, 1951; Gaillard, 1951, Wolff, 1952).

MATERIAL Y MÉTODOS

Se hicieron las siguientes siembras y resiembras del timo de conejo de un día de nacido:

C₁₁, C₁₂, C₁₃, C₁₄, con ocho días en cultivo.

R₁C₁₁, R₁C₁₂, con dieciséis días en cultivo.

R_sC₁₃ y R_sC₁₄, con setenta y dos días en cultivo.

El método para la siembra, la resiembra y para el estudio histológico y citológico, ha sido publicado con anterioridad (Pérez Zapta y Delcón, 1971).

RESULTADOS

La observación microscópica de las preparaciones teñidas con hematoxilina-eosina de los timos testigo no cultivados y de los cultivos del mismo órgano, da los siguientes resultados:

Timo testigo de conejo de un día de nacido. Fijado inmediatamente después de la disección, se observa la estructura característica de este órgano. Los lobulillos están delimitados por escaso tejido conjuntivo. La zona cortical y la medular se encuentran bien diferenciadas en la mayoría de los lobulillos, se observan algunos corpúsculos de Hassall y pocos eosinófilos, sólo formas maduras; linfoblastos y linfocitos, estos últimos más abundantes en la zona cortical.

Cultivos de 8 días. Son los cultivos marcados C₁₁, C₁₂, C₁₃ y C₁₄. Los lobulillos se observan perfectamente delimitados y hay aumento del tejido conjuntivo interlobulillar. Persiste la delimitación entre la zona cortical y la zona medular, los corpúsculos de Hassall son escasos y bien conservados. Se observan en general más formas celulares inmaduras que maduras; abundantes linfoblastos, mielocitos eosinófilos y linfocitos; escasos eosinófilos maduros. Se observan algunos linfocitos con una ampolla nuclear y algunas células epiteliales reticulares cuyo citoplasma parece unirse al citoplasma de células plasmáticas. En el C₁₄ no se encontraron ampollas nucleares. Se observan además células alargadas con núcleos igualmente alargados, semejantes a fibroblastos y células gran-

des ovals o poliédricas con núcleo grande, denso, que ocupa casi todo el volumen de la célula, estas células se encuentran también en el tejido conjuntivo perilobulillar. (Figs. 1 y 2).

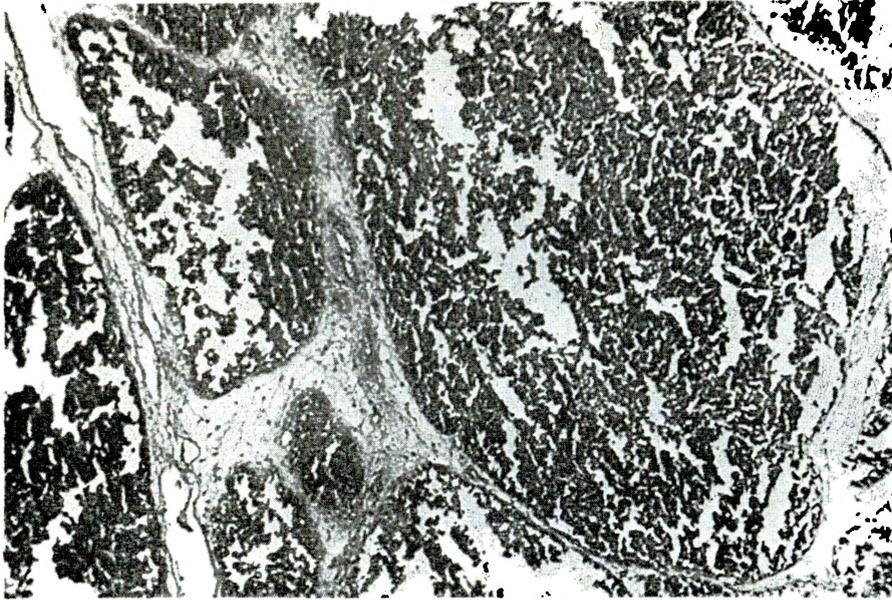


FIG. 1. Cultivo de 8 días de timo de conejo de un día. Aumento del tejido conjuntivo interlobulillar. Técnica Hematoxilina-Eosina. X 75.

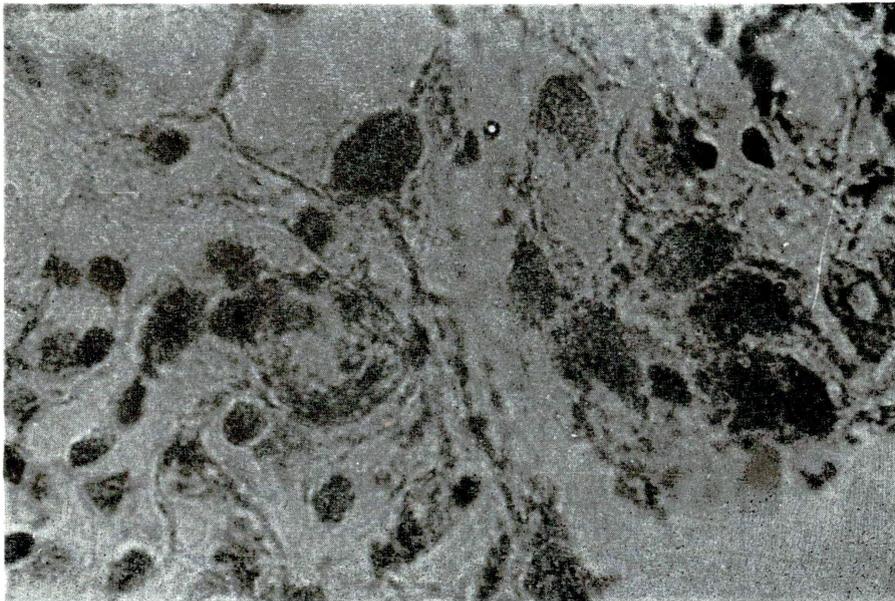


FIG. 2. Cultivo de 8 días de timo de conejo de un día. Fibroblastos interlobulillares, linfocitos, células epiteliales poliédricas. Técnica Hematoxilina-Eosina. X 1200.

Cultivos de 16 días. Observaciones correspondientes a las resiembras $R_1 C_{11}$ y $R_1 C_{12}$. Se conserva la estructura normal de los lobulillos que se encuentran perfectamente delimitados, hay aumento del tejido conjuntivo interlobulillar; la separación de corteza y médula es evidente en algunos lobulillos, se encuentran algunos corpúsculos de Hassall bien conservados y eosinófilos en diferentes estados de maduración. (Fig. 3). En algunas zonas corticales la distribución de los

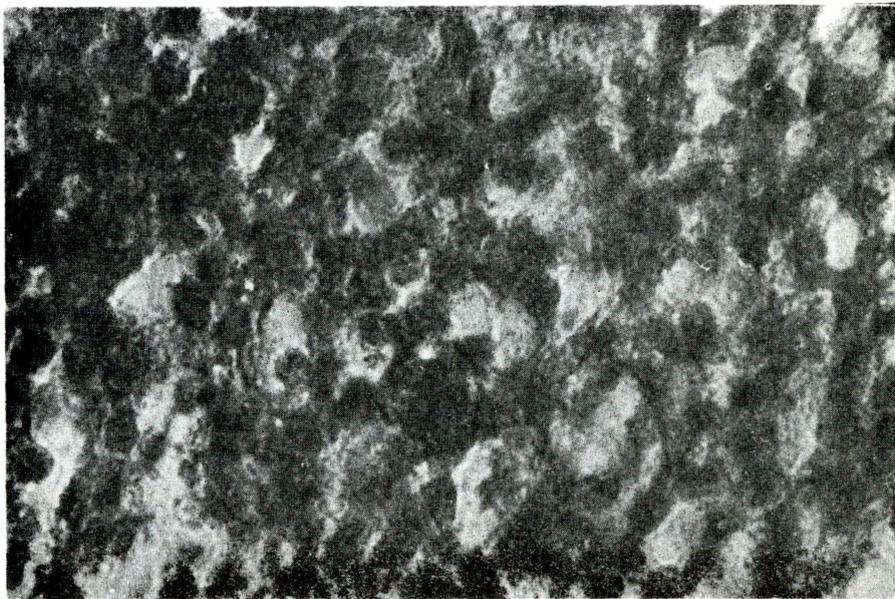


FIG. 3. Cultivo de 16 días de timo de conejo de un día. Mielocitos eosinófilos. Técnica Hematoxilina-Eosina. X 1200.

linfocitos recuerda a nódulos linfoides en tanto que en otras se encuentran dispuestos en columnas que recuerdan a las trabéculas de Remak. En algunas zonas de la corteza se encuentran linfocitos y linfoblastos unidos por prolongaciones citoplásmicas y células epiteliales unidas a linfoblastos también por prolongaciones citoplásmicas. En la zona medular se observan abundantes células epiteliales con grandes prolongaciones citoplásmicas, gran cantidad de pequeñas vacuolas que dan al citoplasma aspecto espumoso, núcleo muy claro, pobre en cromatina y un nucléolo denso. Se encuentran también abundantes células grandes con una gran vacuola que ocupa casi todo el volumen celular, núcleo excéntrico rodeado de citoplasma eosinófilo; en algunas de estas células se presenta un conducto que une dos vacuolas de células vecinas; hay células más pequeñas, sin vacuola cuyo núcleo es semejante al de las células anteriores. Abundantes linfoblastos con prolongaciones citoplásmicas, núcleo con cromatina más densa que en las células epiteliales. En el conjuntivo interlobulillar pueden observarse algunos fibroblastos. (Fig. 4).

Cultivos de 72 días. Observaciones correspondientes a las resiembras $R_3 C_{13}$ y $R_3 C_{11}$. Se pueden observar con toda precisión los límites de los lobulillos, el

tejido conjuntivo interlobulillar ha aumentado. En la periferia del corte persisten algunas pequeñas zonas basófilas en las que se encuentran muy escasos linfocitos. Todo el parénquima de los lobulillos se ha transformado en una masa eosinófila densa en la que se pueden encontrar muy escasos linfocitos y algunos fibroblastos, no se observa ninguna diferencia entre lo que pudiera ser zona medular y zona cortical. Se observa distintamente el tejido conjuntivo interlobulillar en el que se encuentran fibroblastos unidos por sus prolongaciones citoplásmicas.

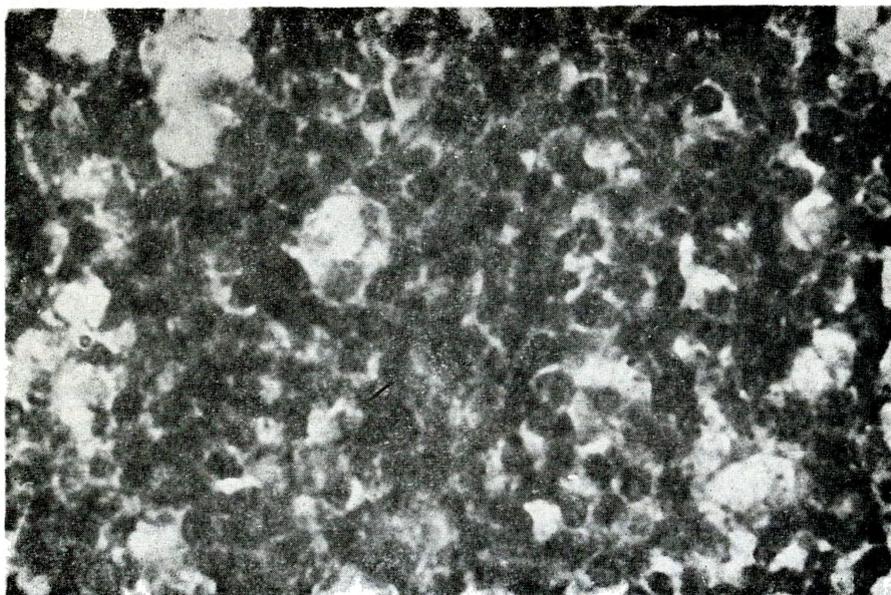


FIG. 4. Cultivo de 16 días de timo de conejo de un día. Células epiteliales con citoplasma vacuolado, linfocitos que forman trabéculas y linfoblastos, todos unidos por prolongaciones citoplásmicas. Técnica Hematoxilina-Eosina. X 1200.

DISCUSIÓN

En los cultivos de 8 días de timo de conejo de un día, aumenta el número de linfoblastos y el tejido conjuntivo interlobulillar. se observan linfocitos con ampollas nucleares que se han interpretado como el medio de transmisión de la información del núcleo al citoplasma (Sebuwufu, 1966. Toro y Olah, 1966a y Carr, 1970). En el timo correspondiente al cultivo C₁₄, se encontraron estructuras formadas por células epiteliales poliédricas, con gran núcleo, agrupadas en forma de glándula; como esta particularidad fue observada sólo en un timo, se cree que no todos los embriones se desarrollaron uniformemente y que permanecieron en este timo algunas células epiteliales de las que descienden con la tercera balsa faríngea. En los cultivos de dieciséis días, se observan en la zona cortical grupos de linfocitos que recuerdan a los nódulos linfoides y que son semejantes a los que se encuentran en los cultivos de 24 días

del timo de 8 días, es probable que estos acúmulos sean sitios en donde la diferenciación de los linfocitos es más activa; se encuentran también linfocitos unidos a linfoblastos por prolongaciones citoplásmicas y en la zona medular de estos mismos cultivos, los linfocitos están unidos formando columnas; parece tratarse de células que no han terminado su maduración; estos aspectos corresponden a diferentes grados de diferenciación *in vitro* de los linfocitos. Por lo que respecta a las células epiteliales reticulares se manifiestan más abundantemente tanto en la zona cortical como en la medular con respecto al testigo y se las puede ver unidas a linfoblastos por grandes prolongaciones citoplásmicas y a otras células epiteliales también por prolongaciones; la presencia de células intermedias en proceso de diferenciación, ha conducido a algunos investigadores a proponer que los linfocitos tímicos podrían ser de origen epitelial (Auerbach, 1951, Ball, 1963), a pesar de que la demostración de esto no es totalmente convincente, no hay duda sin embargo de que existe una relación muy estrecha entre células epiteliales y linfoides y probablemente una continuidad citoplásmica. Moore y Owen (1967a), concluyen que durante el desarrollo embrionario se efectúa una emigración de células, que se originan en las lagunas sanguíneas de la membrana vitelina, hacia el bazo, médula ósea y bolsa de Fabricio y consideran que una emigración semejante ocurre durante el desarrollo del timo, de modo que los linfocitos tímicos también tendrían origen en esas células germinales; estos resultados todavía no pueden tomarse como concluyentes. Las células epiteliales reticulares tímicas adyacentes, se mantienen juntas por interdigitaciones de sus membranas y por desmosomas (Weiss, 1965a; Carr, 1970), por este medio se forma la trama celular del timo.

En la zona medular se observan también células epiteliales con una gran vacuola y núcleo excéntrico (Carr, 1970) consideradas como secretoras, a diferencia de las reticulares epiteliales que tienen una función de sostén y que podrían además, por un proceso de diferenciación, producir células linfoides. Se ha acumulado evidencia morfológica que apoya el punto de vista de que las células epiteliales tímicas tienen una función secretora (Clark, 1966a, Goldstein, 1956); esta suposición se apoya en el hecho de que el timo produce una hormona importante para la maduración del tejido linfoide, es lógico pensar que son las células epiteliales secretoras la fuente más apropiada para la producción de esta hormona. En general, en el timo de conejo de un día y principalmente en los cultivos de ocho y dieciséis días se observan en forma predominante formas celulares inmaduras.

Los diferentes grados de relación encontrados entre linfocitos, linfoblastos y células epiteliales en los cultivos de timo de un día indican que los resultados obtenidos en este trabajo no contradicen la hipótesis de Auerbach sobre el origen de los linfocitos tímicos.

SUMMARY

This paper deals with the cytological description of the rabbit's thymus one day old, and his organ cultures and subcultures *in vitro*, for different periods of time from 8 to 72 days. It has been shown that a media with salts, chick embryo