

119
2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

EFEECTO DE LA FITOHEMAGLUTININA (PHA) EN EL CONSUMO DE OXIGENO
DE TIMOCITOS AISLADOS DE CONEJO.

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O

P R E S E N T A

JOSE JORGE MARTINEZ ESPINOLA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

	página
I) RESUMEN	7
II) INTRODUCCION	8
A) Células del sistema linfoide	8
- Origen y función	8
- Linfocitos de timo	8
B) Características de los componentes de los medios de incubación	9
- Importancia del suero en los cultivos	9
- Fitohemaglutinina	10
C) Metabolismo energético de las células de animales	11
- Glucólisis y Respiración	11
- Inhibidores de la fosforilación oxidativa	13
D) Efecto de la fitohemaglutinina (PHA) en el metabolismo energético de células linfoides	14
E) Objetivos	17
III) MATERIALES Y METODOS	18
A) Obtención de los timocitos	18
B) Condiciones para medir el consumo de oxígeno de las células	18
C) Procesamiento de los datos	20
IV) RESULTADOS Y DISCUSION	22
A) Determinación de la densidad celular	22

B) Influencia del medio TC-199 y del suero fetal de ternera sobre el consumo de oxígeno de las células	25
C) Efecto de diferentes concentraciones de fitohemaglutinina (PHA) en el comportamiento respiratorio de los timocitos	29
V) BIBLIOGRAFIA	38

I) RESUMEN

Se utilizó el parámetro de consumo de oxígeno para evaluar el efecto de la fitohemaglutinina (PHA), en el metabolismo respiratorio de timocitos aislados de conejo. Se hicieron pruebas preliminares con diferentes cantidades de células para determinar cual de éstas se emplearía durante este trabajo. Se decidió trabajar con 500 millones de células, dado que era el número mínimo de linfocitos, en donde se obtuvieron registros adecuados de consumo de oxígeno. Se observó que los componentes del medio que se utilizaron para mantener a las células durante las mediciones, principalmente el suero fetal de ternera, alteran la estimulación de la respiración producida por el desacoplante carbonil-cianuro *m*-clorofenilhidrazona (CCCP).

No se observaron cambios apreciables en el consumo de oxígeno de los timocitos expuestos a 100, 200 y 300 ug/ml de PHA durante 0, 1, 2 y 3 horas de incubación en presencia de esta lectina.

Se discuten algunas posibles causas para tratar de explicar el efecto del suero fetal de ternera sobre la estimulación del consumo de oxígeno producido por el CCCP y el porque la lectina no modifica el comportamiento respiratorio de estas células linfoides *in vitro*.

II) INTRODUCCION

A) CELULAS DEL SISTEMA LINFOIDE.

- Origen y función.

Todos los tipos de células sanguíneas se originan en el estroma de la médula ósea, en donde se encuentra representada cada etapa de maduración, tanto de eritrocitos como de leucocitos.

Se cree que a partir de una célula original, cuya capacidad de proliferación asegura la producción de células del tejido sanguíneo lo que permite que se renueven constantemente, se forman dos clases de células, las llamadas unipotentes y las pluripotentes. Las primeras dan origen a los diferentes tipos de células linfoides después de diferenciarse. Por otra parte, las células pluripotentes originan a las demás células (Bach, 1984; Cline, 1975).

En los mamíferos, el sistema linfoide esta compuesto por un conjunto de células que se localizan en el tejido estromático de distintos órganos, como son, el timo, el bazo y los ganglios linfáticos, en las vías de circulación sanguínea y en la médula ósea.

Las células linfoides interactúan en estos órganos y en los demás tejidos con los antígenos, los cuales han sido transportados a esas áreas por medio de la sangre o la linfa. De esta manera, las células estimuladas inmunológicamente se multiplican y terminan de diferenciarse. Además, la posibilidad de que estas células puedan migrar a distintas regiones del organismo, permite el transporte de la información y la intervención a distancia, lo que asegura el desarrollo y el mantenimiento normal del sistema (Bach, 1984).

En general, las células linfoides se dividen en dos grupos principales de acuerdo a la función que desempeñan durante la estimulación antigénica. La respuesta inmune humoral la efectúan los linfocitos de tipo B, cuya función es la de sintetizar proteínas llamadas anticuerpos que interaccionan específicamente con los antígenos que indujeron su producción, a los que neutraliza y posteriormente elimina. Los linfocitos T son los encargados de la respuesta inmune celular, producen moléculas llamadas linfocinas que controlan estas respuestas e inducen procesos de citotoxicidad. Estas células son dependientes del timo para su desarrollo completo.

- Linfocitos de timo.

El timo es uno de los principales componentes del sistema linfoide en los mamíferos. Es un órgano lobulado situado en la parte superior del mediastino anterior, que descansa sobre el pericárdio a nivel del nacimiento de los grandes vasos. En el

timo existe una gran cantidad de linfocitos T llamados también timocitos, distribuidos en la corteza y en la médula de cada lóbulo.

En la región cortical, los timocitos proliferan abundantemente, no obstante, la frecuencia de división de éstas células, disminuye conforme aumenta la edad del organismo. Se cree que la progenie de las células de la corteza, migra a la médula, en donde maduran y se vuelven inmunocompetentes (Ling y Kay, 1975). Sin embargo, algunos estudios sugieren que las células corticales y los linfocitos medulares representan dos poblaciones cuyo desarrollo es independiente, y dan origen a distintas subpoblaciones de células T (Bach, 1984).

Normalmente en el timo no hay células plasma, es decir células inmunológicamente activas, como tampoco células de memoria, las cuales responden rápidamente a la reaparición de algún antígeno (Cline, 1975; Bach, 1984).

B) CARACTERISTICAS DE LOS COMPONENTES DE LOS MEDIOS DE INCUBACION.

El medio de incubación debe de proporcionar a las células las características físicas y nutricionales, que satisfagan sus requerimientos básicos, para que éstas expresen sus capacidades funcionales como entidades individuales y como partes integrantes de una población (Waymouth, 1972). Por lo tanto, la supervivencia y la funcionalidad de las células *in vitro*, pueden ser modificadas por alteraciones en los factores ambientales del medio donde se encuentran, como son el pH, la temperatura, las concentraciones de CO₂ y O₂, la concentración de suero, la densidad celular, etc. (Ling y Kay, 1975).

Las células linfoides se utilizan frecuentemente para estudiar diferentes aspectos relacionados con su fisiología, ya que todos los fenómenos que presentan estas células al ser estimuladas *in vitro* parecen estar estrechamente relacionados con aquellos que ocurren durante la respuesta inmune *in vivo* (Lerner y Dixon, 1973).

- Importancia del suero en los cultivos.

El medio y los métodos utilizados para mantener *in vitro* a los linfocitos no difieren mucho de los que se emplean para otras células. Se han usado muchos tipos de soluciones salinas balanceadas y medios sintéticos completos convencionales para cultivar a estas células. Sin embargo, cualquier solución de cultivo que se utilice, siempre debe estar complementada con 5 a 20% de suero, puesto que se ha visto que sin este componente las células no se mantienen por mucho tiempo y no pueden proliferar (Ling y Kay, 1975).

Entre los efectos que produce el suero en algunas células

mantenidas en cultivo, principalmente en fibroblastos, se encuentran la estimulación de la glucólisis y de la síntesis de ADN, ARN, proteínas y lípidos, la inducción de la división celular en células en estado estacionario y el aumento en la permeabilidad de la membrana a nucleótidos, aminoácidos, fósforo inorgánico (Pi) y a ciertos iones (Temin, y colaboradores, 1972).

Algunos de los principales componentes que intervienen en la acción del suero sobre los linfocitos son:

- Las macromoléculas, principalmente de tipo proteico, que promueven el crecimiento celular. Sin embargo, muchos de estos factores pierden su efecto al inactivar al suero por calor.

- Las moléculas pequeñas, tales como nucleósidos, vitaminas, hormonas y coenzimas, que proporcionan nutrientes esenciales y factores de crecimiento no presentes en el medio.

- Factores del tipo de los anticuerpos, que neutralizan ó se combinan con las lectinas.

- La presencia de anticuerpos en el suero que reconocen sitios antigénicos en la superficie de los linfocitos, o de sustancias que son reconocidas por las células como antígenos. Esto puede ser estimulatorio o citotóxico.

- Presencia y concentración de ciertos iones, como el potasio y el calcio, que modifican algunas reacciones metabólicas, como por ejemplo, la síntesis de ADN (Ling y Kay, 1975; Ponce, 1979).

Sin embargo, la capacidad de respuesta de los linfocitos al suero está influenciada por el origen de éste, ya sea autólogo, homólogo o heterólogo, por la historia inmunológica de las células y por las condiciones del medio (Temin, y cols., 1972).

Aunque se han realizado una gran cantidad de estudios para establecer el papel del suero en la proliferación celular, la naturaleza de la mayoría de los efectos que produce sobre las células *in vitro* y la de los factores que ejercen éstos, es poco conocida.

- Fitoheماغlutinina.

Se han empleado extractos de vegetales que tienen propiedades mitogénicas, para estimular la división de los linfocitos en cultivo, debido a la presencia de ciertas proteínas llamadas lectinas. Las lectinas son mucoproteínas de alto peso molecular, que poseen la capacidad de unirse a los residuos azucarados de las proteínas de la membrana plasmática (Sharon, 1977).

La Fitoheماغlutinina (PHA), se extrae del frijol *Phaseolus vulgaris* y es el agente antigénico más utilizado en los estudios de la proliferación de células linfoides *in vitro*, por su alta efectividad y su rápida respuesta con respecto a otros antígenos inespecíficos, ya que puede activar múltiples clones de linfocitos, principalmente aquellos derivados del timo (Ling y Kay, 1975).

No se conoce exactamente el mecanismo mediante el cual la PHA interacciona con el linfocito, sin embargo, algunos estudios han reportado que se unen a proteínas a nivel de la membrana y activan procesos de síntesis de mensajeros intracelulares, principalmente monofosfato de guanosina cíclico (GMPc) y facilitan el transporte de iones calcio al interior de la célula (Coffey, y cols., 1977).

Entre los efectos iniciales que produce la lectina en los linfocitos, están el aumento en el flujo de ciertos iones, cambios en el potencial de la membrana, transporte de moléculas, como aminoácidos y azúcares, al interior de la célula, que posteriormente se traducirán en una respuesta metabólica que desemboca en la división celular (Ling y Kay, 1975).

C) METABOLISMO ENERGETICO DE LAS CELULAS DE ANIMALES.

Una de las principales características de los seres vivos, es la capacidad de captar y transformar la energía del entorno, lo que les permite realizar las funciones que su misma existencia exige.

La energía que utilizan las células de organismos heterótrofos, se encuentra disponible en forma química almacenada en enlaces de alta energía, en moléculas de trifosfato de adenosina (ATP), la cual se obtiene a partir de reacciones de óxido-reducción resultantes de la transformación metabólica de ciertos compuestos orgánicos que toman del exterior, como la glucosa, que contienen un potencial energético muy elevado debido a su alto grado de orden estructural (Lehninger, 1981; Hinkle y McCarty, 1978). La energía del ATP es utilizada por las células en la realización de varios procesos, debido a que la hidrólisis de este nucleótido está acoplada a reacciones que requieren de un aporte energético indispensable para que se lleven a cabo, como la síntesis de macromoléculas (Alberts, y cols., 1983).

- Glucólisis y Respiración.

En las células de animales, la síntesis de ATP se lleva a cabo por dos vías metabólicas principales: la Glucólisis y la Respiración. La glucólisis es la ruta que degrada anaeróbicamente a la glucosa, y que culmina con la formación de dos moléculas de ácido láctico y dos de ATP, mientras que la respiración es la oxidación de moléculas orgánicas, como glucosa, aminoácidos y ácidos grasos, por el oxígeno molecular, que tiene como productos finales CO_2 , H_2O y ATP (36 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa oxidada). (figura 1).

La velocidad de síntesis de ATP varía, ya que depende de la actividad celular. Cuando esta actividad es muy intensa, los requerimientos de energía se incrementan, lo que provoca un aumento en el metabolismo energético (Peña, y cols., 1981). Estos requerimientos cambian según la etapa del ciclo de generación

RESPIRACION

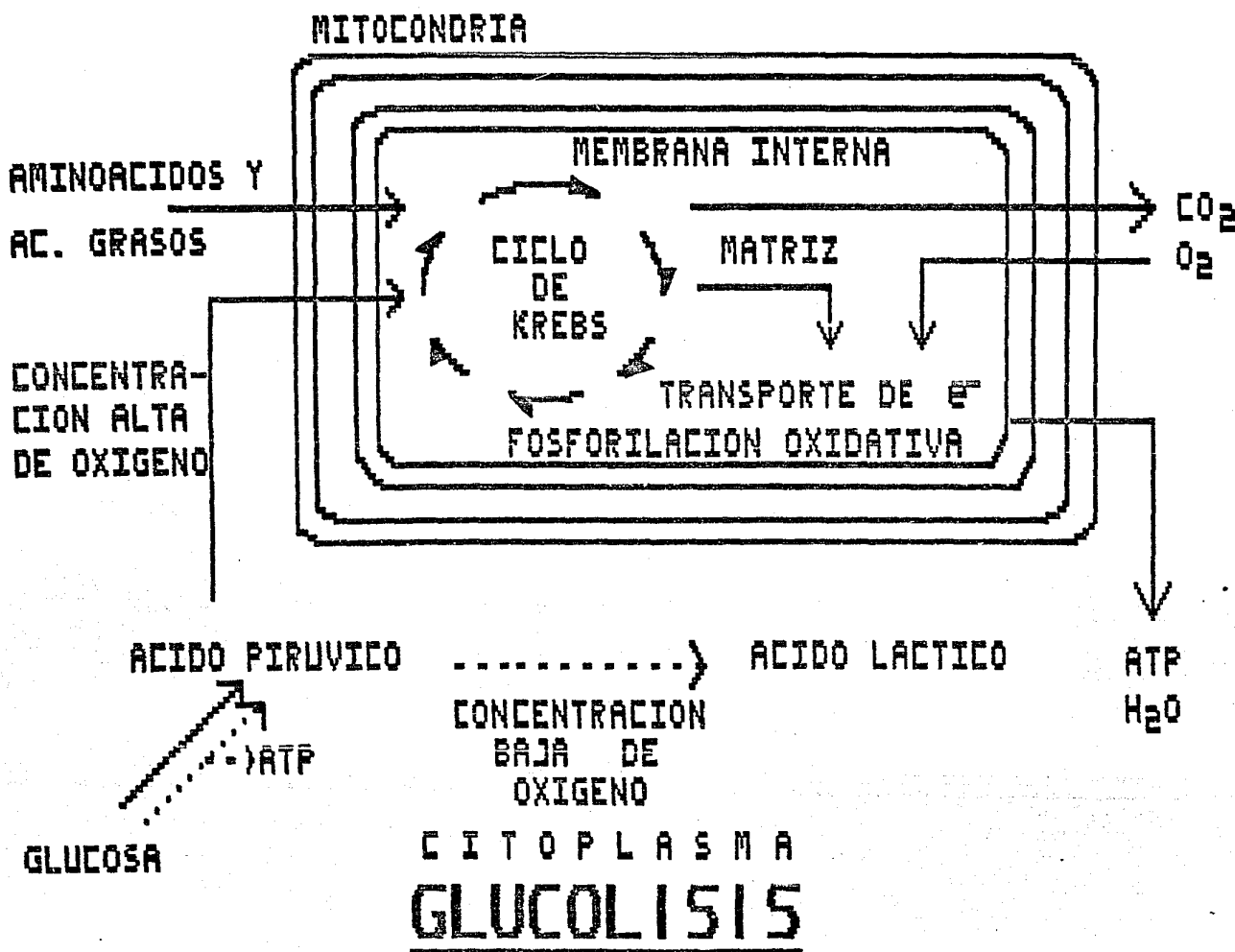


Figura 1. Esquema general de las rutas de la degradación de moléculas orgánicas para la obtención de ATP en células de animales (Con base en Lehninger, 1981 y en Alberts, y cols., 1983).

celular, el estado de diferenciación de las células, las condiciones físicas del medio, como la temperatura, la estimulación metabólica producida por hormonas u otros agentes externos, etc. Particularmente en la ruta respiratoria, cuando aumenta el consumo de oxígeno, se incrementa proporcionalmente la actividad fosforilante de las mitocondrias, de manera que, por cada tres moléculas de ATP sintetizadas, generalmente se consume la mitad de una molécula de oxígeno (Lehninger, 1981; Stryer, 1981; Harold, 1986; Becker, 1986).

La posibilidad de que la degradación de la glucosa desemboque en la formación de lactato ó se oxide completamente, depende de la disponibilidad de oxígeno en el medio y del estado de proliferación de las células. Aunque las células de animales obtienen la mayor parte de su energía de la respiración, la glucólisis actúa como ruta proveedora de ATP durante periodos cortos en los que no se dispone de oxígeno, como por ejemplo, cuando el músculo es sometido a un período de actividad máxima, las células de este tejido son básicamente glucolíticas, debido a una disminución en la concentración de oxígeno en el músculo (Lehninger, 1981; Becker, 1986) (figura 1).

Se ha observado que las células en proliferación, tanto normales como transformadas, presentan una actividad glucolítica muy alta. Sin embargo, se ha visto que estas células consumen oxígeno normalmente y mantienen los niveles de enzimas mitocondriales adecuados para oxidar totalmente al piruvato (McKeehan, 1982).

- Inhibidores de la fosforilación oxidativa.

Una de las principales herramientas para estudiar la fisiología de las mitocondrias, especialmente el sistema fosforilante oxidativo, es utilizar agentes inhibidores específicos (Lehninger, 1981). De éstos, los mas empleados son los ionóforos, debido a su capacidad de transportar iones a través de la membrana, lo que ha permitido conocer muchos aspectos relacionados con los mecanismos quimiosmóticos que intervienen en la síntesis del ATP (Hinkle y McCarty, 1978). Dentro de este grupo, existen un número variado de sustancias, principalmente ácidos débiles, cuya función es la de desacoplar el transporte de electrones de la fosforilación oxidativa, es decir, no permiten que las reacciones que producen energía estén acopladas con las que la conservan, de tal manera que ésta no se aprovecha y se transforma en calor. Su característica es que incrementan el consumo de oxígeno de mitocondrias intactas en ausencia de ADP in vitro (Lehninger, 1981; Terada, 1981; Peña y cols., 1981; Hinkle y McCarty, 1978).

La mayor parte de los agentes desacoplantes son sustancias liposolubles que contienen un grupo ácido y generalmente un anillo aromático. Particularmente, el desacoplante carbonilcianuro *m*-clorofenilhidrazona (CCCP), presenta en un extremo un

grupo cloro-fenil que le confiere a la molécula suficiente hidrofobicidad para unirse a la membrana interna mitocondrial y permanecer en ella durante su acción, y un grupo ácido-ionizable el cual es indispensable para llevar a cabo su actividad protonofórica (Terada, 1981; Lehninger, 1981) (figura 2(a)).

El CCCP funciona como un intercambiador eficiente de protones, al equilibrar el gradiente de éstos a ambos lados de la membrana interna mitocondrial. En la figura 2(b) se muestra el posible mecanismo de acción de los desacoplantes del tipo del CCCP, que tienen la capacidad de unir y desligar un protón y de poder difundir a través de la membrana interna mitocondrial en ambas conformaciones, tanto anionica como neutra (Terada, 1981; Hinkle y McCarty, 1978).

D) EFECTO DE LA FITOHEMAGLUTININA (PHA) EN EL METABOLISMO ENERGETICO DE CELULAS LINFOIDES.

Se han observado grandes cambios en el metabolismo de las células linfoides durante la estimulación antigénica *in vitro*, que culminan con la división celular y desencadenan otros procesos que intervienen en la respuesta inmune montada contra esos antígenos.

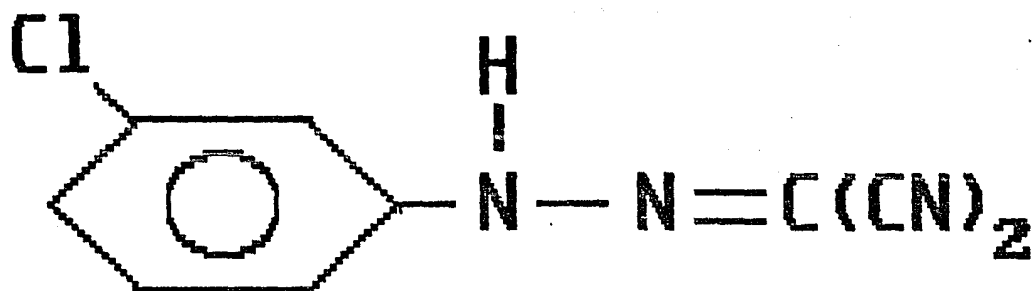
Una de las principales alteraciones metabólicas que experimentan estas células es en el metabolismo de carbohidratos, por lo que ha sido tema de particular interés, ya que los procesos que se activan durante la estimulación de los linfocitos, como son la síntesis de ácidos nucleicos y el aumento en el transporte de iones y de algunas sustancias a través de la membrana, conducen a un incremento en los requerimientos de energía por parte de estas células.

Se han empleado varios antígenos para estudiar este fenómeno con diferentes tipos de células linfoides mantenidas en cultivo. El modelo de experimentación más utilizado ha sido el usar antígenos inespecíficos, principalmente la lectina fitohemaglutinina (PHA).

Uno de los primeros trabajos en donde se observó este fenómeno fué realizado en 1967 por Pachman, en linfocitos de sangre periférica de caballo. Este autor encontró un incremento en el consumo de oxígeno, en la utilización de glucosa y en la producción de ácido láctico al incubar estas células en presencia de la PHA durante 24, 48 y 72 horas; por lo que establece que la transformación blastoide se alcanza gracias al aporte energético proveniente tanto de la glucólisis como de la respiración.

Hedeskov en 1968, trabaja con linfocitos de sangre periférica de humano y observa que el consumo de glucosa y producción de lactato se duplican al incubar por 4 horas a estas células con la lectina, mientras que la producción de CO₂ proveniente de la descarboxilación del piruvato y del ciclo de Krebs no se

(a)



P. M. : 204.62

(b)

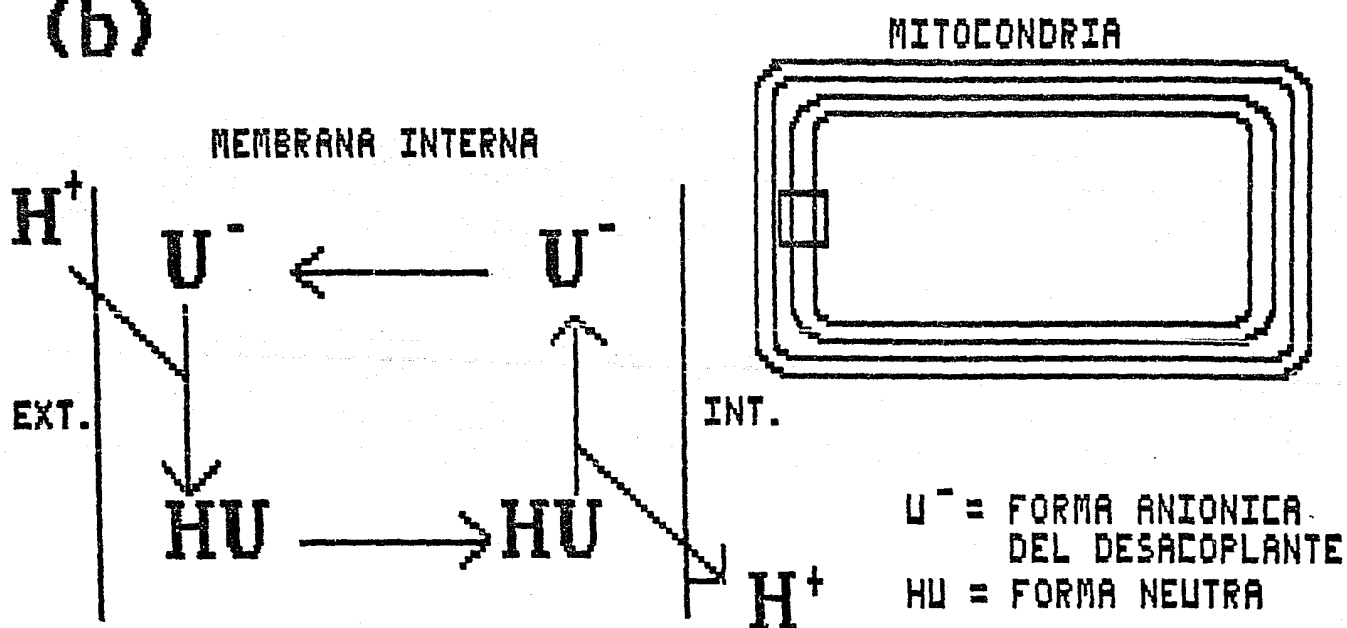


Figura 2. (a) Estructura de la molécula del desacoplante CCCP y (b) posible mecanismo de acción (Según Terada, 1981).

modifica.

Polgar y colaboradores (1968) no encuentran diferencias significativas en el consumo de oxígeno de linfocitos de sangre periférica de humano expuestos a este antígeno por 24, 48 y 96 horas. Al incubar a las células con el desacoplante de la respiración 2,4 dinitrofenol, la síntesis de ARN y de proteínas disminuye de 30 a un 40%, mientras que en la síntesis de ADN casi no tiene efecto. Al inhibir la glucólisis con un compuesto análogo de la glucosa, desoxiglucosa (DOG), estos tres parámetros se reducen en un 90%. Los autores concluyen que la activación metabólica después de la estimulación por PHA depende principalmente de la glucólisis y no de la respiración.

Roos y Loos (1970), utilizan también linfocitos de humano y encuentran que uno de los primeros efectos de la lectina es el de disminuir los niveles de ATP+ADP e incrementar la concentración de lactato. Después de 2 horas de exposición, existe un incremento en los niveles de ATP+ADP, de algunos intermediarios de la ruta glucolítica, como la glucosa 1, 6 difosfato y el 2, 3 difosfoglicerato, y en la incorporación de fosforo inorgánico (Pi). Estos investigadores observan que la PHA influye todavía sobre algunos de estos parámetros metabólicos, después de bloquear la respiración o la glucólisis con cianuro y DOG respectivamente.

Estos mismos autores en 1973 (a), observan que en las primeras etapas de estimulación antigénica, la energía proveniente de la glucólisis es suficiente para que la activación metabólica producida por la PHA en los linfocitos se lleve a cabo, al inhibir la fosforilación oxidativa con tetraclorotrifluorobenzimidazol (TTFB) y oligomicina. Sin embargo, al incubar estas células con la lectina por 4, 24 y 72 horas, encuentran que la incorporación de Pi a nucleótidos ácido-solubles esta estrechamente relacionada con la actividad mitocondrial (1973b), ya que los valores de estimulación de la respiración producida por PHA, que van del 122 al 175% a las 24 y 72 horas respectivamente, coincide con un incremento considerable en la utilización de Pi por parte de estas células.

Roos y Loos (1973b), observaron que al incubar a las células en presencia de la PHA con los inhibidores de la fosforilación oxidativa TTFB y oligomicina durante 72 horas, había una disminución en la incorporación de timidina tritiada del 50 y del 85% respectivamente, y del 95% al estar presentes estos dos agentes, mientras que al bloquear al glucólisis con DOG, no hay incorporación del precursor marcado. Aunque el 70% de la glucosa es convertida en ácido láctico y el 30% restante sea completamente oxidado, el 85% del ATP formado durante la activación metabólica de estas células, proviene de la respiración. Estos autores concluyen que esta energía es indispensable para que se lleve a cabo la división celular, mientras que el ATP formado por la glucólisis es necesario para que se lleven a cabo procesos meta-

bólicos, tales como la síntesis de ADN, ARN y proteínas.

En trabajos más recientes (Culvenor y Weidemann, 1976), se ha observado que durante la estimulación antigénica en timocitos de rata producida por diferentes lectinas, el metabolismo respiratorio, medido como consumo de oxígeno, casi no se modifica, mientras que varios parámetros de la vía glucolítica, tales como consumo de glucosa, producción de lactato y actividad de algunas enzimas de la ruta, aumentan considerablemente, por lo que se ha establecido que esta es una característica propia de las células linfoides en proliferación (Tollefsbol y Cohen, 1985).

E) OBJETIVOS.

Con base en estos antecedentes, se observa que no está totalmente definido si el metabolismo energético oxidativo de las células linfoides se modifica durante la estimulación antigénica producida por la PHA. Por tal motivo, se decidió realizar el presente trabajo para establecer las condiciones de medición del consumo de oxígeno de los linfocitos de timo aislados de conejo, al utilizar los componentes del medio de incubación que se emplean para cultivar a estas células en el laboratorio y evaluar posteriormente el comportamiento respiratorio de éstas en presencia de diferentes concentraciones de la lectina a distintos tiempos de incubación.

III) MATERIALES Y METODOS.

A) OBTENCION DE LOS TIMOCITOS.

Se utilizaron conejos jóvenes (*Oryctolagus cuniculus*) machos de 2 Kg aproximadamente, los cuales se sacrificaron por desnucamiento. Se extrajo el timo, sin cortar vasos sanguíneos, y se colocó sobre una laminilla de acero inoxidable en una caja de Petri con 4 ml de medio L-15 (Gibco) a 37° C. Con una espátula se maceró el tejido, para dispersar a los timocitos. Conforme se hacía la dispersión, se recogían las células con una jeringa con aguja de ráquia y se agregaban otros 2 ml de medio para continuar la dispersión; este procedimiento se repetía nuevamente para recuperar la mayor cantidad de células posibles.

La suspensión de células se repartió en 3 ó 4 tubos de centrifuga de 15 ml y se centrifugaron a 1,000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y los botones se resuspendieron con 5 ml de una solución lisadora de eritrocitos, preparada con 4.5 g de cloruro de amonio (Mallinckrodt) y 1 g de Tris-hidroximetilaminometano (THAM) (Sigma), aforada a 500 ml con agua destilada y ajustada a pH 7.3 con HCl concentrado, y se incubaron durante 5 minutos a 37° C.

Se centrifugaron nuevamente 10 minutos a 1,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Cada botón se resuspendió con 2 ó 3 ml de medio L-15 a 37° C y se reunió el contenido de cada tubo en uno sólo. Posteriormente, se tomó una alícuota para contar a las células en la cámara de Neubauer ó hemocitómetro y para determinar la viabilidad se hizo una prueba de exclusión con el colorante azul tripan (Sigma) 0.5% en solución salina al 0.85% (Phillips, 1973). La viabilidad siempre fue mayor al 85 %. Posterior a las pruebas en el oxímetro, se hacía otra cuenta de células de una muestra, para corroborar la cuenta inicial y el número aproximado de timocitos que se utilizaron en cada medición.

B) CONDICIONES PARA MEDIR EL CONSUMO DE OXIGENO DE LAS CELULAS.

1) Las mediciones de consumo de oxígeno se obtuvieron por polarografía con un electrodo tipo Clark de registro continuo, en una cubeta termoequilibrada a 37° C con agitación magnética continua (Yellow Springs Instruments, U.S.A.). Este electrodo, que contiene un ánodo y un cátodo polarizado, registra la corriente que fluye entre éstos conforme el oxígeno se reduce, la cual es proporcional al contenido de oxígeno molecular de la solución que se mide. De esta manera, el aparato puede responder a diferentes tensiones de oxígeno a través del tiempo, que experimenta una solución en agitación que contiene células que consumen oxígeno (Clark, y cols., 1953).

Los registros se obtuvieron de un graficador conectado al oxímetro. La velocidad de graficación utilizada para obtener los trazos fue de una pulgada por cada 5 minutos.

2) Cuando se hicieron las pruebas para determinar la densidad celular de trabajo y para observar la influencia de los componentes del medio de incubación sobre el consumo de oxígeno, antes de cada registro se agregaron por separado a la cubeta del oxímetro, el medio TC-199 (Difco) o una solución salina balanceada (120mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1mM de MgSO₄, 1 mM de Na₂PO₄, 5.5 mM de glucosa y 1mM de CaCl₂ amortiguada con 20 mM de HEPES a pH 7.4) (Lazzarini y cols., 1985), 20% de suero fetal de ternera (Difco) previamente inactivado a 60° C durante 30 minutos, y por último la cantidad correspondiente de células, lo que dió un volumen total de 3 ml. Mientras se obtenían los registros, los componentes del medio y las células se mantuvieron en un baño de temperatura a 37° C. El tiempo de cada medición fue de 5 a 10 minutos.

3) Cuando se incubaron las células a diferentes tiempos (0, 1, 2 y 3 horas), se colocaron aproximadamente 500 millones de células en frascos ampula de 20 ml, que contenían medio de cultivo completo con 80% de TC-199, 20% de suero fetal de ternera inactivado, 0.5% de una solución de glutamina (Difco), 100 UI de TC-penicilina y 100 ug de estreptomina (Difco) junto con 300 UI de heparina (Abbott), en un volumen final de 3 ml. Las diferentes concentraciones de fitohemaglutinina " P " (Difco), se agregaron en el tiempo cero y se determinaron al tomar como base la empleada por Roos y Loos (1973b), de 100 ug/ml y la proporción utilizada por Culvenor y Weidemann (1978) de 600 ug/10⁶ células. Los frascos se mantuvieron en un baño de temperatura constante a 37° C.

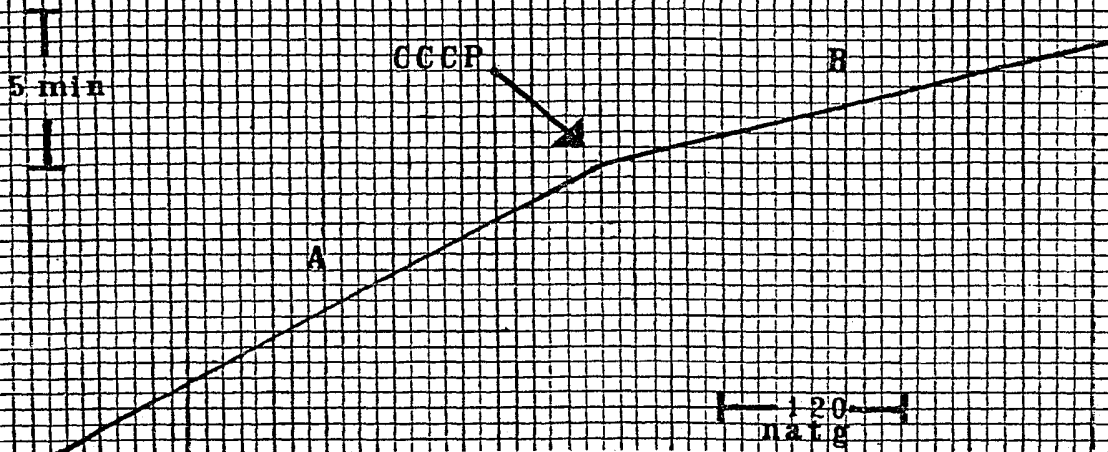
Después de cada tiempo de incubación y para obtener mejores registros de respiración, se reemplazó el medio de incubación por medio fresco completo, ya que se había observado en pruebas preliminares, que los trazos de consumo de oxígeno obtenidos después de mantener a los timocitos durante un periodo de incubación en el mismo medio eran muy cortos, lo que no permitía observar el efecto del desacoplante CCCP sobre la respiración. De esta manera, el contenido de cada frasco (lote), se centrifugó durante 5 minutos a 1,000 rpm, se desechó el sobrenadante y cada botón se resuspendió con medio fresco a 37° C hasta 3 ml.

4) Como control respiratorio, se utilizó el desacoplante carbonil-cianuro m-clorofenilhidrazona (CCCP) (Sigma), a una concentración de 8 uM, diluido en dimetilformamida (Baker). Esta sustancia se agregó directamente al medio, con una microjeringa de 10 ul.

C) PROCESAMIENTO DE LOS DATOS.

Los valores de consumo de oxígeno obtenidos, se calcularon, al sumar el número de cuadros que el trazo recorría de izquierda a derecha, en una escala de concentración relativa de oxígeno del 100 a 0, y se multiplicaron por 12, ya que cada cuadro equivale a 12 nanómetros gramo de oxígeno (natg). Posteriormente, se dividió este resultado entre los minutos transcurridos durante ese registro. De esta manera se obtenían los datos expresados como natg/min (figura 3).

Para calcular el coeficiente de correlación y las ecuaciones de los datos que se ajustaron a una recta, se utilizó el criterio de los mínimos cuadrados o coeficiente de regresión lineal (Bajpai y cols., 1981).



$$\text{Consumo de oxígeno} = \frac{\# \text{ de cuadros} \times 12}{\text{minutos transcurridos}}$$

A) Consumo de oxígeno s/CCCP

B) Consumo de oxígeno c/CCCP

$$\frac{32 \times 12}{9.5} = 40.4 \text{ natg/min}$$

$$\frac{29 \times 12}{4} = 87 \text{ natg/min}$$

Figura 3. Procedimiento para calcular los datos de consumo de oxígeno obtenidos en unidades de nanoátomos gramo de oxígeno por minuto (natg/min)

IV) RESULTADOS Y DISCUSION.

A) DETERMINACION DE LA DENSIDAD CELULAR.

Se midió el consumo de oxígeno de diferentes cantidades de células, para determinar el número de timocitos que se emplearía durante los experimentos.

Primero se utilizaron 135 millones de células y se obtuvo un medición de 5.4 natg/min. Por lo tanto, se decidió aumentar la densidad de células y se obtuvieron los siguientes resultados:

Número de células ($\times 10^6$)	Consumo de O_2 (natg/min)
0.5	19.2
1.0	32.4
1.5	42.0
2.0	52.2

La correlación que se obtuvo entre el número de células y el consumo de oxígeno fue de $r=0.99$ (gráfica 1), lo que quiere decir que existe una relación directa entre estos dos parámetros. No se llegó a observar un efecto de inhibición de la respiración de los timocitos por sobrepoblación, en las densidades ensayadas, como el observado por Hedekov y Esmann (1966), al trabajar con linfocitos de sangre periférica de humano.

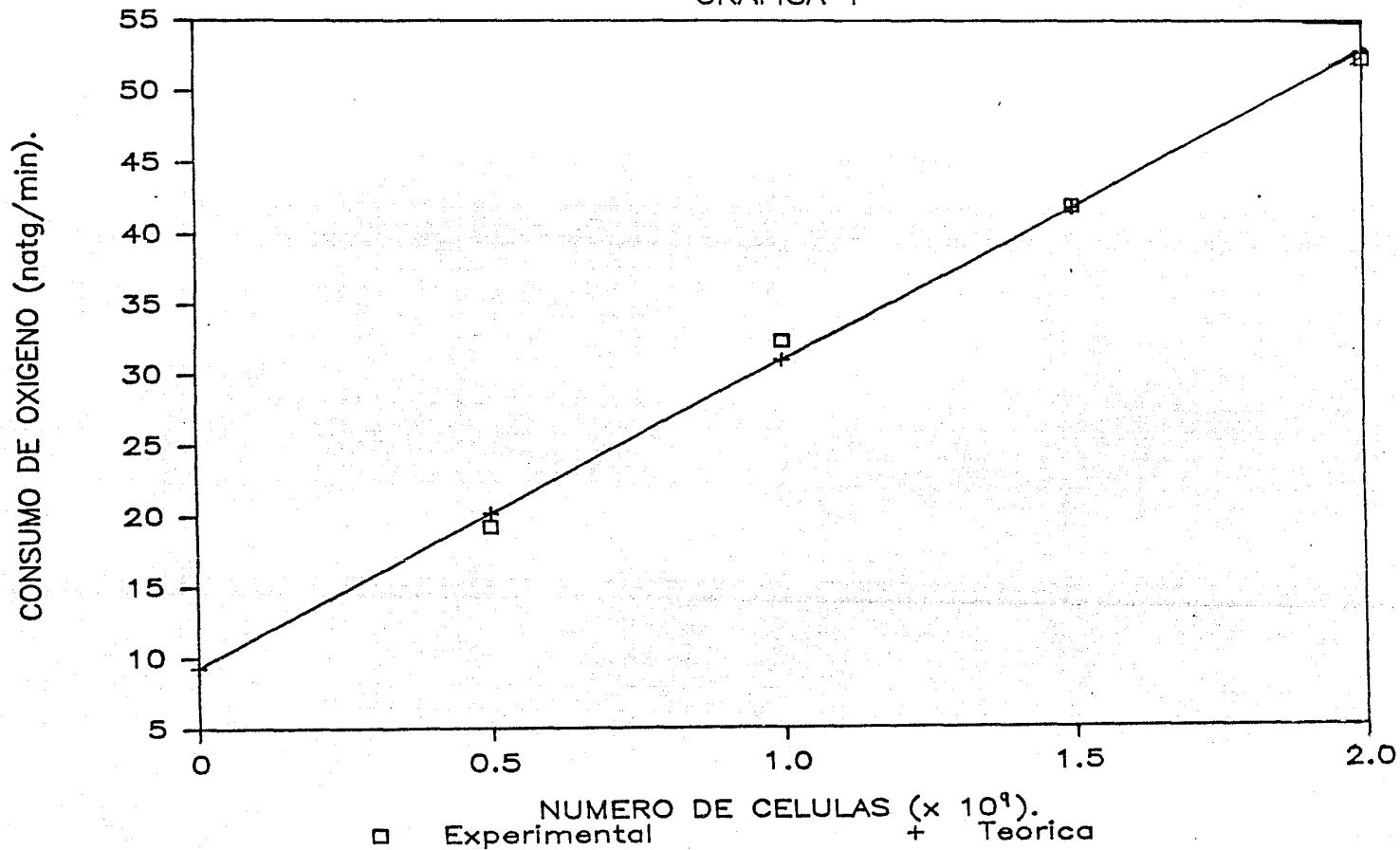
En este trabajo se determinó utilizar la densidad de 500 millones de células para los siguientes experimentos, ya que era la densidad más baja en donde se obtenían registros adecuados de consumo de oxígeno, al tomar como base la sensibilidad del oxímetro y para realizar más pruebas en cada experimento, puesto que la recuperación de linfocitos de cada timo no era muy elevada y variaba mucho de un organismo a otro (de 5 a 9×10^7 células).

Es importante mencionar de que se obtuvieron registros de respiración muy variables con la densidad de 500 millones de células (ver más adelante). Los valores fueron de 19, 40 y hasta 95 natg/min, por consiguiente, también se observaron diferentes resultados en el porcentaje de estimulación del consumo de oxígeno producido por el desacoplante CCCP, que varió de 30, 70 y hasta más del 150%. Probablemente, estas diferencias en el consumo de oxígeno se deban a las características propias de cada individuo, ya que los experimentos se realizaron con células de organismos distintos. Por tal motivo, cada bloque de mediciones, en donde se compararon los datos obtenidos, se realizó con las células de un mismo individuo.

Gráfica 1. Prueba de densidades. Relación entre el número de células y consumo de oxígeno. Ecuación de la recta: $Y = (21.72) X + 9.3.$

PRUEBA DE DENSIDADES

GRAFICA 1



B) INFLUENCIA DEL MEDIO TC-199 Y DEL SUERO FETAL DE TERNERA SOBRE EL CONSUMO DE OXIGENO DE LAS CELULAS.

Se midió el consumo de oxígeno de los timocitos en la solución salina balanceada y en el medio TC-199, en ausencia y en presencia de un complemento del 20% de suero fetal de ternera en ambos medios, para observar si el patrón respiratorio de las células se alteraba al modificar las características del medio de incubación.

Los resultados se muestran en la tabla I. No se encontraron diferencias en la respiración de los timocitos, al comparar los datos obtenidos en los dos medios, tanto en ausencia como en presencia de suero y desacoplante. Sin embargo, los valores que se obtuvieron en la solución salina sin suero, tienden a ser más bajos que los observados en el medio TC-199 (gráfica 2).

El consumo de oxígeno no se modificó al complementar con 20% de suero a ambos medios, en ausencia del CCCP. Sin embargo, al estimular la respiración con este agente, los registros fueron más altos en presencia de suero que en ausencia de éste, tanto en la solución salina como en el medio TC-199 (gráfica 2). Al mantener a los timocitos en la solución salina, el desacoplante incrementó en un 76% su consumo de oxígeno en ausencia de suero y en un 155% en presencia de este complemento. En el caso de las células mantenidas en el medio TC-199, el aumento en el consumo de oxígeno producido por el CCCP fue aproximadamente tres veces más alto en presencia que en ausencia de suero, puesto que los valores fueron de 168 y 60% respectivamente (gráfica 2).

Por lo tanto, los principales componentes del medio de incubación, TC-199 y el suero fetal de ternera, no modifican el consumo de oxígeno de los linfocitos. Sin embargo, la capacidad de estimulación de la respiración producida por el desacoplante se ve modificada en presencia de suero, sobre todo en las células mantenidas en el medio TC-199, cuyo grado de estimulación fue mayor que el registrado en la solución salina.

El medio TC-199 juega un papel fundamental, puesto que contiene un conjunto de factores nutricionales básicos muy importantes para las células *in vitro*. Sin embargo, los componentes del suero son indispensables para mantener a los linfocitos en un estado metabólico adecuado, necesario para conservar muchas funciones relacionadas con su actividad celular *in vivo* (Ling y Kay, 1975; Benitez, 1970; Bonilla, 1970). Probablemente, algunos de estos componentes fueron determinantes en la respuesta de los timocitos al desacoplante, aunque se desconoce que tipo de factores están involucrados directamente en esta respuesta y cuales son los efectos que producen en las células.

Se postula, que factores del tipo de las hormonas, principalmente de naturaleza esteroide, son los componentes más importantes del suero que intervienen en la activación metabólica de los

Tabla I. Influencia del medio TC-199 y del suero fetal de ternera sobre el consumo de oxígeno de los linfocitos. Unidades: natg de oxígeno/min. %: Porcentaje de incremento de la respiración de las células producido por el desacoplante CCCP (8 μ M). Control: Consumo de oxígeno sin CCCP.

MEDIO		s/CCCP			c/CCCP			
		Datos	\bar{X}	\pm EE	Datos	\bar{X}	\pm EE	
T C	s/suero	85.3	89.2	3.4	124.8	142.9	10.1	
		86.3			160.0			60%
		96.0			144.0			
199	c/suero	80.0	86.7	4.8	216.0	232.0	12.2	
		84.0			224.0			168%
		96.0			256.0			
solución	s/suero	65.0	71.3	12.8	100.0	125.6	14.4	
		52.8			126.8			76%
		96.0			150.0			
salina	c/suero	72.0	81.8	5.9	186.0	208.7	19.7	
		81.0			192.0			155%
		92.5			248.0			

Gráfica 2. Influencia del medio TC-199 y el suero fetal de ternera sobre el consumo de oxígeno de los linfocitos. %: Porcentaje de incremento de la respiración estimulada por el desacoplante CCCP (8 μ M). Control: Consumo de oxígeno sin CCCP.

A = Medio TC-199 s/suero

B = Medio TC-199 c/suero

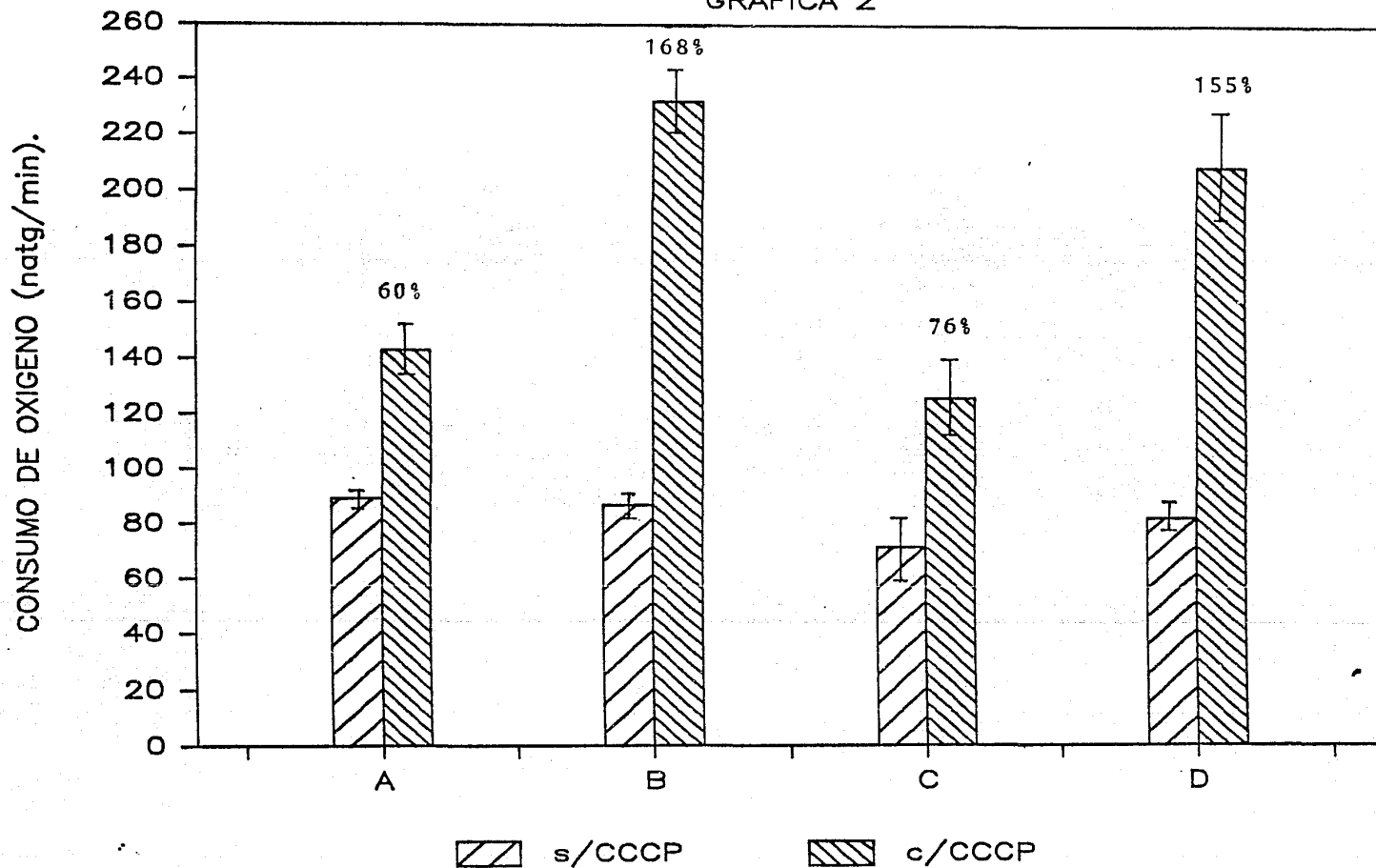
C = Solución salina
s/suero

D = Solución salina
c/suero

(Promedios de un experimento por triplicado; se muestra el error estándar).

INFLUENCIA DEL MEDIO

GRAFICA 2



linfocitos, puesto que la mayoría de los compuestos de origen proteico se desnaturalizan al inactivar el suero (Benitez, 1970; Bonilla, 1970). Probablemente, estos factores interactúan directamente sobre las mitocondrias, lo que podría producir una alteración en su actividad y por lo tanto modificar su respuesta al desacoplante CCCP. Recientemente, Martínez, F. (1987, comunicación personal), ha encontrado que la hormona esteroide progesterona disminuye la actividad ATPsintetasa de vesículas submitocondriales de placenta de humano y sugiere que este esteroide modifica las características de la membrana interna mitocondrial, lo que produciría una alteración en la actividad de la enzima y en el transporte de protones al interior de la vesícula.

Algunos autores (Ling y Kay, 1975; Benítez, 1970; Bonilla, 1970), proponen que la presencia de ciertas sustancias, particularmente al utilizar sueros heterólogos, activan mecanismos de tipo inmunológico en estas células debido a que son reconocidas como antígenos. Se ha visto que durante la activación antigénica en células linfoides, se produce un incremento inicial en los niveles intracelulares de sodio y calcio, ya que el transporte de estos iones al interior de las células, se ve facilitado por este proceso (Felber y Brand, 1983; Deutsch, y cols., 1981; Freedman, y cols., 1981). Lo anterior puede estar relacionado con el incremento de la respiración producido por el CCCP observado en los timocitos mantenidos en medio complementado con suero, ya que se ha observado que la presencia y concentración de algunos iones aumentan la capacidad de estimulación del consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas, en presencia de agentes desacoplates (Terada, 1981).

Estos resultados muestran que la composición del medio de incubación es importante para mantener a las células, ya que desde el inicio de la incubación éstas pueden responder de diferente forma a un estímulo externo, en este caso, a la presencia del desacoplante CCCP, y esta respuesta depende tanto de las características de las células como las del medio donde se encuentran, pues ambas partes guardan una estrecha relación entre sí.

C) EFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE FITOHEMAGLUTININA (PHA) EN EL COMPORTAMIENTO RESPIRATORIO DE LOS TIMOCITOS.

Se evaluó el efecto de la fitohemaglutinina (PHA) sobre el consumo de oxígeno de estas células en las primeras horas de exposición y no después de incubaciones prolongadas, pues las condiciones utilizadas en este trabajo para medir respiración no permitieron hacer esas mediciones, puesto que en pruebas preliminares se incubaron a los timocitos por 48 horas y en la mayoría de los cultivos no se registró consumo de oxígeno debido a que la viabilidad de éstas células había sido severamente afectada (datos no mostrados).

Los datos obtenidos se muestran en la tabla II. A las cero horas, se observa que no hay diferencias apreciables entre los valores de consumo de oxígeno obtenidos en los lotes con PHA con el registro del lote control (s/PHA), tanto en ausencia como en presencia del desacoplante CCCP.

A 1 hora de incubación, tampoco se observan diferencias en los datos obtenidos en el lote control y en los lotes expuestos a la lectina, al medir consumo de oxígeno en el medio de incubación. Al cambiar el medio, se modificaron la mayoría de los registros. El valor del lote control fue más alto y los datos de los lotes con 200 y 300 ug/ml de PHA fueron más bajos, por lo que al estimular la respiración con CCCP, se llegan a observar diferencias entre estos lotes con el control.

A las 2 horas de incubación, los valores obtenidos en los lotes con la lectina son muy semejantes al observado en el lote control. Al resuspender a las células en medio fresco, se modificaron nuevamente los registros de consumo de oxígeno de la misma forma que en el tiempo anterior, es decir, el registro del lote control fue más alto y los de los tratamientos fueron más bajos, en comparación con los obtenidos en el medio de incubación. Por lo tanto, también se observaron diferencias en los valores de estimulación de la respiración producida por el desacoplante entre el lote control y los experimentales, porque los registros de estos últimos fueron más bajos.

A las 3 horas, todos los registros de consumo de oxígeno obtenidos en el medio de incubación, tanto en el control (s/PHA) como en los tratamientos, vuelven a ser muy semejantes entre sí y estos datos no se modificaron al reemplazar este medio por medio fresco, por lo que no se encontraron diferencias al estimular la respiración con el CCCP (gráfica 3).

Aunque se obtuvieron registros más adecuados de consumo de oxígeno estimulado por el desacoplante CCCP al cambiar el medio de incubación por medio fresco, el comportamiento respiratorio de las células se modificó en el mayoría de las mediciones después de realizar este procedimiento, por lo que se encontraron diferencias entre los valores de respiración desacoplada del control con los de los tratamientos (gráfica 3).

Al ajustar los datos obtenidos en el medio de incubación de cada uno de los tratamientos y el control (s/PHA), en los cuatro tiempos de incubación, se observa que el comportamiento respiratorio es muy semejante en todos ellos, puesto que los valores de las pendientes de las rectas son muy similares (gráfica 4). Al principio, las rectas tienen su origen entre los 50 y 56 natg/min, pero a las 3 horas llegan a coincidir casi en el mismo punto. Particularmente, los datos obtenidos en los lotes que contenían la concentración más alta de la lectina que se empleó, de 300 ug/ml, son los que se parecen más a los registros de los controles (tabla II y gráfica 4).

Tabla II. Comportamiento respiratorio de los timocitos expuestos a diferentes concentraciones de PHA. Unidades: natg de oxígeno/min. %: Porcentaje de aumento del consumo de oxígeno de las células producido por el desacoplante CCCP (8 μ M). Control: Consumo de oxígeno sin CCCP.

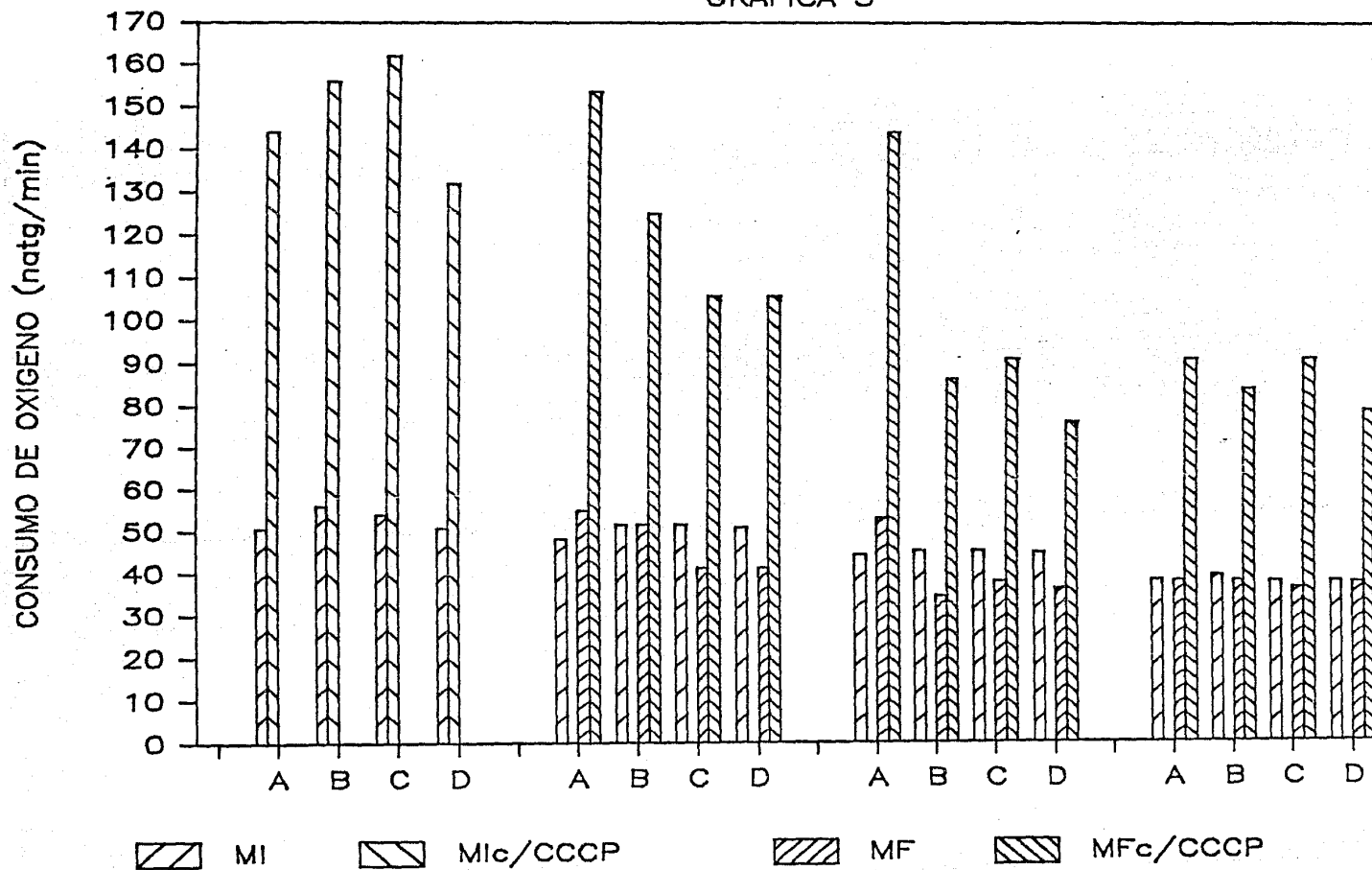
T I E M P O (horas)											
PHA (μ g/ml)	0		1			2			3		
	Medio de incubación		Medio de inc.	Medio Fresco		Medio de inc.	Medio Fresco		Medio de inc.	Medio Fresco	
	s/CCCP	c/CCCP	s/CCCP	s/CCCP	c/CCCP	s/CCCP	s/CCCP	c/CCCP	s/CCCP	s/CCCP	c/CCCP
0	50.6	144.0 184%	48.0	54.8	153.6 180%	44.0	52.8	144.0 172%	38.0	37.7	91.2 142%
100	56.0	156.0 178%	51.4	51.4	124.8 143%	45.0	34.3	86.4 152%	39.0	37.7	84.0 130%
200	54.0	162.0 200%	51.4	41.1	105.6 157%	45.0	37.7	91.2 142%	37.5	36.0	91.2 153%
300	50.6	132.0 160%	50.6	41.1	105.6 157%	44.5	36.0	76.0 111%	37.5	37.3	78.8 111%

Gráfica 3. Comportamiento respiratorio de los timocitos expuestos a diferentes concentraciones de PHA.

A = Control (s/PHA)	B = 100 ug/ml de PHA
C = 200 um/ml de PHA	D = 300 ug/ml de PHA
MI = Medio de incubación	MF = Medio fresco

EFEECTO DE LA PHA

GRAFICA 3



Gráfica 4. Relación en el consumo de oxígeno obtenido en el medio de incubación entre los lotes controles y los expuestos a la PHA, a través del tiempo. Ecuaciones de las rectas:

- Control (s/PHA) $Y = (-4.18) X + 51.4$

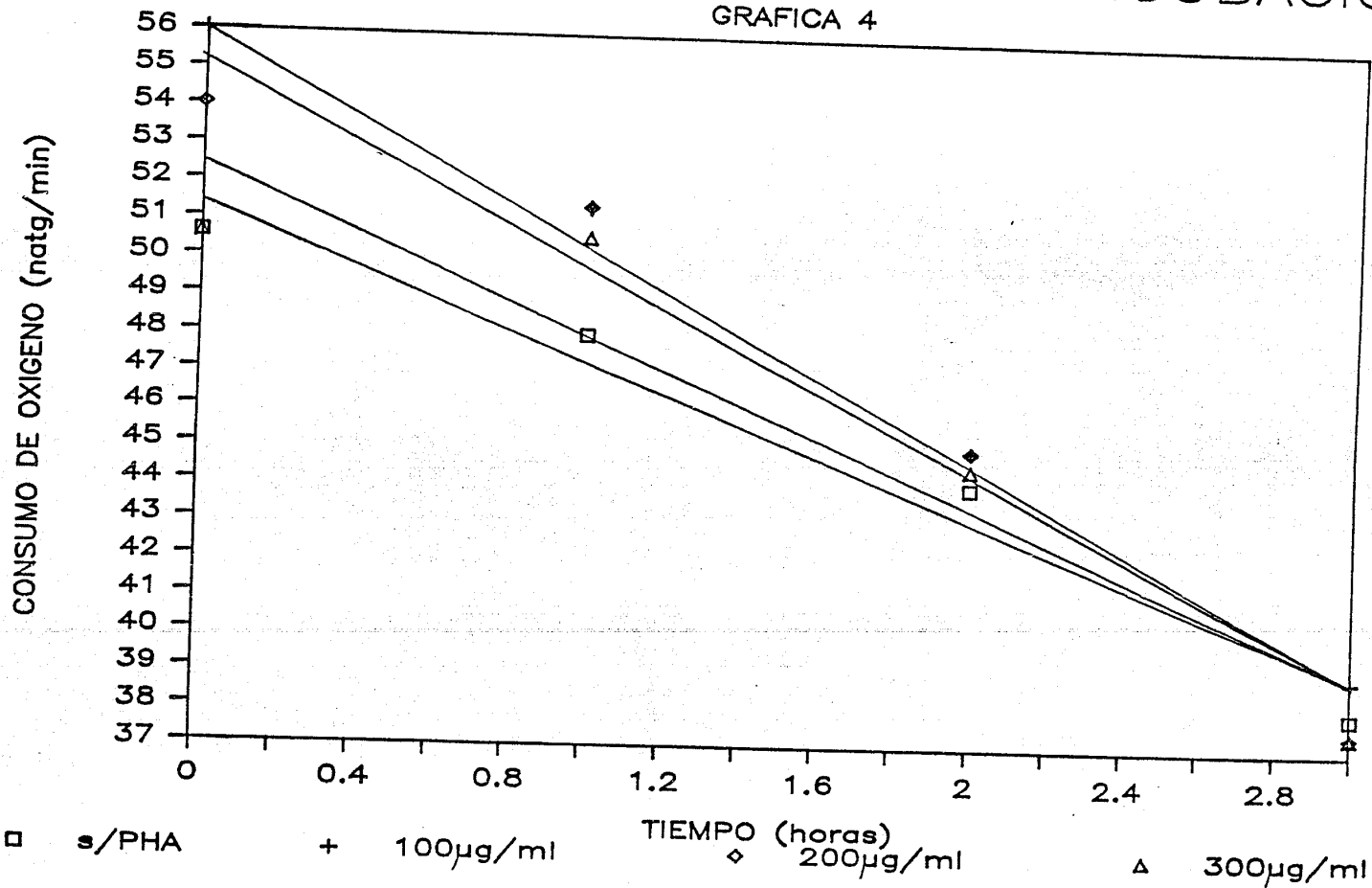
- 100 ug/ml de PHA $Y = (-5.74) X + 56.4$

- 200 ug/ml de PHA $Y = (-5.59) X + 55.3$

- 300 ug/ml de PHA $Y = (-4.54) X + 52.6$

RESPIRACION EN MEDIO DE INCUBACION

GRAFICA 4



El hecho de que estos datos se aproximen a formar una recta con pendiente negativa (gráfica 4), posiblemente se debió a una disminución en la viabilidad de las células a través del tiempo, lo que produjo un descenso gradual en los registros de consumo de oxígeno de los timocitos. Esta posibilidad podría estar apoyada también, al no observar respuesta por parte de estas células al cambio de medio realizado después de tres horas de incubación.

Por lo tanto, no se observó una modificación apreciable en el consumo de oxígeno de los linfocitos de timo de conejo expuestos 0, 1, 2, y 3 horas a las tres concentraciones de PHA utilizadas en este trabajo. Lo anterior se establece con base en lo obtenido sólo en el medio de incubación.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Culvenor y Weidemann (1976), ya que estos autores tampoco observan diferencias en el consumo de oxígeno de timocitos de rata expuestos una hora a la PHA (600 ug/10⁶ células). Roos y Loos (1973b), al utilizar linfocitos de sangre periférica de humano incubados 4 horas con 100 ug/ml de la lectina obtienen los mismos valores de respiración que en los cultivos controles. Algo muy semejante se ha observado al estimular linfocitos de timo de rata con la lectina Concanavalina A (Con A) en las primeras horas de incubación (Culvenor y Weidemann, 1976; Hume y cols., 1978).

Se confirma entonces, que el consumo de oxígeno, el cual comúnmente se utiliza como parámetro para evaluar el metabolismo respiratorio, no se altera en las primeras etapas de estimulación producida por la PHA in vitro. Culvenor y Weidemann (1976), y Hedekov (1968), han observado que algunas reacciones de la glucólisis, como son la utilización de la glucosa de manera proporcional con la producción de ácido láctico, aumentan de una manera significativa al inicio de esta activación. Esto podría sugerir, que los requerimientos energéticos necesarios para que se lleve a cabo la activación metabólica celular producida por la PHA en las etapas iniciales, son cubiertos principalmente por la energía proveniente de la glucólisis, puesto que es la ruta energética que incrementa su actividad durante este proceso, ya que la producción de ATP proveniente de la respiración permanece constante, pues el consumo de oxígeno no se modifica (McKeehan, 1982).

Sin embargo, se ha encontrado que muchas funciones que se activan al estimular antigénicamente células linfoides in vitro, requieren del aporte energético proveniente de ambas rutas metabólicas, puesto que se ha visto que al inhibir la glucólisis o la respiración, los linfocitos T no pueden iniciar procesos de citotoxicidad, indispensables para llevar a cabo la respuesta inmune de tipo celular (Ling y Kay, 1975). Posiblemente, los cambios que existen en el metabolismo oxidativo de los timocitos durante la estimulación antigénica, se lleven a cabo en las etapas más tardías de este proceso, puesto que se ha observado que estas células cuando terminan de diferenciarse presentan en

su citoplasma un número mayor de mitocondrias al que tenían antes de transformarse (Ling y Kay, 1975; Bach, 1984), lo que sugeriría entonces, que la actividad respiratoria se incrementa cuando las células linfoides son inmunológicamente activas.

Es importante señalar que, aunque algunos antecedentes mencionan que la estimulación en la respiración de los linfocitos producida por el PHA se observa después de incubar a estas células en presencia de la lectina por tiempos prolongados, de 24 a 72 horas (Pachman, 1967; Roos y Loos, 1973b), las condiciones en las que se mantuvieron a las células en este trabajo, no permitieron realizar estas mediciones en cultivos.

Existen algunas alternativas de estudio que surgen a raíz de estos resultados, como es el de conocer el tipo del o de los factores del suero fetal de ternera que intervienen en el incremento de la estimulación de la respiración producida por el desacoplante CCCP, en estas células linfoides o en mitocondrias aisladas, para observar si el efecto que se produce es directamente sobre la fisiología de estos organelos. En el caso del efecto de la PHA sobre el metabolismo energético de los linfocitos, se tendrían que optimizar condiciones de cultivo de estas células, al utilizar los componentes del medio de incubación empleados en este trabajo, para evaluar algunos procesos de la actividad de la ruta glucolítica y el comportamiento respiratorio, después de mantenerlas en presencia de distintas concentraciones de la lectina por tiempos más largos de incubación. Por otra parte, se podrían estudiar otros parámetros que permitan visualizar también diferencias en la actividad respiratoria durante la estimulación antigénica, como son la concentración de ciertos intermediarios y productos formados por esta ruta metabólica (NADH, ATP, etc.) y cambios en la actividad de algunas enzimas mitocondriales *in vitro*.

V) BIBLIOGRAFIA.

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., y Watson, J. D., 1983. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc. U.S.A. págs. 482-546.
- Bach, J.F., 1984. *Inmunología*. LIMUSA. México. 908 pp.
- Bajpai, A.C., Callus, I.M., y Fairley, J. A., 1981. *Métodos estadísticos para estudiantes de ingeniería y ciencias*. LIMUSA. México. 583 pp.
- Becker, W., 1986. *The world of the cell*. The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc. U.S.A. págs. 208-242.
- Benitez, M.T., 1970. *Reacción de los linfocitos en cultivo a los componentes del medio (I)*. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. UNAM.
- Bonilla, N.M., 1970. *Reacción de los linfocitos en cultivo a los componentes del medio (II)*. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. UNAM.
- Clark, L. C., Wolf, R., Granger, D., y Taylor, Z., 1953. *Continuous recording of blood oxygen tensions by polarography*. *J. Appl. Physiol.* 6:189-193.
- Cline, M., 1975. *The White Cell*. Harvard University Press. Massachusetts. 564 pp.
- Coffey, R. G., Hadden, E., y Hadden, J., 1977. *Evidence for cyclic GMP and calcium mediation of lymphocytes activation by mitogens*. *J. Immunol.* 119(4): 1387-1394.
- Culvenor, J. y M. Weidemann, 1976. *Phytohaemagglutinin stimulation of rat thymus lymphocyte glycolysis*. *Biochim. Biophys. Acta.* 437:354-363.
- Deutsch, C., Price, M. A., y Johansson, C., 1981. *A sodium requirement for mitogen-induced proliferation in human peripheral blood lymphocytes*. *Exp. Cell Res.* 136:359-369.
- Felber, M. y M. Brand, 1983. *Concanavalin A causes an increase in sodium permeability and intracellular sodium content of pig lymphocytes*. *Biochem. J.* 210:893-897.
- Freedman, M. H., Khan, N. R., Trew-Marshall, B. J., Cupples, C. G. y Mély-Goubert, B., 1981. *Early biochemical events in lymphocyte activation*. *Cell. Immunol.* 58:134-146.
- Harold, F. M., 1986. *The vital force: A study of bioenergetics*. W. H. Freeman and Company. U. S. A. págs. 197-250.

- Hedeskov, C. y V. Esmann, 1966. Respiration and glycolysis of normal human lymphocytes. *Blood*. 28(2):163-174.
- Hedeskov, C., 1968. Early effects of PHA on glucose metabolism of normal human lymphocytes. *Biochem. J.* 110:373-380.
- Hinkle, P. y R. McCarty, 1978, How Cells Make ATP. *Sci. Am.* 238(3): 104-123.
- Hume, D. A., Radik, J. L., Ferber, E., y Weidemann, M. J., 1978. Aerobic glycolysis and lymphocyte transformation. *Biochem. J.* 174:703-709.
- Lazzarini, A., Luciani, S., Beltrame, M., y Arslan, P., 1985. Effects of chromium (VI) and chromium (III) on energy charge and oxygen consumption in rat thymocytes. *Chem.-Biol. Inter.* 53:273-281.
- Lehninger, A., 1981. *Bioquímica*. Ediciones Omega. Barcelona. págs. 427-598.
- Lerner, R.A. y F. J. Dixon, 1973. The human lymphocyte as an experimental animal. *Sci. Am.* 228 (6):82-91.
- Ling, N. y J. Kay, 1975. *Lymphocyte Stimulation*. North-Holland Publishing Company. Netherlands. 398 pp.
- McKeehan, W., 1982. Glycolysis, Glutaminolysis and cell proliferation (minireview). *Cell. Biol. Int. Rep.* 6(7):635-650.
- Pachman, L., 1967. The carbohydrate metabolism and respiration of isolated small lymphocytes: in vitro studies of normal and PHA stimulated cells. *Blood*. 30(6):691-706.
- Peña, A., Arroyo, A., Gómez, A., Tapia, R., y Villa, S., 1981. *Bioquímica*. LIMUSA. México, págs. 207-234.
- Phillips, H. J., 1973. Dye exclusion test for cell viability. in: *Tissue Culture: Methods and applications*. (Kruse, P. F. y M. K. Patterson, eds.). Academic Press, Inc. New York. págs. 406-408.
- Polgar, P. R., Foster, J. M. y Cooperband, S. R., 1968. Glycolysis as an energy source for stimulation of lymphocytes by phytohaemagglutinin. *Exp. Cell. Res.* 49:231-237.
- Ponce, P., 1979. El efecto del calcio sobre la división mitótica de los linfocitos humanos in vitro. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. UNAM.
- Roos, D. y J. Loos, 1970. Changes in the carbohydrate metabolism of mitogenically stimulated human peripheral lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 222:505-582.

- Roos, D. y J. Loos, 1973(a). Effect of phytohaemagglutinin on the carbohydrate metabolism of human blood lymphocytes after inhibition of the oxidative phosphorylation. *Exp. Cell Res.* 77:121-126.

- Roos, D. y J. Loos, 1973(b). Changes in the carbohydrate metabolism of mitogenically stimulated human peripheral lymphocytes. *Exp. Cell Res.* 77:127-135.

- Sharon, N., 1977. Lectins. *Sci. Am.* 236(6): 108-119.

- Stryer, L., 1981. *Biochemistry*. W. H. Freeman and Company. U.S.A. págs. 235-307.

- Temin, H. M., Pierson, R. W. y Dulak, N. C., 1972. The role of serum in the control of multiplication of avian and mammalian cells in culture. in: *Growth, Nutrition and Metabolism of Cells in Culture*. (Rothblat, G. y V. Cristofalo eds.). Academic Press. U.S.A. págs. 49-81.

- Terada, H., 1981. The interaction of highly active uncouplers with mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta.* 639:225-242.

- Tollefsbol, T. y H. Cohen, 1985. Culture kinetics of glycolytic enzyme induction, glucose utilization, and thymidine incorporation of extended-exposure phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. *J. Cell Physiol.* 122:98-104.

- Waymouth, C., 1972. Construction of tissue culture media. in: *Growth, Nutrition and Metabolism of Cells in Culture*. (Rothblat, G. y V. Cristofalo, eds.). Academic Press. U.S.A. págs. 11-47.