



11262
2 of 13
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION "SALVADOR ZUBIRAN"
CURSO DE MAESTRIA EN CIENCIAS MEDICAS**

**INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS Y CICLO
CELULAR EN DIFERENTES SUBPOBLACIONES
DE LINFOCITOS T HUMANOS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

DR. FRANCISCO JAVIER SANCHEZ AGUIRRE

Director de Tesis:

DR. OSVALDO MUTCHINICK B.

MEXICO, D. F.

FALLA DE ORIGEN

1987



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

INDICE

	Pág.
INTRODUCCION	1
MATERIAL Y METODOS	25
RESULTADOS	33
DISCUSION	41
BIBLIOGRAFIA	48

INTRODUCCION

Los linfocitos humanos

Los linfocitos son las células que participan en -- forma esencial en la respuesta inmune y están representados -- básicamente por dos tipos: los linfocitos B y los T.

Los linfocitos B se originan en la bolsa de Fabricio de los pájaros y en la médula ósea de los mamíferos. Estas -- células son las responsables de la inmunidad humoral, las que a través de un proceso de maduración, en el cual intervienen los linfocitos T, se transforman en células plasmáticas pro-- ductoras de anticuerpos.

Con respecto al origen de los linfocitos T, si bien las células precursoras de estos se originan en la médula -- ósea, es necesario que las mismas emigren al timo, en donde -- por un proceso de diferenciación se hacen funcionalmente com-- petentes. Estos linfocitos T son los responsables de la inmu-- nidad celular y además regulan la producción de anticuerpos -- de las células B.

Los linfocitos T y B presentan a su vez, subpobla-- ciones celulares. Las subpoblaciones de linfocitos T humanos, que son los de interés para el presente trabajo, fueron iden-- tificadas y aisladas por primera vez por varios grupos de in--

investigadores. Todos ellos aprovecharon la capacidad de los receptores de superficie celular, de aceptar la parte Fc de la IgG o bien la parte Fc de la IgM (1,2,3,4), por ello se clasificaron en células T γ y T μ respectivamente. Posteriormente se determinó que las células T γ presentan función de supresión y las células T μ función de ayuda, en la proliferación o diferenciación de los linfocitos B (5).

Los estudios realizados por Köhler y Milstein en 1975 (6), sobre el control genético de la producción de inmunoglobulinas, sentaron las bases para obtener anticuerpos monoclonales, que han resultado de gran utilidad para identificar y separar, específicamente, a las subpoblaciones de linfocitos T en humanos (7,8,9,10). Las subpoblaciones así obtenidas, a partir de sangre periférica, se han denominado como células T $_4$ + y T $_8$ +; la relación que guardan estas células en dicho tejido es de 2:1 (11). Recientemente la nomenclatura de estas células se ha cambiado (12): a las células T $_4$ + se les denomina CD4+ y a las T $_8$ + se les conoce como CD8+.

Dichas subpoblaciones de células T no solamente difieren en sus marcadores de superficie, sino también presentan funciones efectoras específicas dentro de la cooperación celular. Dentro de las células CD4+ existen las inductoras y las de ayuda, y dentro de las CD8+ las supresoras y las citotóxicas (7). Ambas poblaciones celulares son capaces de identificar a los antígenos a través de sus receptores y en

presencia de moléculas codificadas en el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (13,14). Las CD4+ requieren de las de clase II, las cuales se encuentran principalmente en los macrófagos y en las células B y las CD8+ requieren de las de clase I que se encuentran en todas las células somáticas.

Las células CD4+ y CD8+, separadas por anticuerpos monoclonales y analizadas con microscopía electrónica, muestran características morfológicas semejantes (15). Sin embargo, en un estudio más reciente se encontró que las células CD8+ contienen mayor cantidad de citoplasma, de aparato de Golgi y de mitocondrias que las células CD4+ (16); sugiriéndose que esta desigualdad podría estar relacionada con las diferencias funcionales entre esas poblaciones celulares.

En algunas enfermedades inmunológicas se han observado anomalías en la proporción y/o en las funciones de las subpoblaciones de células T (17,18,19). Estos cambios permiten que las separaciones de las subpoblaciones de células T y el análisis de las interacciones de esas células ayuden a profundizar en el conocimiento de la fisiopatología de ese tipo de enfermedades.

Intercambio de cromátidas hermanas

Un fenómeno que se ha observado en los cromosomas de las células de los organismos eucariotes ha sido el inter

cambio de cromátidas hermanas (ICH); los cuales son intercambios simétricos de fragmentos cromosómicos entre las cromátidas de un mismo cromosoma, que se ponen en evidencia después de dos ciclos de división celular, mediante la técnica de tinción diferencial con 5-bromodeoxiuridina (BrdU).

La técnica de tinción diferencial, se basa en que una de las cromátidas incorpora en ambas hebras de la doble cadena de ADN el análogo de base BrdU en lugar de la timina. En consecuencia, al teñir posteriormente los cromosomas con Giemsa esa cromátida presenta una coloración pálida, mientras que la otra cromátida, que solamente tiene substituida una de las hebras del ADN con BrdU presenta una coloración oscura, tal como puede observarse en la figura 1.

Se ha postulado como mecanismo molecular de este fenómeno a la fotólisis del ADN en la cromátida disubstituida, seguida de la extracción del ADN degradado (20,21). Entre las fuentes de luz artificial y natural que se han examinado, para lograr la fotólisis, la luz negra con una longitud de onda de 355 nm y la luz solar han resultado las óptimas (20). La técnica de tinción diferencial, necesita además del reactivo de Hoechst-33258, el cual sensibiliza al ADN unido a la BrdU e incrementa su fotólisis.

En general, se acepta que los ICH en los organismos eucariotes pueden ser espontáneos, esto ha sido sugerido



Figura 1. Metafase de segunda división (una cromátida - clara y la otra obscura) en la que se pueden apreciar los intercambios de cromátidas hermanas.

por el hecho de que existe una frecuencia constante de ICH - con bajas concentraciones de BrdU (22) y también porque en - ciclos celulares diferentes se presenta el mismo número de - ICH; esto último ha sido observado mediante la técnica de - ICH de tres tonos (23). También la espontaneidad de los ICH ha sido sugerido por los rearrreglos topológicos de la duplicación de cromosomas en anillos (24).

El fenómeno de ICH lo observó por primera vez Taylor en 1958, en las células de raíces de *Bellevalia romana*, mediante el uso de timidina tritiada y autorradiografía (25). Sin embargo, la técnica no ofrecía la suficiente resolución - para visualizar los ICH en cromosomas superpuestos o cuando - estos eran demasiado pequeños.

En 1967 Huang, al investigar el efecto de algunos - carcinógenos, virus y análogos de bases sobre las células embrionarias de *Rattus natalensis*, observó que la BrdU ocasionalmente teñía en forma diferente a las cromátidas hermanas - (26). Posteriormente Zakharov y Egolina, en líneas celulares de hamster chino, determinaron que la tinción diferencial se observaba en células que estuvieron durante dos fases S en -- presencia de BrdU (27). En 1973 Latt, usando la BrdU y el colorante fluorescente Hoechst-33258 mostró, de una forma más - evidente, la tinción diferencial sobre las cromátidas hermanas en cromosomas humanos (28). Un año después Perry y Wolff

modificaron la técnica de Latt, agregando además el colorante Giemsa, lo cual permitió examinar los cromosomas al microscopio de luz en forma permanente (29). Esta última técnica es la más comúnmente utilizada en la actualidad.

Aún cuando el significado biológico de los ICH no se conoce totalmente, se piensa que pueden estar relacionados con procesos de reparación del ADN, recombinación somática, ser consecuencia de un error en la replicación normal del ADN o también deberse a algunos procesos de amplificación o diversificación de genes (30,31,32). Debido a que los rayos X y algunas drogas como la bleomicina producen aberraciones cromosómicas pero no ICH, y que drogas como la mitomicina C inducen ICH a dosis que no inducen aberraciones, se ha considerado que el mecanismo molecular de esos dos procesos es diferente (33,34,35).

En cultivos de linfocitos de individuos no expuestos el número basal de los ICH por células varía generalmente de 0 a 16. Dicha frecuencia puede alcanzar valores de 300 - ICH por célula en linfocitos expuestos a etilmetanosulfonato, provenientes de pacientes con síndrome de Bloom (36). No se sabe todavía, si dicho número es el límite del sistema de detección o del número de sitios en el cual los ICH se presentan.

Los ICH se observan tanto en cultivos "in vitro" - como "in vivo" aunque en estos últimos, la frecuencia es -- siempre menor que en los primeros (37,38,39). Esto puede -- estar dado por diferencias en las concentraciones de BrdU -- usadas, ya que se ha demostrado (22,40) que esa sustancia - induce por si misma ICH. Algunas drogas, como la ciclofosfa mida, son capaces de inducir ICH solamente "in vivo", lo que ha puesto de manifiesto la importancia del metabolismo de -- esas drogas sobre la frecuencia de ICH. Esto fue demostrado además al observar que cuando la droga mencionada se aplica "in vitro" en presencia de S9 (fracción microsomal de un ho- mogenado de hígado de rata) es posible inducir ICH (33,38, - 41).

El estudio de la frecuencia de ICH realizado en los linfocitos del hombre, el cerdo y el conejo, ha mostrado que el primero y el último presentan la máxima y mínima frecuen- cia respectivamente (42).

La edad de las células en cultivo o la de los dona- dores de las mismas, es un factor que afecta a la frecuencia de ICH. Se ha observado que si bien en condiciones normales las células más viejas no difieren en la frecuencia compara- das con células más jóvenes, cuando ambos tipos celulares se exponen a agentes químicos inductores de ICH, las células más viejas muestran una frecuencia menor, lo que se ha tratado de

explicar como resultado de una disminución en la capacidad de reparación del ADN de estas últimas (43).

El origen celular también puede afectar a la frecuencia de los ICH. Se ha observado que las células que provienen del intestino o de los nódulos linfáticos muestran más ICH (44) y las de la médula ósea menos que otros tejidos (45).

Aún cuando la frecuencia de ICH no se modifica al suplementar los medios de cultivo con diferentes sueros, tales como, fetal de ternera, humano AB y autólogo; dicha frecuencia sí varía al utilizar diferentes medios de cultivo -- (46), habiéndose dado como una posible explicación las diferencias en la concentración de timidina en dichos medios.

Otro factor que afecta la frecuencia es la exposición de los cultivos de linfocitos a los *Mycoplasmas fermentans* y *salivarium*. Con el primero el efecto depende de la cantidad del inóculo y con el segundo aún los inóculos pequeños inducen un aumento significativo de ICH (47).

Se han encontrado diferencias significativas en la frecuencia de ICH, entre los cultivos de sangre total y los de linfocitos purificados (48), en cultivos repetidos de -- muestras de un mismo individuo (46,48) y también entre individuos (42,48). Sin embargo, esas dos últimas observaciones

no han sido siempre corroboradas (49,50).

Las condiciones tales como el tabaquismo, el sexo y la raza, aún en la actualidad están en controversia con -- respecto a si alteran o no la frecuencia de ICH (51,52).

Existen varios agentes reconocidos como inductores de ICH, a continuación se mencionan algunos de ellos:

- a) Agentes alquilantes, como la mitomicina C, etilmetanosulfonato y mostaza nitrogenada, entre otros (53,54,55).
- b) Productores de dímeros de pirimidinas, como la luz ultravioleta (55).
- c) Análogos de bases como la Br- y Cl-dU (56).
- d) Colorantes que se unen al ADN como el Hoechst-33258, que en asociación con la BrdU tienen un -- efecto sinérgico (57). Además, otros colorantes -- que se intercalan en el ADN, como la naranja de -- acridina y mostaza de quinacrina (58).
- e) Diversos plaguicidas agrícolas como el malati6n, - dimetoato y metil-paration (59,60,61).
- f) Agentes diversos, como virus y radicales libres -- que atacan al ADN (55).

El análisis de la frecuencia de los ICH ha mostra

do ser un indicador muy sensible del efecto mutagénico en -- cromosomas humanos, debido a esto se utiliza actualmente como un sistema de prueba para detectar el daño provocado por diversos agentes químicos (62). En ese sentido la frecuencia de ICH se presenta como una prueba clínica útil para el monitoreo de diversas drogas utilizadas en los pacientes con cáncer (63,64,65,66,67), ya que se ha encontrado, que algunos pacientes bajo tratamiento quimioterápico por cáncer, están en riesgo de desarrollar en forma posterior otro tipo de neoplasia diferente a aquella por la cual se les dió el tratamiento (68,69,70). También la frecuencia de ICH ofrece un método predictivo para la elección del agente quimioterápico más apropiado en las neoplasias humanas (71).

Algunos investigadores han encontrado que las células de la médula ósea de pacientes con leucemia aguda no tratados muestran una frecuencia muy baja de ICH (72). En otros estudios se encontró que existe una frecuencia alta de ICH - en las células de pacientes con enfermedad de Hodgkin y linfoma no-Hodgkin, tanto directamente en linfocitos de sangre periférica, como en líneas celulares (73,74). Hasta ahora, ninguna de esas observaciones han podido ser comprobadas sistemáticamente ni en esos tipos de cáncer ni en otros (75,76, 77). Sin embargo, llama la atención que las células de pacientes con cáncer tienen una sensibilidad elevada a la inducción de ICH al ser expuestas a carcinógenos químicos (78).

Además también se ha observado lo mismo en células transformadas por carcinógenos químicos o virus oncogénicos, habiéndose sugerido una asociación entre los cambios celulares y el estado de malignidad celular (79). Tal vez una de las explicaciones a las anteriores discrepancias sea que muchas veces no se utilizan los controles idóneos ni se estudian los tipos celulares directamente involucrados en el proceso neoplásico, además de la posible influencia de condiciones tales como infecciones bacterianas o virales (80).

En enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico también se ha encontrado una frecuencia alta de ICH en los linfocitos (81,82). Los pacientes con esta enfermedad, presentan una gran sensibilidad de la piel a la luz ultravioleta. Los estudios realizados con fibroblastos de piel de algunos pacientes con lupus eritematoso sistémico, no mostraron aumento en la frecuencia de ICH. No obstante, no se descarta la posibilidad de que exista un defecto en el sistema de reparación del ADN en los fibroblastos de estos individuos (82).

Existen algunas enfermedades hereditarias en las cuales el análisis de la frecuencia de los ICH sirve de apoyo diagnóstico. Entre ellas puede citarse, el síndrome de Bloom en el cual existe un gran aumento en la frecuencia espontánea de ICH (83) y también en pacientes con xeroderma --

pigmentoso, en los que se ha encontrado que los ICH inducidos por la luz ultravioleta o por agentes químicos es mayor que en controles (84,85).

Entre los grupos cromosómicos A y D, la frecuencia de ICH es directamente proporcional a su longitud, pero a partir del grupo E en adelante dicha frecuencia es menor que la esperada por tamaño de cromosoma (86,87). Además dichos ICH no se distribuyen de manera homogénea a lo largo de los cromosomas, ya que se ha observado, que la mayoría se localizan en las regiones medias de los brazos cromosómicos, en cambio en las regiones centroméricas y en las de heterocromatina C se caracterizan por contener un número escaso de ICH (87,88).

Mediante las técnicas de bandas G y Q se ha podido demostrar que existen en los cromosomas zonas preferenciales donde se producen los ICH y que son las bandas G negativas y la interfase entre las bandas G negativas y positivas (89,90), es decir, la interfase entre el ADN de replicación temprana y tardía, este último rico en adenina y timina (91). Con la técnica de bandas C, en la que se ponen de manifiesto las zonas con heterocromatina constitutiva, de replicación tardía, se ha encontrado que la mayoría de los ICH de la región pericentromérica se presentan en la interfase heterocromatina-eucromatina (92,93,94). Existe entonces una similitud entre las observaciones realizadas con todas las técnicas mencionad

das, en lo que se refiere a la probabilidad que tienen los - ICH de situarse en la interfase entre el ADN de replicación temprana y tardía.

Algunos investigadores han sugerido que las subpoblaciones de linfocitos humanos puedan diferir en la sensibilidad al daño de su ADN y en la frecuencia de ICH (95,96,97). Esas diferencias podrían explicar los dos tipos de variaciones observadas en los estudios citogenéticos en los cuales - se utiliza esta técnica:

- a) La variación interindividual.
- b) La variación intercelular en un mismo individuo.

Algunos estudios han analizado los ICH en poblaciones de linfocitos T y B, encontrando que los linfocitos T -- muestran una frecuencia significativamente mayor que los linfocitos B (98,99,100). Sin embargo debido a que la fitohema glutinina (PHA), la lectina más empleada en las técnicas citogenéticas, estimula preferentemente a los linfocitos T en cultivos de corto tiempo (101,102), podría pensarse que las células que contribuyen en mayor proporción a las variaciones antes descritas, estarían dentro de las subpoblaciones de -- linfocitos T.

Ciclo celular

El ciclo celular se define como el intervalo de - tiempo que transcurre de una mitosis a la subsecuente. El

tiempo del ciclo de la mayoría de las líneas celulares en -- cultivo se encuentra entre 10 y 30 h (103).

Aún cuando se han realizado muchos estudios para - analizar y tratar de caracterizar los mecanismos que controlan la proliferación celular, todavía en la actualidad ninguno de los mecanismos que regulan el tiempo del ciclo celular se conoce completamente. El avance logrado hasta la fecha - se ha dado por dos formas de estudio (103,104):

- a) El aislamiento de mutantes sensibles a la temperatura, que son bloqueadas en puntos específicos del ciclo celular. Aunque este aislamiento es difícil, - lo es más la completa caracterización de las células mutantes. Otras formas que han sido de utilidad en el conocimiento de la regulación del ciclo celular son los estudios de los efectos producidos por drogas que inhiben en forma específica los procesos bioquímicos del mismo.
- b) El análisis de las diferencias entre las células normales y las transformadas también sugiere cuáles son los pasos bioquímicos más importantes para la regulación del ciclo celular. Hay que mencionar también - aquí el estudio de los factores que estimulan la proliferación de las células en reposo.

Los primeros eventos que se producen en los linfocitos al ser inducidos a proliferar por medio de mitógenos - se han clasificado en (105,106,107,108,109):

- 1) Eventos que se producen de segundos a minutos, tales como: cambio en el flujo de cationes monovalentes, activación de la fosfolipasa A₂, síntesis y recambio de lípidos, metabolismo del ácido araquidónico, flujo de calcio, cambios en los nucleótidos cíclicos, fosforilación de proteínas, activación de la esterasa de serina e incremento en la tasa de transporte - de moléculas pequeñas a través de la membrana.
- 2) Eventos que se producen en horas, tales como: aceleración de la síntesis de proteína, de ARN y de polinucleótidos, cambios en el metabolismo de los carbohidratos, transformación blástica.
- 3) Eventos que se producen en días, como la síntesis de ADN.

En 1953, Howard y Pelc descubrieron que la síntesis del ADN entre dos divisiones celulares consecutivas no es continua, sino que esta separada por periodos, los cuales se denominaron como fases G₁ y G₂ (110). Tiempo después --

Lajtha descubrió que existían células que no se dividían, si no que estaban en reposo (111). Este estado se conoce como fase G_0 y aún hoy es objeto de discusión el que realmente -- exista (112).

En la actualidad, para estudiar al ciclo celular, éste se divide en la forma que se observa en la figura 2. -- Los eventos que se producen en cada una de esas fases son -- los siguientes (103,104):

Fase G_0 . Se considera como una fase de reposo, en donde el contenido de ARN es bajo; este contenido se incrementa cuando la célula se induce a proliferar. Algunos estudios han mostrado que los niveles de calmodulina (la principal proteína que capta al calcio en las células -- no musculares y que regula a varias enzimas -- intracelulares sensibles al calcio) se incrementan cuando la célula entra a G_0 , mientras que dichos niveles disminuyen cuando la célula es inducida a proliferar y sale de dicha -- fase para entrar a G_1 (107).

Fase G_1 . Las variaciones de tiempo observadas en el ciclo celular entre diferentes tipos celulares, se debe principalmente a esta fase, ya que -- las restantes tienen un tiempo relativamente

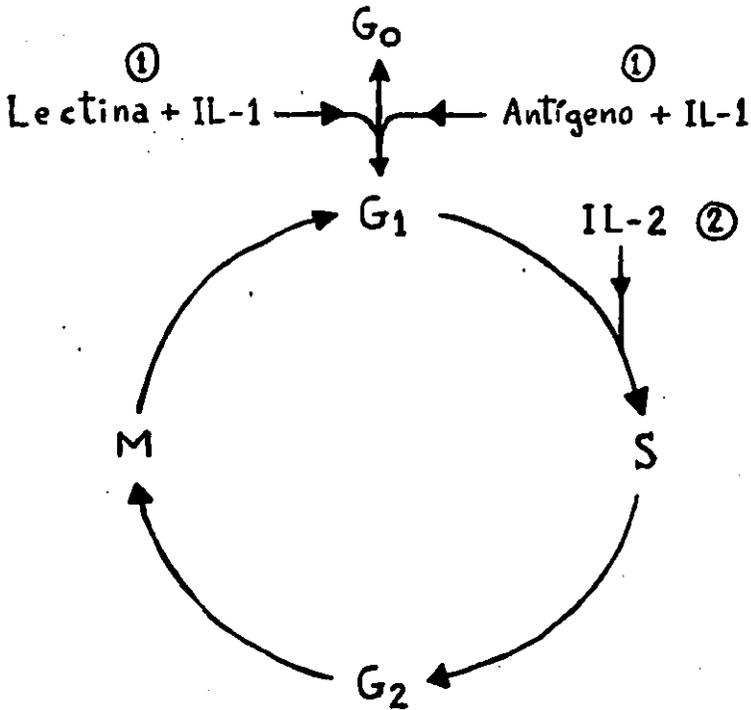


Figura 2. Esquema que describe el control del ciclo celular en las células T (140). La célula T en reposo (G_0) se activa por medio de cualquiera de las señales (1) y pasa a la fase G_1 , para después por intermedio de IL-2 (señal (2)) inducir la síntesis de ADN.

constante. En esta fase como en la anterior se sintetizan las cinco histonas constituyentes de la cromatina, pero en mínima cantidad (113). También en esta fase del ciclo celular los linfocitos T activados incrementan sus antígenos de diferenciación CD3, CD4 y CD8, así como los de la clase I del Complejo Mayor de Histocompatibilidad pero no se conoce el significado de este incremento (114). En los limites de esta fase con la precedente, nueva--mente se incrementan los niveles de calmodulina, considerándose que esta proteína es importante en la regulación de la síntesis de ADN (107). Parece ser, que los eventos cruciales que controlan la regulación del crecimiento celular ocurren en esta fase.

Fase S. Los eventos principales en ésta, son la síntesis de ADN y de histonas, los cuales se realizan en aproximadamente 6 a 8 h. El primer --evento se realiza simultáneamente en diferen--tes cromosomas y segmentos de un mismo cromosoma. Cada segmento o unidad de replicación se conoce como replicón. Esta fase se puede dividir en 3 subestadios; en el primero de --ellos se duplica el 15% del ADN y el restan--

te en los dos siguientes. Durante los dos primeros subestadios se replican las bandas G negativas, mientras que las G positivas se replicanan en el último subestadio. El segundo evento, o sea, la síntesis de histonas se sabe que esta acoplada a la síntesis de ADN (115). Desde hace tiempo se conoce que las histonas, son proteínas de gran importancia para el empaquetamiento del ADN (116).

Fase G₂ El tiempo de duración de ésta es de 2 a 6 h, - en ella la célula se prepara para la mitosis - por lo cual se produce una gran condensación - cromosómica. En ésta fase del ciclo celular -- los linfocitos T activados, incrementan en su - superficie celular los antígenos clase II del - Complejo Mayor de Histocompatibilidad, ignorándose su significado (114).

Mitosis. En esta fase se realiza la división celular y tiene un tiempo de duración de aproximadamente 1 h. Esta fase se inicia cuando los cromosomas pueden ser observados al microscopio de luz y por fines prácticos se clasifica en:

a) En la Profase la célula tiende a adoptar una forma esférica y aumenta su refringencia y vis

cosidad. Los nucleolos desaparecen, los centriolos emigran hacia los polos celulares, los cromosomas se observan como delgados filamentos y la membrana nuclear se desintegra.

- b) La Prometafase se caracteriza por la desintegración de la membrana nuclear. Durante esta fase los cromosomas se dirigen hacia el ecuador del aparato mitótico y en el centrómero de cada cromosoma se desarrolla el cinetocoro. En la fase anterior y en ésta continua la condensación cromosómica.
- c) La Metafase se inicia con la llegada de los cromosomas al plano ecuatorial, alcanzando aquí su máxima condensación y se orientan a lo largo de su eje en ángulo recto a los polos. En las preparaciones citogenéticas, los cromosomas se observan en esta fase con la ayuda de la colchicina, la cual inhibe la formación del huso acromático.
- d) En la Anafase se produce la separación de los centrómeros y las cromátidas de cada cromosoma emigran en sentido opuesto hacia los polos.
- e) La Telofase comienza cuando los cromosomas llegan a los polos, los cromosomas empiezan a de-

sespiralizarse, desaparecen los cinetocoros. La membrana nuclear se reconstituye, el huso degenera y reaparecen los nucleolos.

- f) La citocinesis es propiamente la división celular, la cual se produce en el centro celular, dando consecuentemente dos células hijas.

El tiempo del ciclo celular depende de diversos factores; se ha encontrado, por ejemplo, que el medio de cultivo utilizado influye sobre su duración (117). Con el suero fetal en particular, los resultados han sido contradictorios, - en algunos trabajos se muestra que alarga el tiempo del ciclo celular (118,119) y en otros, que no tiene ningún efecto (117).

Los valores del pH tanto intra como extracelular también afectan la duración del ciclo. Así, con valores entre - 7.2 y 6.8 de pH extracelular se mantiene el crecimiento exponencial y además se induce la proliferación de las células en reposo. Si el pH extracelular se mantiene entre 6.7 y 6.4, - la tasa de crecimiento se reduce y por último con valores de pH menores que 6.3 se inhibe casi por completo el crecimiento celular (120).

Con respecto al pH intracelular, se observó que en los linfocitos de rápida proliferación ese pH es más alcalino que en los que se encuentran en reposo (121). Posteriormente

se constató que el pH en las fases G₀, G₁ y G₂ es de 7.2 y en la fase S es de 7.4 (122).

La duración del ciclo celular no afecta a la frecuencia de los ICH (50), pero el número de aberraciones cromosómicas estructurales, es marcadamente más alta en metafases de primera división. Así, la estimación más apropiada de las aberraciones cromosómicas en los estudios que detectan daño clastogénico debe ser analizado en metafases de primera división "in vitro" (123).

Los estudios sobre la duración del ciclo celular - en un mismo individuo, a quien se tomaron muestras consecutivas con intervalos de tiempo de algunas semanas, mostraron - que existen diferencias en la duración del mismo (48).

Las células leucémicas de pacientes sin tratamiento muestran un tiempo de ciclo celular más largo que los controles (72,76,124). Los agentes alquilantes, los plaguicidas y la mayoría de las drogas citostáticas utilizadas en los pacientes con cáncer aumentan la duración del ciclo celular - (49,60,66).

Los estudios realizados en linfocitos T y B separados, tanto por rosetas con eritrocitos de carnero (98,99), -- como con anticuerpos monoclonales (100), han mostrado que los linfocitos B presentan una cinética de proliferación celular

más rápida que los linfocitos T.

Los objetivos del presente trabajo fueron, primero investigar la posible contribución de algunas subpoblaciones de linfocitos T, en particular las CD4+ y CD8+, en la variación de las frecuencias de ICH observada en linfocitos humanos. El segundo objetivo fue determinar el ciclo celular en esas mismas subpoblaciones, todo con el propósito de adquirir un mejor conocimiento del comportamiento de dichas subpoblaciones celulares.

MATERIAL Y METODOS

Se seleccionaron cuatro individuos jóvenes y sanos del sexo masculino, cuyo promedio de edad fue de 28.8 años - (rango de 27 a 30 años), ya que en individuos de edad avanzada existe una disminución en el número de las células CD8+ - (125,126). Como requisito indispensable para ingresar en el estudio, los individuos seleccionados no debían estar expuestos a agentes reconocidos como inductores de ICH.

A. Obtención de las muestras

De cada individuo se extrajeron 120 ml de sangre - periférica con jeringa heparinizada, bajo condiciones adecuadas de esterilidad.

B. Separación de las células

La separación de las células, que se describe a -- continuación, está basada en técnicas comunicadas previamente (17,127).

Cada muestra sanguínea fue diluida con un volumen - igual de solución salina fisiológica (SSF) y colocada sobre - Ficoll/Hypaque (F/H) de una densidad de 1.077 g/ml, se centri - fugó a 2500 rpm por 20 min y a continuación, las células mono

nucleares (CMN) se obtuvieron de la fase intermedia del gradiente. Las CMN así obtenidas fueron lavadas en tres ocasiones con SSF y centrifugadas a 1200 rpm por 15 min. Posteriormente se determinó la viabilidad celular en una alícuota, en presencia de azul tripano y con la ayuda de un microscopio de luz directa.

Las células T se obtuvieron a partir de las CMN; para ello, estas últimas fueron incubadas toda la noche a -4°C con glóbulos rojos de carnero al 4% (GRC), para lograr la formación de rosetas. Al día siguiente, esta mezcla fue resuspendida en frío, colocada sobre F/H y centrifugada a 2500 rpm por 20 min a 4°C . Las rosetas, que contenían células T fueron recuperadas del fondo del gradiente y lavadas una vez en la forma antes descrita. A continuación, se efectuó la lisis de los GRC con cloruro de amonio 0.83% y se realizó otro lavado para determinar nuevamente la viabilidad celular.

Los macrófagos (M/Ø) fueron obtenidos, a partir de las células no-T (CNT) que permanecieron en la fase intermedia del gradiente de F/H, en la forma siguiente:

Las CNT a una concentración de 5×10^6 por ml se resuspendieron en medio RPMI 1640 y 20% de suero fetal de ternera, en una caja de Petri, incubándose inmediatamente a

37°C, con 5% de CO₂ y humedad, durante una hora. Al término de ese tiempo, las células no-adherentes fueron succionadas con una pipeta Pasteur y eliminadas del estudio. Las células adherentes (M/Ø) se obtuvieron raspándolas con una espátula de caucho, para luego lavarlas una vez en la forma acostumbrada y evaluar finalmente su viabilidad.

Los M/Ø se utilizaron en todos los cultivos, para lograr una respuesta óptima de los linfocitos; ya que está demostrado que la presencia de dichas células mejora la respuesta de proliferación de los linfocitos, tanto en la reacción de leucocitos mixtos (MLR) (128) como en la exposición a mitógenos (129).

A partir de las células T se obtuvieron las subpoblaciones CD4+ y CD8+ por selección negativa con anticuerpos monoclonales OKT4 y OKT8 (Ortho Pharmaceutical Corp., Raritan, NJ) y complemento (C').

Las células T se dividieron en tres alícuotas, cada una de ellas fue centrifugada a 1200 rpm por 10 min, se les retiró el sobrenadante y después a una alícuota se le agregó el anticuerpo monoclonal OKT4, a la siguiente el OKT8 y a la última SSF. Las células contenidas en la alícuota no expuesta a los anticuerpos monoclonales, sirvieron de comparación y fueron denominadas en el presente trabajo como células

las T totales (Tt). Las tres alícuotas de células T, procesadas tal como acaba de describirse, fueron incubadas en hielo, por 30 min. A continuación se realizó en cada una un lavado con SSF a 4°C e inmediatamente se les agregó el C' de conejo diluido 1:4 con medio de cultivo. En esas condiciones se incubó nuevamente a 37°C también por 30 min. Finalmente, las células fueron lavadas con SSF y se determinó la viabilidad celular.

C. Procedimientos para los cultivos celulares

De cada individuo y para cada población celular estudiada se realizaron cultivos en la forma siguiente:

Se sembraron por duplicado para cada intervalo horario, 1×10^6 células en un volumen final de 1 ml con medio RPMI 1640 conteniendo 10% de suero fetal de ternera, antibióticos, 50 μ l de PHA-M, 10% de M/Ø y BrdU a una concentración final de 15.5 μ M. Los cultivos fueron incubados a 37° C en una atmósfera de 5% de CO₂ y humedad controlada, en la oscuridad.

D. Procedimientos citogenéticos

Las muestras de cada cultivo celular fueron cosechadas a partir de las 54 h hasta las 102 h, con intervalos consecutivos de 12 h. A cada uno de ellos se les agregó --

100 μ l de una solución de colchicina de 0.2 mg/ml una hora y media antes de completar el tiempo estipulado. Las células fueron cosechadas por centrifugación, para luego resuspenderlas en KCl 0.075 M por 20 min y posteriormente fijarse en metanol/ácido acético glacial (3:1) por 30 min. Después de dos lavados con el mismo tipo de fijador, las preparaciones se colocaron en portaobjetos por medio de goteo y se secaron al aire.

Todas las muestras de cada una de las poblaciones celulares fueron codificadas y analizadas en forma ciega por un solo observador.

Las preparaciones cromosómicas se trataron para la tinción diferencial de las cromátidas, por la técnica FPG de Perry y Wolff (29), con mínimas modificaciones. Las laminillas con las preparaciones cromosómicas fueron puestas en contacto con una solución 0.5 μ g/ml de Hoechst 33258 durante 20 min y luego lavadas con agua corriente. Las laminillas fueron montadas con buffer de Sorensen pH 6.8, para inmediatamente después exponerlas a la luz negra durante 2 h. Luego, se lavaron con agua corriente, se secaron y por último, se tiñeron con colorante Giemsa, en una proporción de 1 a 10 en buffer Sorensen, durante 75 segundos.

Para determinar la frecuencia de ICH se contaron los intercambios en 50 metafases de cada población celular --

por individuo. Obteniendo de esta manera el número de ICH por célula y el promedio por población y por individuo.

Para determinar la cinética celular en cada una de las poblaciones y para cada individuo, en 100 metafases consecutivas se contaron las proporciones de primera, segunda o tercera división de cada intervalo horario. La clasificación de dichas metafases fue de acuerdo a su patrón de tinción: metafase de primera división cuando ambas cromátidas se observaron de color oscuro; metafase de segunda división cuando una cromátida se teñía oscuro y la otra pálida; metafase de tercera o subsecuentes divisiones cuando un cuarto o menos de sus cromátidas se teñían de oscuro, tales como puede observarse en la figura 3.

E. Métodos estadísticos

El cálculo del tamaño de la muestra estuvo basado - en detectar una diferencia mínima de 3 ICH entre las poblaciones celulares estudiadas, con niveles alfa de 0.01 y beta de 0.05. Ese mismo nivel alfa fue utilizado en las demás pruebas estadísticas.

De cada población celular en cada individuo se obtuvo el valor promedio (\bar{X}) y la desviación estandar (s) de los ICH por célula. La comparación de esos \bar{X} se realizó mediante la prueba F de 2 vías.

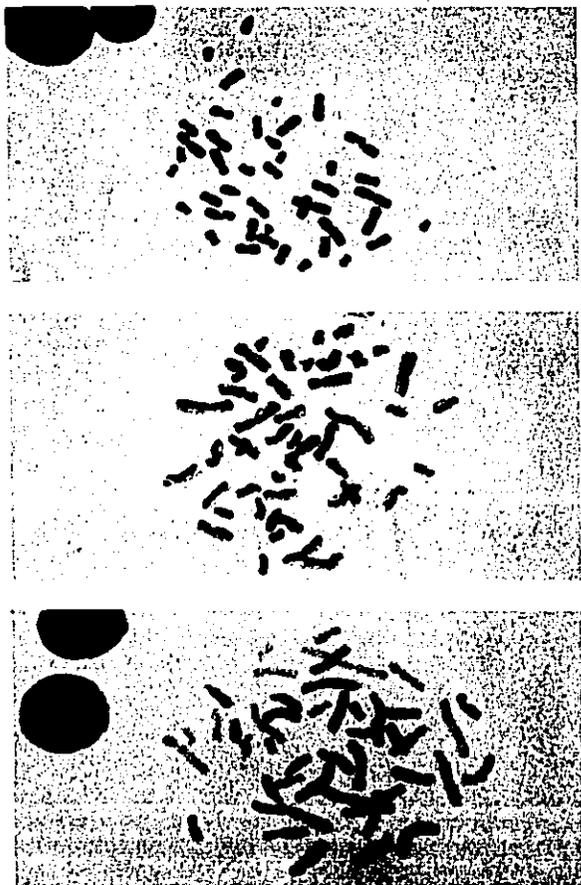


Figura 3. Metafase de primera división (arriba). Metafase de segunda división (en medio) y metafase de tercera división (abajo).

Todas las distribuciones de frecuencias de ICH/célula se compararon con la teórica de Poisson mediante la prueba de bondad de ajuste de X^2 .

Las distribuciones de ICH/célula de las distintas poblaciones estudiadas, se compararon con una prueba de X^2 para varias muestras.

Para determinar la duración del ciclo celular se consideraron las siguientes variables:

- 1) Los promedios de las proporciones de metafases correspondientes a primera, segunda, tercera y subsecuentes divisiones "in vitro" de los 4 individuos.
- 2) Cambios promedios de aproximadamente un 30 a 50% en la proporción de primera, segunda, tercera y subsecuentes divisiones "in vitro".
- 3) Lo mencionado en 1 y 2 correlacionado con los diferentes tiempos de cultivo considerados.

RESULTADOS

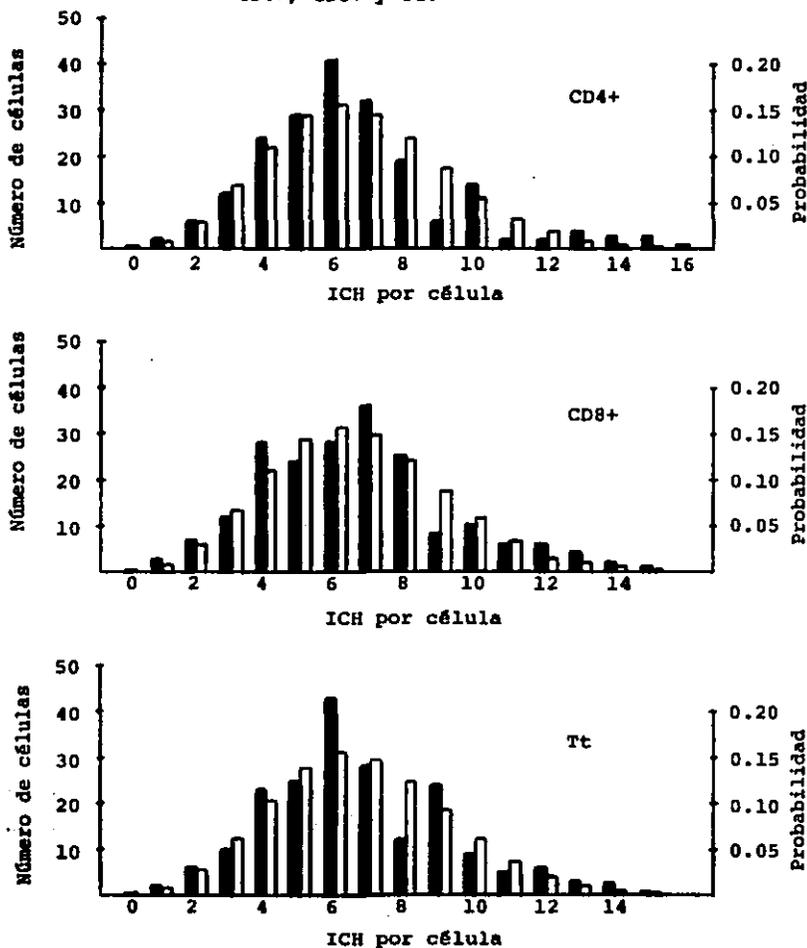
En la tabla 1 se presentan los datos correspondientes a la frecuencia de ICH/célula, observados en las distintas poblaciones de linfocitos estudiados. Los promedios y desviaciones estandar observados fueron muy semejantes tanto entre individuos como entre poblaciones. De la misma manera los promedios y desviaciones estandar ponderados de las células CD4+, CD8+ y Tt fueron muy similares, 6.54 ± 2.82 , 6.55 ± 2.78 y 6.70 ± 2.73 ICH/célula respectivamente. El análisis estadístico mediante la prueba F de 2 vías, no mostró diferencia significativa ($F_{2-6} = 0.20$ y $F_{3-6} = 2.49$ -- $p > 0.05$), entre poblaciones e individuos.

En la figura 4 se muestran las distribuciones de frecuencias encontradas, de acuerdo al número de ICH/célula en las 200 metafases analizadas, de las diferentes subpoblaciones de linfocitos de los 4 individuos estudiados (barras negras). A partir de estos datos se obtuvieron las distribuciones teóricas esperadas para una distribución de Poisson (barras blancas), para realizar la prueba de bondad de ajuste de χ^2 . La única población celular que mostró diferencia significativa fue la población de linfocitos CD4+ ($\chi^2_{12} = 41.289$ $p < 0.01$). Esta diferencia es principalmente a expensas de un exceso de linfocitos con un mayor número de ICH/célula, en particular en los intervalos correspondientes a 14, 15 y 16 ICH/célula. En efecto el 54% del valor de la

**TABLA 1. FRECUENCIA DE ICH/CELULA EN SUBPOBLACIONES DE
LINFOCITOS T Y T-TOTALES EN LOS INDIVIDUOS
ESTUDIADOS**

INDIVIDUO	TIPO DE LINFOCITOS					
	CD4 ⁺		CD8 ⁺		Tt	
	\bar{X}	s	\bar{X}	s	\bar{X}	s
1	6.76	± 3.09	6.90	± 2.79	5.98	± 1.97
2	6.18	± 2.68	6.14	± 2.89	6.46	± 2.43
3	6.36	± 2.82	6.24	± 2.73	6.80	± 3.05
4	6.86	± 2.60	6.92	± 2.59	7.56	± 3.06
TOTAL	6.54	± 2.82	6.55	± 2.78	6.70	± 2.73

Figura 4. Distribuciones de frecuencias de ICH observadas (■) y las teóricas esperadas (□) para una distribución de Poisson en linfocitos CD4+, CD8+ y Tt.



χ^2 es aportado por las diferencias en los intervalos mencionados.

Como puede verse en la misma figura 4, en las 3 -- distribuciones observadas (barras negras) se presenta una -- brusca caída en el número de células con 9 ICH/célula en las poblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+. Este mismo fenómeno ocurre en los linfocitos Tt, pero en las células con 8 ICH. Sin embargo, solo dos de las distribuciones, las de las poblaciones de linfocitos CD4+ y Tt, muestran una marcada elevación del número de células en el siguiente intervalo de las respectivas distribuciones. Este comportamiento sugiere una tendencia a distribuciones bimodales en el número de ICH/célula en dichas poblaciones.

Como el propósito de analizar posibles diferencias entre las distintas distribuciones de frecuencias de las tres poblaciones, se utilizó la prueba de χ^2 para varias muestras. El resultado de la misma ($\chi^2_{22} = 32.799$ $p > 0.05$) no mostró diferencias significativas.

En la tabla 2, se presentan los datos de las frecuencias de metafases correspondientes a primeras, segundas, terceras y subsecuentes divisiones "in vitro" observados en las diferentes poblaciones e individuos estudiados. El análisis general de los datos de esta tabla, muestra variaciones interindividuales en las proporciones de los tres tipos de -

TABLA 2. FRECUENCIAS DE 1^a, 2^a y 3^a O SUBSECUENTES DIVISIONES "IN VITRO" OBSERVADAS EN LAS DIFERENTES POBLACIONES E INDIVIDUOS

TIPO DE LINFOCITOS	INDIVIDUOS	TIEMPO DE CULTIVO (h)														
		54			66			78			90			102		
		1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a	1 ^a	2 ^a	3 ^a
CD4+	1	91	9	0	53	41	6	38	45	17	29	52	19	33	43	24
	2	100	0	0	67	30	3	52	45	3	33	42	25		ND	
	3	98	2	0	89	11	0	66	33	1	35	59	6	12	61	27
	4	61	37	2	54	42	4	37	56	7	27	60	13	18	51	31
CD8+	1		ND		64	27	9	59	28	13	12	30	58	17	20	63
	2	99	1	0	34	61	5	22	52	26	26	38	36	15	36	49
	3	99	1	0	31	68	1	23	50	27	9	60	31	9	35	56
	4	62	37	1	42	41	17	36	44	20	27	52	21	30	41	29
Tt	1	59	35	6	57	32	11	51	29	20	26	28	46	22	35	43
	2	100	0	0	50	49	1	31	53	16	20	40	40	19	34	47
	3	82	18	0	87	13	0	45	54	1	23	64	13	27	48	25
	4	55	41	4	35	54	11	30	55	15	23	49	28	19	42	39

ND = No determinado por falta de crecimiento

metafase de las células CD4+, CD8+ y Tt en cada uno de los intervalos de tiempo de cultivo.

Un análisis más detallado de lo anterior muestra - que a 54 h prácticamente es igual las proporciones de primeras y segundas divisiones en las células CD4+ y CD8+ en todos los individuos, aún cuando en el individuo 4 existe una mayor proporción de segundas divisiones. Sin embargo, esta aparente activación temprana de esas células en dicho individuo, no se mantiene en los tiempos posteriores de cultivo. Las células Tt muestran en 3 de los 4 individuos (1,3,4) a 54 h, una mayor proporción de segundas y terceras divisiones que las -- dos poblaciones mencionadas previamente.

En la figura 5, se presentan los datos correspondientes al promedio de las proporciones de primeras, segundas, -- terceras y subsecuentes divisiones "in vitro" de los 4 individuos estudiados. Como puede observarse en la misma, a 54 h - las células CD4+ y CD8+ presentan un patrón similar de respuesta, en cambio las Tt muestran una mayor proporción de metafases en su segunda y tercera división. A 66 h de cultivo se - observa una mayor proporción de segundas y terceras divisiones en las células CD8+ que en las CD4+. A 78 h existe una proporción menor de primeras, similar de segundas y mayor cantidad de terceras divisiones en las CD8+ que en las CD4+. Este mismo fenómeno se mantiene a 90 y 102 h de cultivo, con la úni

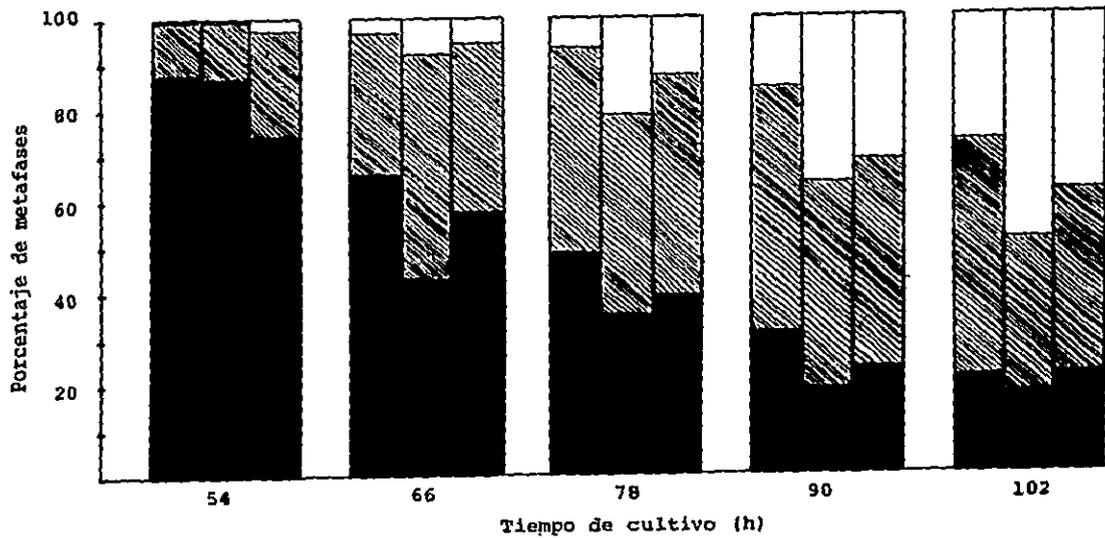


Figura 5. Proporción de metafases de primera (■), segunda (▨) y tercera y subsecuentes (□) divisiones de las células CD4+ (Izquierda), CD8+ (en medio) y Tt (derecha) en cultivo "in vitro".

ca variación de que el número de segundas divisiones como sería lógico esperar, es menor en las células CD8+ que en las CD4+.

De acuerdo con los resultados mencionados, la duración del ciclo celular para las células CD8+ se estimó en -- aproximadamente 12 h y el de las CD4+ en aproximadamente 24 h.

En relación a los datos correspondientes a los linfocitos Tt, llama la atención que con excepción de los cultivos a 54 h, en todos los demás, las proporciones de primeras, segundas, terceras y subsecuentes divisiones, corresponden -- aproximadamente al promedio de lo observado en las células -- CD4+ y CD8+. Si bien es difícil calcular la duración del ciclo celular en los linfocitos Tt, este se estimó en un punto intermedio entre las otras dos observaciones de células estudiadas; o sea de aproximadamente 18 h.

DISCUSION

Los resultados muestran que en individuos no expuestos a agentes que dañan el ADN, las células CD4+, CD8+ y Tt presentan una frecuencia muy semejante de Intercambio de Cromátidas Hermanas. Sin embargo, el hallazgo de un agrupamiento de células con mayor número de ICH en el extremo derecho de la distribución de frecuencia de los linfocitos CD4+ (figura 4), sugiere que dentro de esta subpoblación podría existir un subtipo celular con una mayor sensibilidad a la formación y/o inducción de ICH.

La tendencia a la bimodalidad descrita en las distribuciones de frecuencia de las células CD4+ y CD8+ (figura 4), puede interpretarse como otra manifestación de heterogeneidad en la formación de ICH por las células de estas subpoblaciones. En otras palabras, dentro de las CD4+ algunos de los subtipos celulares preponderantes de ayuda o inducción, podrían ser los responsables cada uno de ellos de algunos de los modos observados en la distribución. Esto mismo podría ser válido para los subtipos supresor y citotóxico presentes en las CD8+.

En conclusión, los resultados obtenidos sugieren - que la variación intercelular en el número de ICH/célula, podría en parte explicarse por la evidente heterogeneidad pro-

pia de las subpoblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+. Esta heterogeneidad observada en el presente trabajo, con la cual se intenta explicar parte de la variación intercelular de ICH, podría estar fundamentada en una diferente sensibilidad de los subtipos de las células CD4+ y CD8+ ante factores que favorecen la formación de ICH.

Si bien los propósitos del presente estudio no han sido el determinar los posibles factores propios de cada subpoblación responsables de la variabilidad observada, tal vez los mismos puedan estar relacionados con aquellos vinculados a las diferencias entre los linfocitos T y B, tales como la magnitud de la reserva de timidina y la capacidad de reparación por escisión de estas células postulada previamente (100).

Existen algunas enfermedades tales como la leucemia de células T del adulto, la leucemia de células peludas y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida, en las cuales las células CD4+ son la población blanco de los virus linfotróficos de células T humanas (HTLV) I, II, III respectivamente (130,131,132). Tal vez esto se debe a que esa población celular presenta, en forma natural, una mayor sensibilidad que las CD8+, no solamente a ciertos virus, sino también al daño inducido por diferentes agentes químicos o físicos sobre su ADN. Incluso en algunas líneas tumorales, que po-

drían considerarse como células homogéneas, existen subpoblaciones celulares con diferente sensibilidad al daño inducido por agentes químicos (133), lo que podría explicar, la resistencia de algunas neoplasias al tratamiento quimioterápico. Todas esas observaciones apoyarían las consideraciones en el sentido de que dentro de los linfocitos CD4+ y CD8+ puedan existir subtipos celulares, con una diferente sensibilidad a factores capaces de inducir ICH, responsables tal vez de la bimodalidad observada en la frecuencia de ICH/célula.

Con respecto al ciclo celular se observó, que en las condiciones de cultivo del presente trabajo, las células CD4+ presentan un ciclo celular con una duración de aproximadamente 10 a 12 h más largo que las CD8+.

La similitud en las proporciones de metafases de primeras y segundas divisiones a 54 h en los linfocitos CD4+ y CD8+ sugieren que el inicio de la fase de proliferación en dichos linfocitos es muy parecida. Sin embargo, en este mismo intervalo horario, los linfocitos Tt mostraron una mayor proporción de segundas y terceras divisiones, lo cual sugiere que estos linfocitos presentan una fase de estímulo y/o proliferación más corta que las otras dos poblaciones. Tal vez esto se deba a posibles interacciones entre las subpoblaciones que constituyen las células Tt. La duración del ciclo celular de los linfocitos Tt en un punto intermedio a la es-

timada para las células CD4+ y CD8+, resulta lógica si se -- tiene presente que los linfocitos Tt corresponden fundamen-- talmente a una mezcla de células CD4+ y CD8+.

Independientemente de la simultaneidad o no en el - inicio de la proliferación de los diferentes tipos celulares estudiados, la duración del ciclo celular en cada una de las mismas es diferente y constante.

Las variaciones interindividuales en las proporcio-- nes de los tres tipos de metafases de las células CD4+, CD8+ y Tt en cada uno de los intervalos horarios, puede deberse a dos factores: a) a una real variación interindividual y b) a factores inherentes a las condiciones de cultivo.

El hecho de que el ciclo celular sea más lento en - las células CD4+ puede ser el resultado de una interacción -- con las células inductoras de supresión que forman parte de - las mismas CD4+ (134,135). Este tipo celular puede identifi-- carse con el anticuerpo monoclonal OKT17 (136), o el WR16 -- (137). Más aún, algunas células CD4+ pueden transformarse en poblaciones con fenotipo CD8+ y adoptar la función supresora (138,139) la cual puede contribuir a retardar el ciclo celu-- lar.

Se ha considerado que la estimulación de las célu-- las T por antígeno o mitógeno, se puede dividir en dos esta--

dfos (140), los cuales se presentan en forma esquemática en la figura 2:

En el primero el mitógeno o antígeno y la interleucina 1 (IL-1) producida por los M/Ø (141,142), inducen a los linfocitos T a pasar de su periodo G_0 , a un periodo inicial de activación G_1 .

El segundo involucra a la interleucina 2 (IL-2), - producida preferentemente por la subpoblación celular $CD4+$, (143,144,145). La IL-2 permite a los linfocitos T continuar a través de la fase S del ciclo celular y para ejercer su -- efecto depende de su concentración, de la densidad de su receptor y de la duración en la interacción receptor-interleucina (146).

El ciclo celular más corto de las células $CD8+$, observado en el presente trabajo, puede ser explicado desde -- varios puntos de vista. Por una parte, las células $CD8+$, responden preferentemente a la IL-2 (143,144) y además, el re--ceptor de esta interleucina se expresa rápidamente (147). -- Por otra parte, algunas células $CD8+$ son capaces de transformarse en $CD4+$ (138,148), debido a esto podría existir una -- cantidad mayor de IL-2 disponible que la producida normalmente por las $CD8+$. Por último, debido a la función de contra-supresión de las células $CD8+$, las $CD4+$ ejercen una función

de ayuda (149) más intensa que la normal y de esta manera -- también se incrementa la concentración de IL-2 en los cultivos.

El hecho de encontrar metafases de primera división en los últimos intervalos horarios, muestra que aún en las células CD4+ y CD8+ existen tipos celulares con una respuesta muy lenta a la estimulación con PHA, tal como se ha observado en cultivos celulares con sangre total (49,50,117, 118,119).

En conclusión, los resultados del presente trabajo muestran:

- a) Que las subpoblaciones de linfocitos CD4+ y CD8+ difieren marcadamente en la duración de su ciclo celular.
- b) Que dentro de las células CD4+ y CD8+ se observa una evidente heterogeneidad en la frecuencia de ICH/célula.

De acuerdo con los hallazgos mencionados, sería -- conveniente discriminar con mayor precisión, si los resultados obtenidos en la duración del ciclo celular en cada una -- las subpoblaciones estudiadas, es la resultante de ciclos -- diferentes de los subtipos celulares que las integran. Para

confirmar esta posibilidad sería necesario estudiar por separado las células de ayuda, inductoras, supresoras y citotóxicas. De la misma manera, con el propósito de determinar si existe en realidad subtipos celulares más sensibles a la inducción de ICH dentro de las subpoblaciones de linfocitos -- CD4+ y CD8+, sería recomendable hacer estudios de exposición de los diferentes subtipos celulares mencionados a agentes - que inducen ICH.

BIBLIOGRAFIA

1. Brown G, Greaves MF (1974) Cell surface markers for human T and B lymphocytes. *Eur J Immunol* 4: 302-310.
2. Dickler HB, Adkinson NF, Terry WD (1974) Evidence for individual human peripheral blood lymphocytes bearing both B and T cell markers. *Nature* 247: 213-215.
3. Ferrarini M, Moretta L, Abrile R, Durante ML (1975) Receptors for IgG molecules on human lymphocytes forming spontaneous rosettes with sheep red cells. *Eur J Immunol* 5: 70-72.
4. Moretta L, Ferrarini M, Durante ML, Mingari MC (1975) Expression of a receptor for IgM by human T cells in vitro. *Eur J Immunol* 5: 565-569.
5. Moretta L, Webb SR, Grossi CE, Lydyard PM, Cooper MD (1977) Functional analysis of two human T-cell subpopulations: help and suppression of B-cell responses by T cells bearing receptors for IgM or IgG. *J Exp Med* 146: 184-200.
6. Köhler G, Milstein C (1975) Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497.

7. Reinherz EL, Kung PC, Goldstein G, Schlossman SF (1979) Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody. Proc Natl Acad Sci USA 76: 4061-4065.
8. Kung PC, Goldstein G, Reinherz EL, Schlossman SF (1979) Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. Science 206: 347-349.
9. Reinherz EL, Moretta L, Roper M, Breard JM, Mingari MC, Cooper MD, Schlossman SF (1980) Human T lymphocyte subpopulations defined by Fc receptors and monoclonal antibodies. J Exp Med 151: 969-974.
10. Hoffmann RA, Kung PC, Hansen WP, Goldstein G (1980) Simple and rapid measurement of human T lymphocytes and their subclasses in peripheral blood. Proc Natl Acad Sci USA 77: 4914-4917.
11. Janossy G, Prentice HG (1982) T cell subpopulations, monoclonal antibodies and their therapeutic applications. En: Clinics in Haematology. WB Saunders Company LTD, 11(3), pp 631-660.
12. Foon KA, Gale RP, Todd RF (1986) Recent advances in the immunologic classification of leukemia. Semin Hematol 23: 257-283.

13. Schwartz RH (1984) The role of gene products of the Major Histocompatibility Complex in T cell activation and cellular interactions. En: Paul WE (ed) Fundamental Immunology. Raven Press, New York, pp 379-438.
14. Kupfer A, Swain SL, Janeway CA, Singer SJ (1986) The specific direct interaction of helper T cells and antigen presenting B cells. Proc Natl Acad Sci USA 83: 6080-6083.
15. Kochman S, Bernard J, Schwartz H, Cazabat A, Thiernesse N, Lavaud F, Caulet T (1984) Failure to distinguish ultrastructurally between T4+ (Helper) and T8+ (Suppressor/Cytotoxic) T-cell subsets. Scand J Immunol 19: 165-173.
16. Cinti S, Balercia G, Canon C, Dantchev D, Mathé G (1986) T lymphocytic subpopulations of normal human peripheral blood defined by monoclonal antibodies: an ultrastructural study using immunogold staining method. Bas Appl Histochem 30: 41-52.
17. Alcocer-Varela J, Alarcon-Segovia D (1982) Decreased production of and response to interleukin-2 by cultured lymphocytes from patients with Systemic Lupus Erythematosus. J Clin Invest 69: 1388-1392.
18. Fauci AS (1983) Activation and regulation of human immune responses: implications in normal and disease states. Ann Intern Med 99: 61-75.

19. Alarcón-Segovia D (1983) Mixed connective tissue disease: a disorder of immune regulation. *Semin Arthr Rheum* 13 (Suppl 1): 114-120.
20. Goto K, Maeda S, Kano Y, Sugiyama T (1978) Factors involved in differential Giemsa-staining of sister chromatids. *Chromosoma* 66: 351-359.
21. Buys CHCM, van der Veen AY (1982) Different effects of 33258 Hoechst and DAPI in fluorescent staining of sister chromatids differentially substituted with Bromodeoxyuridine. *Histochem* 75: 169-177.
22. Kato H (1974) Spontaneous sister chromatid exchanges detected by a BUdR-labelling method. *Nature* 251: 70-72.
23. Tsuji H, Kato H (1981) Three-way differential staining of sister chromatids in M3 chromosomes. Evidence for spontaneous sister chromatid exchanges in vitro. *Exp Cell Res* 134: 433-444.
24. Geard CR (1984) Ring chromosomes and sister chromatid exchanges. En: Tice RR, Hollaender A (eds) *Sister Chromatid Exchanges, 25 years of experimental research. Part A.* Plenum Press, New York, pp 91-101.
25. Taylor JH (1958) The organization and duplication of Genetic material. En: Taylor JH (ed) *Selected papers on molecular Genetics.* Academic Press, New York (1965), pp 296-311.

26. Huang CC (1967) Induction of a high incidence of damage to the X chromosomes of *Rattus (Mastomys) natalensis* by base analogues, viruses and carcinogens. *Chromosoma* 23: 162-179.
27. Zakharov AF, Egolina NA (1972) Differential spirali- zation along mammalian mitotic chromosomes. I. BUdR- revealed differentiation in chinese hamster chromosomes. *Chromosoma* 38: 341-365.
28. Latt SA (1973) Microfluorometric detection of deoxy- ribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 70: 3395-3399.
29. Perry P, Wolff S (1974) New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 251: 156-158.
30. Latt SA, Schreck RR, D'Andrea A, Kaiser TN, Schlesinger F, Lester S, Sakai K. (1984) Detection, significance and mechanism of sister chromatid exchange formation: past experiments, current concepts, future challenges. En: Tice RR, Hollaender A (eds) *Sister Chromatid Exchanges, 25 years of experimental research. Part A.* Plenum Press, New York, pp 11-40.
31. Gutiérrez C, Hernández P, López-Sáez JF (1984) BrdUrd- independent and BrdUrd-dependent SCEs as components of SCE yields: implications for their cellular signifi- cance. En: Tice RR, Hollaender A (eds) *Sister Chromatid*

- Exchanges, 25 years of experimental research, Part A. Plenum Press, New York, pp 83-90.
32. Kronenberg M, Siu G, Hood LE, Shastri N (1986) The molecular Genetics of the T-cell antigen receptor and T-cell antigen recognition. *Ann Rev Immunol* 4: 529-591.
 33. Perry P, Evans HJ (1975) Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature* 258: 121-125.
 34. Kato H (1977) Mechanisms for sister chromatid exchanges and their relation to the production of chromosomal aberrations. *Chromosoma* 59: 179-191.
 35. Galloway SM, Wolff S (1979) The relation between chemically induced sister chromatid exchanges and chromatid breakage. *Mutation Res* 61: 297-307.
 36. Krepinsky AB, Heddle JA, German J (1979) Sensitivity of Bloom's syndrome lymphocytes to ethylmethanesulfonate. *Hum Genet* 50: 151-156.
 37. Bloom SE, Hsu TC (1975) Differential fluorescence of sister chromatids in chicken embryos exposed to 5-bromo-deoxyuridine. *Chromosoma* 51: 261-267.
 38. Allen JW, Latt SA (1976) *in vivo* BrdU-33258 Hoechst analysis of DNA replication kinetics and sister chromatid exchange formations in mouse somatic and meiotic cells. *Chromosoma* 58: 325-340.

39. Latt SA, Schreck RR, Loveday KS, Shuler CF (1979) In vitro and in vivo analysis of sister chromatid exchange. *Pharmacol Rev* 30: 501-535.
40. Lambert B, Hansson K, Lindsten J, Sten M, Werelius B (1976) Bromodeoxyuridine induced sister chromatid exchanges in human lymphocytes. *Hereditas* 83: 163-173.
41. Gebhart E, Wagner H, Behnsen H (1984) The action of anticlastogens in human lymphocyte cultures and its modification by rat liver S9 mix. I. Studies with AET and sodium fluoride. *Mutation Res* 129: 195-206.
42. Bianchi NO, Bianchi MS, Lezana EA, Zabala-Suarez JE (1977) Interespecies variation in the frequency of SCE. En: de la Chapelle, Sorsa M (eds) *Chromosomes Today* volume 6. Elsevier/North-Holland Biomedical Press, pp 307-314.
43. Schneider EL, Kram D, Nakanishi Y, Monticone RE, Tice RR, Gilman BA, Nieder ML (1979) The effect of aging on sister chromatid exchange. *Mech Ageing Dev* 9: 303-311.
44. Kanda N, Kato H (1979) In vivo sister chromatid exchange in cells of various organs of the mouse. *Chromosoma* 74: 299-305.
45. Becher R, Schmidt CG, Theis G, Hossfeld DK (1979) The rate of sister chromatid exchange in normal human bone marrow cells. *Hum Genet* 50: 213-216.

46. Morgan WF, Crossen PE (1981) Factors influencing sister chromatid exchange rate in cultured human lymphocytes. *Mutation Res* 81: 395-402.
47. Ito-Kuwa S, Aoki S (1984) Increased sister chromatid exchange in human lymphocyte cultures infected with *Mycoplasma*. *Microbiol. Immunol.* 28: 893-901.
48. Speit G, Düring R, Mehnert K (1986) Variation in the frequency of sister chromatid exchanges in repeated human lymphocyte cultures. *Hum Genet* 72: 179-181.
49. Beek B, Obe G (1979) Sister chromatid exchanges in human leukocyte chromosomes: Spontaneous and induced frequencies in early- and late-proliferating cells in vitro. *Hum Genet* 49: 51-61.
50. Giulotto E, Mottura A, Giorgi R, de Carli L, Nuzzo F (1980) Frequencies of sister chromatid exchanges in relation to cell kinetics in lymphocyte cultures. *Mutation Res* 70: 343-350.
51. Husgafvel-Pursiainen K, Sorsa M, Järventaus H, Norppa H (1984) Sister chromatid exchanges in lymphocytes of smokers in an experimental study. *Mutation Res* 138: 197-203.
52. Margolin BH, Shelby MD (1985) Sister chromatid exchanges: A reexamination of the evidence for sex and race differences in humans. *Environ Mutagen* 7 (Suppl 4): 63-72.

53. Littlefield LG, Colyer SP, Sayer AM, Dufrain RJ (1979) Sister chromatid exchanges in human lymphocytes exposed during Go to four classes of DNA damaging chemicals. Mutation Res 67: 259-269.
54. Littlefield LG, Colyer SP, DuFrain RJ (1981) Physical, chemical and biological factors affecting sister chromatid exchange induction in human lymphocytes exposed to mitomycin C prior to culture. Mutation Res 81: 377-386.
55. Latt SA (1981) Sister chromatid exchange formation. Ann Rev Genet 15: 11-55.
56. Heartlein MW, O'Neill JP, Preston RJ (1983) SCE induction is proportional to substitution in DNA for thymidine by CldU and BrdU. Mutation Res 107: 103-109.
57. Stetka DG, Carrano AV (1977) The interaction of Hoechst 33258 and BrdU substituted DNA in the formation of sister chromatid exchanges. Chromosoma 63: 21-31.
58. Crossen PE (1979) The effect of acridine compounds on sister chromatid exchange formation in cultured human lymphocytes. Mutation Res 68: 295-299.
59. Nicholas AH, Vienne M, van den Berghe H (1979) Induction of sister chromatid exchanges in cultured human cells by an organophosphorous insecticide. Malathion. Mutation Res 67: 167-172.

60. Chen HH, Hsueh JL, Sirianni SR, Huang CC (1981) Induction of sister chromatid exchanges and cell cycle delay in cultured mammalian cells treated with eight organophosphorus pesticides. *Mutation Res* 88: 307-316.
61. Larripa I, Matos E, Vinuesa ML, Salum SB (1983) Sister chromatid exchanges in a human population accidentally exposed to an organophosphorus pesticide. *Rev Brasil Genet* 4: 719-727.
62. Latt SA, Allen J, Bloom SE, Carrano A, Falke E, Kram D, Schneider E, Schreck R, Tice R, Whitfield B, Wolff S (1981) Sister chromatid exchanges: a report of the GENE-TOX program. *Mutation Res* 87: 17-62.
63. Musilova J, Michalova K, Urban J (1979) Sister chromatid exchanges and chromosomal breakage in patients treated with cytostatics. *Mutation Res* 67: 289-294.
64. Gebhart E, Windolph B, Wopfner F (1980) Chromosome studies on lymphocytes of patients under cytostatic therapy. II. Studies using the BUDR-labelling technique in cytostatic interval therapy. *Hum Genet* 56: 157-167.
65. Ohtsuru M, Ishii Y, Takai S, Higashi H, Kosaki G (1980) Sister chromatid exchanges in lymphocytes of cancer patients receiving mitomycin C treatment. *Cancer Res* 40: 477-480.

66. Singh NP, D'Ambrosio SM (1984) Sister chromatid exchange frequency and cell cycle kinetics in cancer patients treated with cytostatic drugs. En: Tice RR, Hollaender A (eds) Sister Chromatid Exchanges, 25 years of experimental research, Part B. Plenum Press, New York pp 885-893.
67. Sorsa M, Hemminki K, Vainio H (1985) Occupational exposure to anticancer drugs- Potential and real hazards. Mutation Res 154: 135-149.
68. Rosner F (1976) Acute leukemia as a delayed consequence of cancer chemotherapy. Cancer 37: 1033-1036.
69. Harris CC (1979) A delayed complication of cancer therapy -cancer. J Natl Cancer Inst 63: 275-277.
70. Lambert B, Holmberg K, Einhorn N (1984) Persistence of chromosome rearrangements in peripheral lymphocytes from patients treated with melphalan for ovarian carcinoma. Hung Genet 67: 94-98.
71. Tofilon PJ, Vines CM, Baker FL, Deen DF, Brock WA (1986) cis-Diamminedichloroplatinum (II)-induced sister chromatid exchange: an indicator of sensitivity and heterogeneity in primary human tumor cell cultures. Cancer Res 46: 6156-6159.

72. Becher R, Zimmer G, Schmidt CG (1981) Sister chromatid exchange and growth kinetics in untreated acute leukemia. *Int J Cancer* 27: 199-204.
73. Kurvink K, Bloomfield CD, Keenan KM, Levitt S, Cervenka J (1978) Sister chromatid exchange in lymphocytes from patients with malignant lymphoma. *Hum Genet* 44: 137-144.
74. Fonatsch C, Schaadt M, Diehl V (1979) Sister chromatid exchange in cell lines from malignant lymphomas (lymphoma lines). *Hum Genet* 52: 107-118.
75. Cheng W, Mulvihill JJ, Greene MH, Pickle LW, Tsai S, Whang-Peng J (1979) Sister chromatid exchanges and chromosomes in chronic myelogenous leukemia and cancer families. *Int J Cancer* 23: 8-13.
76. Shiraishi Y, Taguchi T, Kubonishi I, Taguchi H, Miyoshi I (1985) Chromosome abnormalities, sister chromatid exchanges and cell cycle analysis in phytohemagglutinin-stimulated adult T cell leukemia lymphocytes. *Cancer Genet Cytogenet* 15: 65-77.
77. Kadam PR, Advani SH, Bhisey AD (1986) Studies on sister chromatid exchanges in patients with Hodgkin's disease. *Cancer Genet Cytogenet* 22: 265-274.

78. Oikawa A, Sakai S, Horaguchi K, Sugawara R, Sato K, Tazawa J, Tohda H, Yokoyama M, Wakui A (1984) Sensitivities of peripheral lymphocytes from healthy humans and cancer patients to induction of sister chromatid exchanges by genotoxicants. En: Tice RR, Hollaender A (eds) Sister Chromatid Exchanges, 25 years of experimental research, Part B. Plenum Press, New York, pp 813-823.
79. Popescu NC, Amsbaugh SC, DiPaolo JA (1983) Human and rodent transformed cells are more sensitive to in vitro induction of SCE by N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) than normal cells. Hum Genet 63: 53-57.
80. Sandberg AA, Becher R, Gibas Z (1984) Value and significance of SCE in human leukemia and cancer. En: Tice RR, Hollaender A (eds) Sister Chromatid Exchanges, 25 years of experimental research, Part B. Plenum Press, New York, pp 825-838.
81. Tuschl H, Kovac R., Wolf A, Smolen JS (1984) SCE frequencies in lymphocytes of systemic lupus erythematosus patients. Mutation Res 128: 167-171.
82. Palmer RG, Dore CJ, Henderson L, Denman AM (1987) Sister chromatid exchange frequencies in fibroblasts and lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus. Mutation Res 177: 125-132.

83. Chaganti RSK, Schonberg S, German J (1974) A manyfold increase in sister chromatid exchanges in Bloom's syndrome lymphocytes. Proc Nat Acad Sci USA 71: 4508-4512.
84. Wolff S, Rodin B, Cleaver JE (1977) Sister chromatid exchanges induced by mutagenic carcinogens in normal and Xeroderma pigmentosum cells. Nature 265: 347-349.
85. Bartram CR, Koske-Westphal T, Passarge E (1976) Chromatid exchanges in ataxia telangiectasia, Bloom syndrome, Werner syndrome and xeroderma pigmentosum. Ann Hum Genet 40: 79-86.
86. Dutrillaux B, Fosse AM, Prieur M, Lejeune J (1974) Analyse des échanges de chromatides dans les cellules somatiques humaines. Chromosoma 48: 327-340.
87. Galloway SM, Evans HJ (1975) Sister chromatid exchange in human chromosomes from normal individuals and patients with ataxia telangiectasia. Cytogenet Cell Genet 15: 17-29.
88. Evans HJ (1977) What are sister chromatid exchanges ? En: de la Chapelle, Sorsa M (eds) Chromosome Today's volume 6 Elsevier/North-Holland Biomedical Press, pp 315-326.

89. Latt SA (1974) Localization of sister chromatid exchanges in human chromosomes. *Science* 185: 74-76.
90. Morgan WF, Crossen PE (1977) The frequency and distribution of sister chromatid exchanges in human chromosomes. *Hum Genet* 38: 271-278.
91. Sumner AT, (1982) The nature and mechanisms of chromosome banding. *Cancer Genet Cytogenet* 6: 59-87.
92. Carrano AV, Wolff S (1975) Distribution of sister chromatid exchanges in the euchromatin and heterochromatin of the Indian muntjac. *Chromosoma* 53: 361-369.
93. Hsu TC, Pathak S (1976) Differential rate of sister chromatid exchanges between euchromatin and heterochromatin. *Chromosoma* 58: 269-273.
94. Schubert I, Rieger R (1981) Sister chromatid exchanges and heterochromatin. *Hum Genet* 57: 119-130.
95. Bender MA, Brewen JG (1969) Factors influencing chromosome aberration yields in the human peripheral leukocyte system. *Mutation Res* 8: 383-399.
96. Beek B, Obe G (1974) The human leukocyte test system. II. Different sensitivities of sub-populations to a chemical mutagen. *Mutation Res* 24: 395-398.

97. Snope AJ, Rary JM (1979) Cell cycle duration and sister chromatid exchange frequency in cultured human lymphocytes. *Mutation Res* 63: 345-349.
98. Santesson B, Lindahl-Kiessling K, Mattson A (1979) SCE in B and T lymphocytes. Possible implications for Bloom's syndrome. *Clin Genet* 16: 133-135.
99. Lindblad A, Lambert B (1981) Relation between sister chromatid exchange, cell proliferation and proportion of B and T cells in human lymphocyte cultures. *Hum Genet* 57: 31-34.
100. Miller K (1986) Sister chromatid exchange in highly purified human B and T lymphocytes. *Hum Genet* 72: 160-163.
101. Steffen JA, Swierkowska K, Michalowski A, Kling E, Nowakowska A (1978) In vitro kinetics of human lymphocytes activated by mitogens. In: Evans HJ, Lloyd DC (eds) *Mutagen-Induced chromosome damage in man*. New Haven Yale University, pp 89-107.
102. Benacerraf B, Unanue ER (1979) *Textbook of Immunology*. The Williams & Wilkins Company, pp 96-97.
103. Pardee AB, Dubrow R, Hamlin JL, Kletzien RF (1978) Animal cell cycle. *Ann Rev Biochem* 47: 715-750.

104. Marcus M, Fainsod A, Diamond G (1985) The Genetic analysis of mammalian cell cycle mutants. *Ann Rev Genetics* 19: 389-421.
105. Varesio L, Holden HT (1980) Mechanisms of lymphocyte activation: linkage between early protein synthesis and late lymphocyte proliferation. *J Immunol* 124: 2288-2294.
106. Lloyd D, Poole RK, Edwards SW (1982) The cell division cycle, temporal organization and control of cellular growth and reproduction. Academic Press Inc, pp 402-415.
107. Means AR, Tash JS, Chafouleas JG (1982) Physiological implications of the presence, distribution and regulation of calmodulin in eukaryotic cells. *Physiol Rev* 62: 1-39.
108. Ashman RF (1984) Lymphocyte activation. En: Paul WE (ed) *Fundamental Immunology*. Raven Press, New York, pp 267-300.
109. Kaever V, Resch K (1985) Are cyclic nucleotides involved in the initiation of mitogenic activation of human lymphocytes ?. *Biochim Biophys Acta* 846: 216-225.
110. Andreeff M (1986) Cell kinetics of leukemia. *Semin Hematol* 23: 300-314.

111. Lajtha LG, Oliver R, Gurney CW (1962) Kinetic model of a bone-marrow stem-cell population. Brit J Haemat 8: 442-460.
112. Epifanova OI, Polunovsky VA (1986) Cell cycle controls in higher eukaryotic cells: Resting state or a prolonged G1 period ?. J Theor Biol 120: 467-477.
113. Waithe WI, Renaud J, Nadeau P, Pallotta D (1983) Histone synthesis by lymphocytes in G0 and G1. Biochemistry 22: 1778-1783.
114. Matsui Y, Shapiro HM, Sheehy MJ, Christenson L, Staunton DE, Eynon EE, Yunis EJ (1986) Differential expression of T cell differentiation antigens and major histocompatibility antigens on activated T cells during the cell cycle. Eur J Immunol 16: 248-251.
115. Delegeane AM, Lee AS (1982) Coupling of histone and DNA synthesis in the somatic cell cycle. Science 215: 79-81.
116. Olins DE (1977) Internal and higher order structure of chromatin nu bodies. En: Sparkes RS, Comings DE, Fox CF (eds) Molecular human Cytogenetics. Academic Press Inc, pp 1-16.
117. Mutchinick O, Ruz L, Casas L (1980) Time of first-generation metaphases. I. The effect of various culture media and of fetal calf serum in human lymphocyte cultures. Mutation Res 72: 127-134.

118. Wolff S, Afzal V, Lindquist PB (1984) Cultured human lymphocytes proliferate faster in medium lacking fetal calf serum and antibiotics. *Mutation Res* 129: 207-213.
119. Auf der Maur P, Berlincourt-Bohni K (1979) Human lymphocyte cell cycle: studies with the use of BrUdR. *Hum Genet* 49: 209-215.
120. Taylor IW, Hodson PJ (1984) Cell cycle regulation by environmental pH. *J Cell Physiol* 121: 517-525.
121. Gerson DF (1982) The relation between intracellular pH and DNA synthesis rate in proliferating lymphocytes. En: Nuccitelli R, Deamer DW (eds) *Intracellular pH: its measurement, regulation and utilization in cellular functions*. Alan R Liss, New York, pp 375-383.
122. Gerson DF, Kiefer H (1983) Intracellular pH and the cell cycle of mitogen-stimulated murine lymphocytes. *J Cell Physiol* 114: 132-136.
123. Mutchinick O, Ruz L, Gonsebatt ME, Mauleón P, Lisker R, Garcia G (1981) Frequency and types of induced and spontaneous chromosome aberrations in relation to cell kinetics. *Hum Genet* 59: 137-140.
124. Becher R, Schmidt CG, Sandberg AA (1984) SCE and cell cycle studies in leukemia. En: Tice RR, Hollaender A (eds) *Sister Chromatid Exchanges, 25 years of experimental research*. Part B. Plenum Press, New York, pp 839-853.

125. Nagel JE, Chrest FJ, Adler WH (1981) Enumeration of T lymphocyte subsets by monoclonal antibodies in young and aged humans. *J Immunol* 127: 2086-2088.
126. Nagel JE, Chrest FJ, Pyle RS, Adler WH (1983) Monoclonal antibody analysis of T-lymphocyte subsets in young and aged adults. *Immunol Commun* 12: 223-237.
127. Thomas Y, Sosman J, Irigoyen O, Friedman SM, Kung PC, Goldstein G, Chess L (1980) Functional analysis of human T cell subsets defined by monoclonal antibodies. I. Collaborative T-T interactions in the immunoregulation of B cell differentiation. *J Immunol* 125: 2402-2408.
128. Beale MG, MacDermott RP, Stacey MC, Nash GS, Hahn BH, Seiden MV, Burkholder SL, Pletscher LS (1980) Stimulating cell types in the autologous mixed leukocyte reaction in man. *J Immunol* 124: 227-232.
129. Maizel AL, Mehta SR, Hautt S, Franzini D, Lachman LB, Ford RJ (1981) Human T lymphocyte/monocyte interaction in response to lectin: kinetics of entry into the S-phase. *J Immunol* 127: 1058-1064.
130. Kalyanaraman VS, Sarngadharan MG, Robert-Guroff M, Miyoshi I, Blayney D, Golde D, Gallo RC (1982) A new subtype of human T cell leukemia virus (HTLV II) associated with a T cell variant of hairy cell leukemia. *Science* 218: 571-573.

131. Klatzmann D, Barré-Sinoussi F, Nugeyre MT, Dauguet C, Vilmer E, Griscelli C, Brun-Vezinet F, Rouzioux C, Gluckman JC, Chermann JC, Montagnier L (1984) . Selective tropism of lymphadenopathy associated virus (LAV) for helper-inducer T lymphocytes. *Science* 225: 59-63.
132. Kuefler PR, Bunn PA (1986) Adult T cell leukaemia/lymphoma. *Clin Haematol* 15: 695-726.
133. Deen DF, Kendall LE, Marton LJ, Tofilon PJ (1986) Prediction of human tumor cell chemosensitivity using the sister chromatid exchange assay. *Cancer Res* 46: 1599-1602.
134. Thomas Y, Rogozinski L, Irigoyen OH, Friedman SM, Kung PC, Goldstein G, Chess L (1981) Functional analysis of human T cell subsets defined by monoclonal antibodies. IV. Induction of suppressor cells within the OKT4+ population. *J Exp Med* 154: 459-467.
135. Clement LT, Dagg MK, Lehmeier JE, Kiyotaki M (1983) Two phenotypically distinct suppressor T cell subpopulations inhibit the induction of B cell differentiation by phytohemagglutinin. *J Immunol* 131: 1214-1217.
136. Thomas Y, Rogozinski L, Irigoyen OH, Shen HH, Talle MA, Goldstein G, Chess L (1982) Functional analysis of human T cell subsets defined by monoclonal antibodies. V. Suppressor cells within the activated OKT4+ population belong to a distinct subset. *J Immunol* 128: 1386-1390.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA 69

137. Moore K, Nesbitt AM (1987) Functional heterogeneity of CD4+ T lymphocytes: two subpopulations with counteracting immunoregulatory functions identified with the monoclonal antibodies WR16 and WR19. *Immunology* 61: 159-165.
138. Zagury D, Bernard J, Morgan DA, Fouchard M, Feldman M (1983) Phenotypic diversity within clones of human normal T cells. *Int J Cancer* 31: 705-710.
139. Farcet JP, Gourdin MF, Calvo C, Oudrhiri N, Divine M, Bouguet J, Fradelizzi D, Senik A, Reyes F (1985) A subset of OKT4+ peripheral T cells can generate colonies containing mixed progeny with OKT4+ helper and OKT8+ suppressor cells. *Eur J Immunol* 15: 1067-1073.
140. Klaus GGB, Hawrylowicz CM (1984) Cell cycle control in lymphocyte stimulation. *Immunol Today* 5: 15-19.
141. Chu E, Rosenwasser LJ, Dinarello CA, Lareau M, Geha RS (1984) Role of interleukin 1 in antigen-specific T cell proliferation. *J Immunol* 132: 1311-1316.
142. Oppenheim JJ, Kovacs EJ, Matsushima K, Durum SK (1986) There is more than one interleukin 1. *Immunol Today* 7: 45-56.
143. Solbach W, Barth S, Röllinghoff M, Wagner H (1982) Interactions of human T cell subsets during the induction of cytotoxic T lymphocytes: the role of interleukins. *Clin Exp Immunol* 49: 167-175.

144. Fishbein E, Alcocer-Varela J, Alarcón Segovia D (1983) Cellular bases of the production of and response to interleukin-2 in man: role of autologous rosette-forming T cell subsets defined with monoclonal antibodies. *Immunology* 50: 223-227.
145. Maino VC, Watson KA (1986) Analysis of IL-2 producing subsets of human lymphocytes. *Lymphokine Res* 5 (supp 1): 61-66.
146. Smith KA (1984) Interleukin 2. *Ann Rev Immuno* 2: 319-333.
147. Greene WC, Leonard WJ (1986) The human interleukin-2 receptor. *Ann Rev Immunol* 4: 69-95.
148. Burns GF, Battye FL, Goldstein G (1982) Surface antigen changes occurring in short-term cultures of activated human T lymphocytes: analysis by flow cytometry. *Cell Immunol* 71: 12-26.
149. Lehner T (1986) Antigen presenting, contrasuppressor human T cells. *Immunol Today* 7: 87-92.