

71  
203

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE  
MEXICO**

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**COMPORTAMIENTO DE POBLACIONES  
CELULARES EN CONDICIONES DE CULTIVO  
I. EFECTO DE FITOHEMAGLUTININA Y  
ESTRADIOL EN TIMOCITOS DE CONEJO**

**TESIS PROFESIONAL**

Para obtener el título de

**BIOLOGA**

presenta

**Flora Itzel García Formentí Mansilla**

México, D.F.

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 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. RESUMEN

## II. INTRODUCCION

1. Poblaciones
  - 1.1 Comportamiento S y J
2. Linfocitos
3. Ciclo Celular
  - 3.1 Interfase
  - 3.2 Mitosis
4. Lectinas
5. Hormonas y Sistema Inmune
6. Antecedentes del Trabajo
7. Objetivo
8. Hipótesis

## III. MATERIALES Y METODOS

1. Cultivo de Linfocitos
  - 1.1 Aislamiento y Siembra
  - 1.2 Cosecha
    - 1.2.1 Incorporación de  $^3\text{H}$  Timidina
    - 1.2.2 Producción de Figuras Mitóticas
      - 1.2.3 Determinación de Viabilidad Celular
2. Tratamiento de los Datos
  - 2.1 Medidas Centrales y de Dispersión
  - 2.2 Pruebas de Significancia

## IV. RESULTADOS

1. Incorporación de  $^3\text{H}$  Timidina
2. Producción de Figuras Mitóticas
3. Determinación de Viabilidad Celular
4. Interacción de los Resultados

## V. DISCUSION Y CONCLUSIONES

## VI. REFERENCIAS

## I. RESUMEN

Con base en la relación que existe entre el sistema inmune y las hormonas esteroides y los reportes del efecto de éstas en cultivos de sangre periférica se utilizaron timocitos aislados de conejo en cultivos. El objetivo fue conocer el comportamiento de estas células en presencia de fitohemaglutinina, estradiol y de ambas sustancias juntas. Para el control se determinó el comportamiento de la población en cultivo sin fitohemaglutinina (tratamiento A). Se probó el efecto de la fitohemaglutinina (tratamiento B) al 0.1%, del estradiol (tratamiento C) en una concentración de 75 pg/ml y de la fitohemaglutinina y la hormona juntas en las concentraciones antes mencionada (tratamiento D). Se evaluó el comportamiento de la población mediante los parámetros de incorporación de  $^3\text{H}$  timidina, producción de figuras mitóticas y determinación de viabilidad por exclusión de azul tripán. Se cosechó dos horas después de la siembra (día 0) y posteriormente cada veinticuatro horas.

En los cuatro tratamientos se encontró un aumento de incorporación de  $^3\text{H}$  timidina en el día 1 y posteriormente una disminución. En la mayoría de los casos estos cambios son significativos entre un tratamiento y otro, y entre los diferentes días de cultivo.

En el parámetro de figuras mitóticas aumentó el número de éstas en los días 1 y 2 para el control y 3 y 6 para el tratamiento con fitohemaglutinina. En los tratamientos con la hormona sólo se encontraron profases, no se registraron metafases y desde el día 4 no se encontraron figuras mitóticas.

En cuanto a la viabilidad celular se encontró que el número de células vivas disminuyó progresivamente en los cuatro tratamientos. En el tratamiento B, el número total de células se mantuvo, pero no así la viabilidad. En los tratamientos con la hormona disminuyó el número total de células, pero hubo una mayor proporción de células vivas.

En conclusión, la fitohemaglutinina y el estradiol influyen en el comportamiento de timocitos aislados de conejo. La fitohemaglutinina estimula la incorporación desde el día 2 y; en los días 3 y 6 la producción de figuras mitóticas, en cambio reduce la viabilidad celular. El estradiol inhibe los parámetros de incorporación de  $^3\text{H}$  timidina y la producción de figuras mitóticas, pero no afecta la viabilidad celular. Este suprime el efecto de la fitohemaglutinina en la incorporación de timidina tritiada cuando se encuentran ambas sustancias juntas y solamente se observa el efecto combinado que es de disminución en el día 1. En el parámetro de viabilidad celular se registraron efectos contrarios donde la hormona la mantiene y la fitohemaglutinina la reduce. Cuando se encuentran juntas se observa el efecto intermedio de ambas sustancias.

## II. INTRODUCCION

Debido a la relación que existe entre el sistema inmune y las hormonas esteroides (Grossman, 1985) se probó el efecto del estradiol en cultivos de timocitos de conejo. El estradiol interviene en la regulación de los ciclos reproductores de los animales. Se determinó el comportamiento de estas células en presencia y ausencia de una lectina, la fitohemaglutinina. Esta es una proteína que induce la diferenciación y la división de los linfocitos en cultivo los cuales ya estimulados entran a la fase S del ciclo celular y posteriormente se dividen. Los timocitos son células que provienen de linfocitos progenitores unipotentes que se migran hacia el timo donde maduran. Este es un órgano que forma parte del sistema linfoide.

A continuación se discuten los conceptos de población, linfocitos, ciclo celular, lectinas y hormonas que son antecedentes necesarios para la elaboración del presente trabajo.

### 1. Poblaciones

Según Dobzhansky y colaboradores (1977), una población es un conjunto de individuos de la misma especie que ocupan un espacio definido. En los organismos unicelulares cada célula es un individuo. Se puede considerar a cada timocito como un individuo y a su conjunto como un modelo de una población. Esto permite el estudio de algunas características de las poblaciones *in vitro*.

Las poblaciones son dinámicas. Cambian constantemente debido a la interacción que existe entre los organismos y el medio (Smith, 1980) donde hay factores como: la luz, la temperatura, el pH y la presencia de nutrientes; que afectan la sobrevivencia, la tasa de reproducción y el desarrollo en forma directa o través de efectos sobre la capacidad de competencia, la resistencia a enfermedades o al parasitismo (Krebs, 1978). Carrel (1931) considera que las células de un tejido están en continuidad fisiológica con su ambiente, con el

cual forman un todo. Posteriormente Smith (1980) define a una población como un componente del ecosistema a través del cual existe un flujo de energía y nutrientes. En un cultivo celular hay un intercambio entre el medio y las células. El primero proporciona nutrientes a las células y éstas, a su vez, influyen en el medio al tomarlos y excretar metabolitos con lo que el medio cambia, lo cual repercute en el comportamiento de las células y en el número de individuos.

### 1.1 Comportamiento S y J

Las poblaciones se caracterizan por su densidad que es el número de organismos que ocupa una unidad de espacio definido. Este número se incrementa mediante la reproducción y la inmigración. Se reduce con la muerte y la emigración.

Existen dos tipos de crecimiento en las poblaciones: el exponencial y el logístico. En el primer caso la población aumenta en forma geométrica. Cuando se introduce en un medio ilimitado donde puede crecer hasta sobrepasar la capacidad de carga del medio que es el número máximo de individuos que se puede mantener en un hábitat dado. Al llegar a este punto, la población decrece abruptamente debido a enfermedades, hambre o emigración. Después de esto, la población se puede recuperar y mantener en un nivel bajo, volver a incrementar exponencialmente o extinguirse. Este tipo de crecimiento se caracteriza por una curva en forma de **J**. En el crecimiento logístico existe, en cambio, un efecto negativo simultáneo y dependiente del incremento de individuos en la población. Esta crece hasta llegar a la capacidad de carga. La curva que se obtiene en dicho crecimiento es de tipo **S** o sigmoideo (Smith, 1980).

Ongay - Larios (1978) con la utilización del parámetro de incorporación de timidina tritiada reporta que la población de linfocitos de sangre periférica de humano en cultivo crece rápidamente en los primeros cuatro días, presenta el máximo entre los días 4 y 5, y decrece hasta hacerse de casi cero en el día 14; comportamiento que se asemeja al tipo logístico.

Castro - Rodríguez (1983) estudió los parámetros de incorporación de timidina tritiada, producción de figuras mitóticas y viabilidad celular en poblaciones de linfocitos de sangre periférica de humano en cultivo durante quince días. Reporta que la población en los dos primeros días de incubación presenta una fase de adaptación o fase lag; entre los días 3 y 5 se observa un crecimiento logarítmico, entre los días 5 y 9 el número de células permanece constante y posteriormente decrece. Al igual que en el caso anterior, esta población presenta un comportamiento de tipo logístico. Con estos antecedentes se podría esperar un comportamiento semejante de la población en fitohemaglutinina utilizada en este trabajo por tratarse de células linfoides bajo condiciones semejantes de cultivo.

## 2. Linfocitos

En este trabajo se manejaron poblaciones de timocitos, células originadas a partir de elementos del sistema inmune llamados progenitores unipotentes de linfocitos.

El origen de los linfocitos T y B como el de otras células sanguíneas se puede rastrear desde el saco vitelino durante el desarrollo embrionario. A partir del saco vitelino, se dirigen hacia el hígado y la médula ósea desde donde forman corrientes de migración hacia los otros órganos hematopoiéticos donde se establecen como células pluripotentes que se duplican y dan origen a los progenitores unipotentes de los granulocitos y los monocitos, de eritrocitos, de los megacariocitos y de los linfocitos. Los progenitores unipotentes de estos últimos se establecen en médula ósea y dan origen a linfocitos cuya diferenciación en T y B depende del órgano donde maduran. Los dos tipos se pueden distinguir bioquímicamente mediante marcadores de superficie (Ling y Kay, 1975) (Fig. 1).

Los linfocitos B alcanzan su madurez en órganos linfoides diferentes del timo. Este tipo es el que produce las inmunoglobulinas (Cline, 1975) o anticuerpos después de entrar en contacto con el antígeno, recibir señales que provienen de linfocitos T, crecer, multiplicarse y diferenciarse

en células plasmáticas (Lerner y Dixon, 1973) (Laurence, 1985).

Los linfocitos T maduran en el timo que se localiza en el mediastino anterior a los vasos principales del corazón. El timo es un órgano bilobulado rodeado por una cápsula de tejido conjuntivo que se extiende y forma septos que dividen a los lóbulos en lobulillos. En cada lobulillo se distingue una región central o médula y una región externa o corteza. En la corteza las células se encuentran más concentradas que en la médula. En la primera están presentes las células progenitoras que proliferan y conforme maduran se dirigen hacia la médula donde ya son inmunocompetentes (Kessel y Kardon, 1979). El timo tiene una gran importancia en el desarrollo de la respuesta inmune. Esto se observó en experimentos hechos con roedores timectomizados durante el período prenatal. En estos animales se observaron defectos como la susceptibilidad a infecciones y la carencia de linfocitos T en la sangre, en los nódulos linfáticos y en el bazo. En adultos se vió que estos efectos no eran inmediatos, sino que se manifestaban varios meses después (Schulof y col., 1981).

El timo tiene influencia sobre otros órganos linfoides mediante timosinas, productos de naturaleza polipeptídica responsables del equilibrio inmune que este órgano vierte a la sangre (Sell y Miller, 1981).

En el timo de los conejos se encuentran células de memoria después de los cuatro meses de inmunizados y éstas aumentan conforme pasa el tiempo (Richter y col., 1986). Con esto la respuesta inmune a ese antígeno es más rápida.

El timo es esencial para la maduración normal de los linfocitos T de todas las subclases existentes que incluyen a los T4 y a los T8. Estos se distinguen por sus funciones, los marcadores de membrana y la forma de reconocimiento del antígeno. Entre los T4 están los inductores y los ayudadores. Los primeros estimulan la diferenciación de los otros tipos de linfocitos T a partir de un precursor. Los ayudadores son necesarios para la respuesta de la mayoría de los linfocitos B (Laurence, 1985) (Marrack y Kappler, 1986).

Los linfocitos T8 se clasifican en citotóxicos y supresores. Los citotóxicos lisan la membrana plasmática de células infectadas o malignas. Los supresores detienen la respuesta inmune en proceso (Laurence, 1985).

En los organismos adultos los linfocitos migran de un órgano hematopoiético a otro a través de la sangre. Se acumulan en procesos inflamatorios donde presentan actividad inmunológica (Cline, 1975).

### 3. Ciclo Celular

En los organismos existen tres tipos de células: las que pasan continuamente por el ciclo celular como las células epiteliales, las que una vez diferenciadas nunca se vuelven a dividir como es el caso de las neuronas y las que entran a la fase de síntesis (S) del ciclo celular sólo bajo condiciones especiales como son los linfocitos ante los antígenos.

La duración del ciclo no sólo depende del tipo de célula, sino también de las condiciones del medio como son el pH, la temperatura, los nutrientes y demás factores bióticos y abióticos. A lo largo del ciclo celular se registran cambios en los niveles de proteínas, AMPc, ARN y ADN (Mazia, 1974) (fig. 2) (Hopkins, 1978).

#### 3.1 Interfase

Toda célula que se divide debe pasar por la fase S en la cual se duplica el material genético. Mediante la incorporación de un precursor marcado en esta fase se pueden reconocer las otras dos fases: G<sub>1</sub>, comprendida entre el final de la mitosis y S; y G<sub>2</sub>, situada entre S y el inicio de la mitosis. Esta última se reconoce por la condensación de los cromosomas. La duración de cada una de las fases del ciclo varía entre los diferentes tipos celulares, pero se sabe que en la mayoría de las células de los mamíferos la fase S dura entre seis y ocho horas; la fase G<sub>2</sub>, entre tres y cinco horas y la fase G<sub>1</sub> varía desde unas cuantas horas hasta varias semanas.

Para los linfocitos de sangre periférica de humanos *in vitro* se reporta una duración aproximada, de cuatro horas para G<sub>1</sub>, de nueve para S y de tres para G<sub>2</sub> + mitosis (Betancourt y col., 1978). Una célula diferenciada se encuentra en interfase en la etapa que se conoce como G<sub>1</sub> (Mazia, 1974).

### 3.2 Mitosis

Después de la interfase, la célula es capaz de dividirse. Roger y colaboradores (1972) reportan que en presencia de fitohemaglutinina entre el 70 y el 90% de los linfocitos de humano se estimulan y sintetizan ADN. Entre el 35% y 90% del material sintetizado se excreta al medio entre los días 3 y 6 de cultivo. Sólomente menos del 40% de las células se dividen. Por lo cual para conocer el número de linfocitos que en condiciones de cultivo realmente se divide, es indispensable registrar el número de figuras mitóticas producidas.

Durante la mitosis una célula normal se divide y da origen a dos células hijas con el mismo número cromosómico. La condensación y la localización de los cromosomas permite reconocer cuatro fases. En la primera o profase, en el caso de células de animales se observa la separación de los dos juegos de centriolos hacia los polos de la célula, simultáneamente se empieza a condensar la cromatina, a formar el huso y a replegar la envoltura nuclear hacia la periferia. Al final de esta fase los cromosomas se observan nítidamente y el huso está ya formado. A continuación, en metafase, los cromosomas migran hasta colocarse en la parte ecuatorial del huso. Esta fase se da por terminada cuando se observa el movimiento de las cromátidas hacia polos. Esta etapa se conoce como anafase. Finalmente la telofase se puede describir como los sucesos de profase en reversa, con la dispersión del material nuclear y la reconstitución de la envoltura nuclear (Mazia, 1953 y 1961).

#### 4. Lectinas

Los linfocitos en cultivo se estimulan mediante lectinas. Esto permite el crecimiento, la división y la diferenciación de estas células y por lo tanto se utiliza como un modelo de la respuesta inmune *in vitro*; además de ser una herramienta útil en el análisis citogenético.

Las lectinas se conocen desde principios de este siglo. Estas son proteínas que se encuentran principalmente en plantas. Se combinan con los glucolípidos y las glucoproteínas de la membrana celular. Por su habilidad para agrupar a los eritrocitos y a los linfocitos se les llama hemaglutininas y por su origen a partir de plantas, especialmente de las leguminosas, fitohemaglutininas como la que proviene de *Phaseolus vulgaris* (PHA) la cual está constituida por cuatro subunidades unidas covalentemente. También se encuentran en bacterias como *Clostridium botulini* y *Haemophilus pertussis*; en hongos del género *Amanita*; en invertebrados como *Limulus* y *Homarus* y vertebrados como en la anguila eléctrica y en los huevos de algunos peces y anfibios (Kocourek, 1986) (Goldstein y Poretz, 1986).

Las lectinas tiene propiedades biológicas. Poseen capacidad mitogénica lo que ha permitido el estudio del mecanismo por el cual un antígeno actúa sobre la superficie celular. Lectinas como la PHA disparan la producción de Interleucina-2 (IL-2) por los linfocitos T. La IL-2 desencadena el proceso de la respuesta inmune *in vitro* (Sharon, 1977). Otras lectinas como la concanavalina A inducen a la actividad de las células supresoras capaces de inhibir la función de los linfocitos T y B en sangre de humano *in vitro* y en pacientes inmunodeficientes. Las lectinas se utilizan para el reconocimiento de grupos sanguíneos y para el conocimiento de la superficie celular (Lis y Sharon, 1986).

Mediante el uso de lectinas, Ranelletti y sus colaboradores (1986) encontraron dos poblaciones de timocitos: una que responde a PHA y otra que no lo hace. Papiernik y Jacobson en ese mismo año encontraron que la población de timocitos de la médula de los lobulillos

responde a la Concanavalina A, en cambio la de la corteza no.

## 5. Hormonas y Sistema Inmune

Las hormonas son mensajeros químicos que permiten la comunicación entre los diferentes órganos, regulan las actividades fisiológicas y metabólicas de los tejidos. Son parte del sistema neuroendócrino regulado por el hipotálamo y su retroalimentación. El hipotálamo secreta factores de liberación que llegan a la parte anterior de la pituitaria donde provocan la liberación de hormonas específicas (Lehninger, 1978).

Las hormonas peptídicas son hidrosolubles. Otras como las hormonas esteroides son liposolubles. Las hormonas hidrosolubles se unen a receptores de superficie y producen una señal intracelular a través de segundos mensajeros como el AMPc (Sutherland, 1972). Las hormonas esteroides entran a la célula por difusión simple al atravesar la membrana celular. Se unen a su receptor en el citoplasma. Producen un cambio conformacional en éste, penetran al núcleo donde aumentan los sitios de iniciación para la transcripción (O'Malley y Schrader, 1976). En la mayoría de los casos la respuesta a hormonas esteroides se lleva a cabo en dos pasos: la respuesta primaria y la secundaria. La primaria es la inducción directa de algunos genes específicos. Los productos de éstos a su vez activan otros genes y producen una respuesta secundaria que amplifica el efecto inicial de la hormona (Alberts y col., 1983).

Entre las hormonas esteroides están las sexuales masculinas o andrógenos, las femeninas o estrógenos como el estradiol y la progesterona; y las secretadas por las glándulas adrenales o corticoesteroides. Su peso molecular es de alrededor de 300 daltones. Su estructura básica consta de un ciclo pentano - perhidro fenantreno. Difieren entre sí en la posición de las dobles ligaduras y en los sustituyentes en el carbono 17, lo cual trae consigo diferencias estructurales en las que se basa el reconocimiento por el receptor. El precursor de este tipo de hormonas es el colesterol (O'Malley y Schrader, 1976). (Fig. 3)

Los estrógenos se producen en el folículo en el ovario. Intervienen en la regulación del ciclo menstrual, los ciclos estrales y la reproducción. Conforme crece el folículo secreta estrógenos, principalmente estradiol que actúa sobre el útero. Estimula el crecimiento de las paredes y las glándulas de éste y reduce la salida de la hormona folículo-estimulante de la pituitaria por retroalimentación.

Debido a que en este trabajo se utilizaron timocitos aislados de conejos, cabe mencionar que estos animales presentan un ciclo estral no definido, aunque sí depende de variaciones estacionales y presentan un período de anestro variable. Las hembras ovulan entre diez y trece horas después del coito o después de la aplicación de hormona luteinizante o gonadotrópico- coriónica (Kraus y col., 1984)

En estos organismos, el ovario no es la única fuente de estrógenos y progesterona, sino que el embrión antes de la implantación también produce esteroides. Estas hormonas intervienen en la transformación de mórula a blastocisto, en el metabolismo del embrión antes y durante la implantación (Dickman y col., 1975).

En los humanos el estradiol se encuentra en una concentración entre 25 y 250 pg / ml de sangre (Grobstein, 1979).

En este trabajo se probó el efecto de una hormona esteroide, el estradiol, en los timocitos de conejo en cultivo debido a que este tipo de hormonas están relacionadas con el sistema inmune. Existe evidencia de que las hormonas esteroides intervienen en la regresión gradual que sufre el timo con la edad. Los estudios sobre la involución del timo comenzaron desde 1904 con Henderson (citado en Greenstein y col., 1986). Ito y Hoshino en 1962 (citado en Greenstein y col., 1986) observaron que el timo se reduce durante el embarazo. Después de la lactancia regresa a su peso normal. Se observó la regeneración del timo en ratas orquidiotomizadas hasta el punto de ser histológicamente idéntico y poseer la cantidad de linfocitos del timo de los animales jóvenes. La aplicación de testosterona inhibe la regeneración (Greenstein y col., 1986).

La respuesta inmune en los humanos se reduce durante el embarazo, aun bajo efecto de la fitohemaglutinina (Purtilo y col., 1972) o de la presencia de microorganismos muy probablemente debido al equilibrio hormonal que existe durante la preñez (Anderson, 1971) La progesterona y el estradiol ayudan a mantener el embarazo al reducir la respuesta inmune en ratones (Carter, 1976). Los estrógenos inhiben reacciones de la piel. En ratas el tratamiento con progesterona puede aumentar el tiempo de sobrevivencia de un transplante y el tratamiento con progesterona y estradiol juntos la aumentan en un treinta y tres por ciento. Además se propone que las hormonas esteroides podrían utilizarse en terapia contra ciertos tipos de cancer como la leucemia al provocar la diferenciación celular de monocitos a macrófagos y granulocitos (Sachs, 1986).

#### 6. Antecedente del Trabajo

Ostrosky-Shejet (1972) encontró una variación en el número de mitosis de linfocitos en cultivo de sangre periférica de mujer estimulados con PHA. Esta variación no se encontró en células de hombres. Esto se debe a los cambios de los niveles hormonales durante el ciclo menstrual. Se encontró que las mitosis eran muy pocas al principio del ciclo, aumentaron en la parte intermedia de éste y disminuyeron hacia el final. Posteriormente Peña-Rangel (1983) encontró que a diferentes concentraciones de estradiol y progesterona, la respuesta en linfocitos de sangre periférica de hombre en cultivo, que normalmente presenta una incorporación de timidina tritiada constante, variaba de la misma manera que los linfocitos de mujer en cultivo a lo largo del ciclo menstrual donde al principio se registró una alta incorporación de timidina tritiada la cual descendió conforme transcurrió el ciclo hasta llegar a los niveles más bajos al final de éste.

## 7. Objetivos

Este trabajo se inscribe en la investigación desarrollada en el laboratorio, la cual tiene como finalidad a largo plazo el conocimiento del comportamiento de algunas poblaciones celulares en condiciones de cultivo; en este caso, timocitos aislados de conejo.

El objetivo fue la determinación del comportamiento de los timocitos de conejo en cultivo con PHA, con estradiol y con ambas sustancias a diferentes tiempos.

## 8. Hipótesis

Con base en los antecedentes se esperaba un comportamiento de la población de timocitos con PHA semejante al determinado para linfocitos de sangre periférica de humano *in vitro* y en la población de timocitos con estradiol, una depresión en su respuesta.

### III. MATERIALES y METODOS

En este trabajo se tomaron en cuenta los parámetros de: incorporación de timidina tritiada, producción de figuras mitóticas y determinación de la viabilidad celular para conocer el comportamiento de la población de timocitos. Se utilizó la técnica de cultivo de linfocitos que se dividió en dos fases: aislamiento y siembra, y cosecha. Posteriormente se hizo el de los análisis de datos. Los cultivos realizados, el tratamiento que se les dió, el parámetro cuantificado y el día de cosecha se muestran en la Tabla I. Se utilizaron ocho conejos para completar tres series de cultivos del día 0 al 7 para el control y para el tratamiento con PHA; y del 0 al 3 para los tratamientos con el estradiol.

#### 1. Cultivos de linfocitos

##### 1.1 Aislamiento y Siembra

Se extrajo el timo de conejos (*Oryctolagus cuniculus*) machos, raza Nueva Zelanda blanca. El timo se disgregó sobre una laminilla de acero inoxidable con una espátula en 6 ml de medio "Lebowitz" (L-15) (Gibco). A continuación se filtró a través de una gasa estéril. Se determinó el número de células obtenidas y de ahí se tomó una alícuota que contuviera  $1,500 \times 10^6$  que se completaron a 4 ml con L-15. Esto se colocó sobre 3 ml de Ficoll-Paque (Farmacia Fine Chemicals). Se centrifugó a 2,000 rpm (626.08 g) durante 40 minutos; al cabo de los cuales se obtuvo una banda de timocitos contaminada por eritrocitos. Esta se colocó sobre otros 3 ml de Ficoll-Paque. Se centrifugó de la manera antes descrita y se obtuvo una banda de timocitos ya limpia. Esta se completó a 4 ml con L-15. Se lavó durante 10 minutos a 1,000 rpm (156.52 g). Finalmente se hizo un conteo de células recuperadas para tener una densidad aproximada de  $3 \times 10^6$  timocitos/ml de medio TC-199 (Difco). La técnica de cultivo se basa en una modificación a la microtécnica de Arakaki y Sparkes de 1963. En seguida se sembró 1 ml de la suspensión celular en frascos ampula de 10 ml, a lo cual se

denomina cultivo. Para la incorporación de timidina tritiada se sembró por triplicado.

El medio se preparó de la siguiente manera: a cada 5 ml de medio de cultivo TC-199 se agregó 1 ml de suero fetal de ternera (Difco) inactivado a 60°C durante 30 minutos, 2 gotas de heparina (Abbot 1,000 U.I./ml), 2 gotas de glutamina TC (Difco) y 2 gotas de antibiótico (estreptomocina y penicilina) (Difco). Se probaron cuatro tratamientos que se denominaron A, B, C y D. El A que se utilizó como control contenía el medio original como se describe arriba. En el tratamiento B al medio original se le agregó 0.01ml de fitohemaglutinina M al 1% (Difco) para cada cultivo; en el tratamiento C al medio original se le agregó estradiol 75 pg/ml de medio y en el tratamiento D se le agregó al medio original tanto fitohemaglutinina como estradiol en las concentraciones antes mencionadas.

Después de revisar las preparaciones para la obtención de figuras mitóticas de los tratamientos C y D y no haber encontrado prácticamente material alguno desde el día 4, se decidió no medir incorporación de timidina tritiada del día 5 al 7 de esos tratamientos.

## 1.2 Cosecha

Esta fase presenta variaciones según el parámetro de que se trate. A continuación se describe el método utilizado en cada caso.

### 1.2.1 Incorporación de $^3\text{H}$ Timidina

Previo a la fase de cosecha a los frascos de cultivo utilizados para la determinación de incorporación de timidina tritiada, se les agregó 1 uCi de metil  $^3\text{H}$  timidina (New England Nuclear 2 mCi/mmol) 17 horas antes de la cosecha con excepción de los que se cosecharon en el día 0. A éstos se les puso la timidina tritiada inmediatamente después de la siembra.

Después de la incubación con timidina tritiada se pasó el contenido de cada frasco ampula a un tubo de centrifuga de plástico de 15 ml. Se centrifugó a 1,000 rpm durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante hasta 0.5 ml. Se fijó con metanol (Baker) - ácido acético (Baker) 3 : 1 v/v hasta completar 5 ml y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. A continuación se centrifugó de la misma manera. Después se quitó el sobrenadante hasta 0.3 ml, se resuspendió añadiendo ácido tricloroacético (ATC) (Merck) al 10% hasta 5 ml y se incubó a 40<sup>0</sup>C durante una hora. Al cabo de ésta se centrifugó a 2,000 rpm durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante hasta 0.3 ml. Se agregó más ATC hasta 5 ml y se resuspendió con pipeta. Esto se pasó a través de un filtro (Millipore 0.65 um). Se agregaron otros 5 ml ATC para lavar el tubo y la columna del filtro y se pasó a través del mismo filtro el cual se colocó en un vial con 0.4 ml de dodecil sulfato de sodio (Sigma) al 2%. Los viales se incubaron durante 30 minutos a 60<sup>0</sup>C. Posteriormente se agregaron 5 ml de líquido de Bray y se leyeron en un contador de centelleo líquido (Tri-Carb 4530 Packard) durante 4 minutos.

### 1.2.2 Producción de Figuras Mitóticas

Esta técnica se basa en una modificación a la técnica de Moorhead y colaboradores (1960). Para la obtención de figuras mitóticas se agregó al cultivo 0.05 ml de una solución de Colcemid (Ciba) al 2 ug/ml, dos horas antes de la cosecha y se incubó a 37<sup>0</sup>C. Se pasó el contenido del frasco ampula a un tubo de centrifuga de vidrio de 15 ml. Se centrifugó a 1,000 rpm durante 10 minutos. Se retiró el sobrenadante hasta tener la misma cantidad de éste que del botón. Se fijó con metanol - ácido acético 3 : 1 v/v, se añadió hasta completar 5 ml y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se centrifugó de la misma manera. Se volvió a agregar fijador hasta 5 ml y se guardó en el congelador por lo menos durante 24 horas al cabo de las cuales se hicieron preparaciones por secado al aire y temperatura moderada. Se tiñeron con Giemsa (Sigma) - Leishman (Sigma) - H<sub>2</sub>O destilada 3 : 1 : 36 v/v/v. Finalmente se revisaron en su totalidad para obtener el número de figuras mitóticas y algunos de los

campos se fotografiaron en un microscopio Polivar Reichert sobre película Plus X de grano fino de Kodak.

### 1.2.3 Determinación de la Viabilidad Celular

Se hizo mediante la exclusión de azul tripán, (Sigma) (al 5% en solución salina al 85%) un colorante no vital, es decir que las células vivas no toman estos colorantes, mientras que las muertas si lo hacen (Kruse y Patterson, 1973). Se agregó 0.1 ml del colorante directamente al cultivo de donde se tomó la muestra y se contaron en la cámara de Neubauer tanto células vivas como muertas (Mishell y Shiigi, 1980).

## 2. Tratamiento de los Datos

En el tratamiento de los datos se tomaron en cuenta tanto las medidas centrales y de dispersión como pruebas estadísticas de significancia. Para comparar el efecto de cada tratamiento en los diferentes días se calculó el promedio y el error estándar para cada tratamiento. Se expresó como porcentaje del control que se consideró como 100%.

### 2.1 Medidas Centrales y de Dispersión

La medida central utilizada fue la media aritmética ( $\bar{X}$ ). Como medidas de dispersión se aplicaron la varianza ( $S^2$ ), la desviación estándar ( $S$ ), el error estándar (E.S.) (Sokal y Rohlf, 1981) y el porcentaje de error (% E) que sirve para conocer la validez de los resultados obtenidos en este tipo de cultivos. Se consideran válidos cuando el porcentaje de error es menor del 40 % del promedio entre las repeticiones (Ongay - Larios, 1978). La fórmula para obtener el porcentaje de error es la siguiente:

$$\% E = \frac{ES \times 100}{\bar{X}}$$

## 2.2 Pruebas de Significancia

Se utilizó la prueba de **t** de Gosset (Sokal y Rohlf, 1981), conocida también como de **student** para comparar los promedios y sus varianzas para determinar si existen diferencias significativas.

## IV. RESULTADOS

### 1. Incorporación de $^3\text{H}$ Timidina

Los resultados de las series de cultivos para el control (A) y los tratamientos con PHA (B), con estradiol (C) y con ambas sustancias (D) se muestran en la tabla II.

En el control se observa que en la serie I, la incorporación disminuye progresivamente. Las otras dos series presentaron un comportamiento en el cual hubo un aumento en la incorporación en el día 1 y posteriormente una reducción. A pesar de que presentan comportamientos semejantes, los niveles de incorporación de estas dos series son diferentes. Aun dentro de una serie la incorporación varía entre los diferentes conejos.

La incorporación en las series I y III del tratamiento con PHA decrece abruptamente. En la serie II, en cambio, hay un aumento en la incorporación en el día 1 y posteriormente disminuye de manera gradual.

En el tratamiento con estradiol existe un aumento de incorporación en el día 1 en las tres series. Las series I y II del tratamiento con PHA y estradiol presentan un comportamiento semejante al anterior aunque la incorporación en el día 1 es menor. En la serie III del tratamiento D hubo una disminución continua en la incorporación.

En la tabla III (Fig. 4) se presentan los promedios de los cultivos de cada tratamiento. En el control se observa un aumento significativo ( $.005 > p > .001$ ) en la incorporación en el día 1. A partir del día 2 ésta se reduce. Para el tratamiento con la PHA hay un aumento no significativo en la incorporación en el día 1. A continuación disminuye la incorporación hasta el día 4. En el día 5 hay un aumento, pero éste no es significativo.

En los tratamientos con la hormona, sin y con PHA hay un aumento significativo ( $p < .001$ ) y ( $.005 > p > .001$ ) respectivamente en el día 1. El día 2 la incorporación se reduce y

en los días 3 y 4 sólo se registró radiactividad de fondo. Entre todos los días hubo diferencias significativas.

## 2. Producción de Figuras Mitóticas

Cuando se revisaron las preparaciones se encontraron algunas figuras mitóticas que eran diferentes de la generalidad por su aspecto (Fig. 5). Estas se consideraron como figuras mitóticas con efecto de goteo (eg) En el caso de profases (peg), los cromosomas se veían aglomerados y muy condensados. En las metafases (meg) éstos se encontraban pulverizados.

En el control (A) (Tabla IV) se observa un incremento progresivo en el número total de figuras encontradas en los días 1 y 2. Posteriormente se redujo el número total de figuras mitóticas en los días 3 y 4. En el día 5 se duplicó y en los días 6 y 7 se redujo otra vez. Las profases alcanzan su máximo en el día 3 y decrecen hasta encontrarse sólo 17 en el día 7. Las metafases son pocas, en el día 1 se reducen. En el día 2 hubo un aumento. Después disminuyen de nuevo. El número de peg presenta un comportamiento semejante al de las profases pero proporcionalmente menor. Estas también presentan su máximo en el día 2. Las meg aparecen desde el día 4, el número aumentó exponencialmente hasta el día 5 y después se redujo progresivamente. El número de anafases y telofases encontradas fue mínimo y se mantuvo bajo hasta el día 4. Posteriormente éstas ya no se encontraron.

En el tratamiento con PHA (B) el mayor número total de figuras mitóticas encontrado fue en el día 0. En los días 1 y 2 fue de cerca de la mitad del día 0. El día 3 hubo un aumento aunque no alcanzó el número registrado en el día 0. Después de este día bajó, hubo un ligero aumento en el día 6 y se encontró el mínimo en el día 7. El número de profases fue mayor en el día 0. Bajó en el día 1, se incrementó de nuevo en el día 2. A partir del día 3 se redujo hasta el día 5 cuando llegó al mínimo. En los días 6 y 7 no se encontraron profases. El número de metafases en este tratamiento también fue bajo y su máximo se encontró en el día 3. El número de peg aumentó progresivamente del día 0 hasta el

día 5 cuando se encuentran más y después se redujo. Las meg se encontraron a partir del día 3 de manera irregular. En este tratamiento sólo se encontró una telofase en el día 0.

En el tratamiento con la hormona (C) se encontró el mayor número de figuras mitóticas en el día 0 y posteriormente disminuyó de manera gradual. No se encontraron figuras mitóticas a partir del día 4. El número de metafases es escaso, sólo se encontraron dos en el día 0. Las meg se registraron del día 0 al 3 y las meg del 1 al 3. Solamente se observó una telofase en el día 0 y otra en el 1.

En el tratamiento con PHA y estradiol (D), el mayor número de figuras mitóticas también se encontró en el día 0. A continuación disminuyó progresivamente. Tampoco se encontraron figuras mitóticas a partir del día 4. Se encontraron dos metafases en el día 0. Las meg se encontraron en los días 0, 1 y 2 en forma decreciente. No se encontraron otras figuras mitóticas.

Al comparar el control y el tratamiento con la PHA (Fig. 6) se ve que el número total de figuras mitóticas producido en este último es, en general, menor excepto en el día 3 y en los días 4 y 6 donde el número total de figuras mitóticas es semejante en ambos tratamientos.

Los tratamientos con la hormona se comportaron de manera semejante. En el día 0 el número total de figuras mitóticas registradas fue ligeramente mayor para el tratamiento que además tenía la lectina y a partir del día 1 el tratamiento con la hormona siempre fue mayor. Además el número encontrado siempre fue menor que el del control y el tratamiento con PHA.

### 3. Determinación de Viabilidad Celular

En este parámetro (Tabla V) se observa un comportamiento muy irregular. En general la viabilidad y el número de células en todos los tratamientos tiende a disminuir. Aunque en el tratamiento con PHA (B) se puede apreciar un

aumento en la viabilidad entre los días 2 y 3 en las tres series y en dos de ellas un aumento en el día 7.

Existen errores estándar altos debido a que las células formaban aglutinaciones especialmente en el tratamiento con la PHA. Por lo tanto al colocar la muestra en el hemocitómetro las células no quedaban distribuidas de manera homogénea lo que dificultó el conteo exacto.

#### 4. Integración de los Resultados

Los promedios de cada tratamiento en porcentaje con respecto al control (100 %) para cada parámetro se presentan en la tabla VII. En la figura 8 se presentan los tratamientos con PHA, con estradiol y con ambas sustancias.

En el día 0 el resultado del tratamiento con PHA es muy semejante al control, en cambio el de los tratamientos con estradiol y con PHA y estradiol son menores que el control ( $p < .001$ ). Entre los tratamientos con la hormona no existe diferencia significativa.

La incorporación de  $^3\text{H}$  timidina en el día 1 del tratamiento con PHA es menor que en el control ( $.02 > p > .01$ ) En los tratamientos que contienen a la hormona es progresivamente menor. Existe una diferencia entre estos dos ( $.02 > p > .01$ ). Al tomar en cuenta las diferencias que existen entre los tratamientos en este tiempo de cultivo se aprecia el efecto inhibitorio de la lectina y de la hormona sobre los timocito por separado. Cuando están juntas se suma el efecto inhibitorio de cada una.

En el día 2, la PHA tiene un efecto estimulante debido a que hubo una incorporación de timidina tritiada mayor que la del control ( $.01 > p > .001$ ). El estradiol tuvo un efecto inhibitorio ( $p < .001$ ).

En el día 3 también se observa el efecto estimulante de la lectina ( $.01 > p > .001$ ). De nuevo se presenta el efecto inhibitorio del estradiol ( $p < .001$ ) en los tratamientos con la hormona. En el día 4 el comportamiento de cada uno de los

tratamientos es muy semejante al observado en el día 3. En los días 5, 6 y 7, a pesar de que en el control sólo se registró radiactividad de fondo, en el tratamiento con PHA se obtuvo una incorporación significativa ( $p < .001$ ).

Desde el día 2 la lectina sola tiene un efecto estimulante y la hormona uno inhibitorio en la incorporación. En el tratamiento con las dos sustancias juntas, el efecto de la hormona predomina sobre el de la lectina, solamente en el día 1 se aprecia el efecto conjunto de ambas sustancias.

En la producción de figuras mitóticas se observa que en el día 1 en el tratamiento con PHA el total de éstas es menor que el en control y en los tratamientos con la hormona es aun menor.

En el día 1 para los tratamientos B y C se obtuvo una quinta parte del número total de figuras mitóticas con respecto al control; y en el tratamiento D, solamente una décima parte, lo que indica que el efecto tanto de la fitohemaglutinina como el del estradiol en este tiempo es inhibitorio.

En el día 2 en el tratamiento con PHA se produjo un menor número de figuras mitóticas con respecto al control. En los tratamientos con la hormona se obtuvo un mínimo de figuras mitóticas.

En el día 3 en el tratamiento con PHA se registró un número total de figuras mitóticas mayor que en el control, lo que muestra el efecto estimulante de la lectina. En los tratamientos C y D se obtuvo un mínimo de figuras mitóticas.

En el día 4 el número de figuras mitóticas en el tratamiento con PHA y en el control es muy semejante. En los días 5 y 7 se obtuvo un número menor de figuras mitóticas. En el día 6 fue ligeramente mayor.

En los días 0, 1 y 2 tanto la PHA como el estradiol inhiben la producción de figuras mitóticas. Al encontrarse juntas sinergizan. En los días 3, 4 y 6 tienen un efecto contrario. Cuando la lectina está sola estimula, en cambio la hormona in-

hibe. En estos días en el tratamiento con ambas sustancias, el efecto de la hormona predomina.

Para viabilidad celular en el día 0, ésta es menor en el tratamiento con PHA y en los tratamientos con la hormona es mayor. En el día 1 en el tratamiento con PHA el número total de células y la viabilidad son menores que el control. El tratamiento con el estradiol es muy semejante al control. En el tratamiento con PHA y estradiol el número total de células y la viabilidad son menores que el control aunque no hay diferencia significativa entre los tratamientos con la hormona.

El número total de células y la viabilidad en el día 2 en el tratamiento con PHA son menores que en el control. En el tratamiento con la hormona el número total de células es menor que en el control, pero la viabilidad es mayor ( $p < .001$ ). En el tratamiento con ambas sustancias tanto el número total de células como la viabilidad celular son menores.

En el día 3 en el tratamiento con PHA el número total de células y la viabilidad son menores que en el control. En el tratamiento con el estradiol el número total de células es semejante al del control y la viabilidad celular es casi del doble ( $.1 > p > .01$ ). En el tratamiento con la lectina y la hormona el número total de células es menor que el control y la viabilidad celular es mayor ( $.1 > p > .01$ ).

En el día 4 el tratamiento con la lectina el número total de células y la viabilidad son muy semejante al control. Los tratamientos con la hormona son: en el número total de células semejantes al control, pero la viabilidad celular es mayor. En los días 5, 6 y 7 no hay diferencia significativa entre el control y el tratamiento B.

En este parámetro, en el tratamiento con la PHA el número total de células se mantuvo a lo largo de los días de cultivo no así la viabilidad. Si se toma en cuenta la proporción de células vivas con respecto a las muertas se encuentra que en los tratamientos con la hormona, ésta es mayor que en el control. Existe un efecto de protección hacia las células. En cambio, en el tratamiento con PHA, la viabilidad es menor.

## V. DISCUSION Y CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos se observa que tanto la hormona como la lectina interactúan e influyen en el crecimiento de la población.

El hecho de encontrar en el parámetro de incorporación de  $^3\text{H}$  tritiada y producción de figuras mitóticas (Tabla VII) un efecto estimulante por parte de la lectina en timocitos de conejo, coincide con lo reportado en la literatura para linfocitos de sangre periférica (Sharon, 1977), (Goldstein y Poretz, 1986) y (Kocourek, 1986).

En humanos (Grossman, 1985), ratas (Greenstein y col., 1986) y ratones (Carter, 1976) se reporta un efecto de inhibición del sistema inmune *in vivo* debido al efecto de las hormonas esteroides. En el presente trabajo se obtuvo este mismo efecto en condiciones de cultivo tanto para el parámetro de incorporación de timidina tritiada como para la producción de figuras mitóticas.

En el tratamiento con ambas sustancias el efecto de la hormona predomina sobre el de la PHA en el parámetro de incorporación de timidina tritiada y a partir del día 3, con el parámetro de producción de figuras mitóticas. De nuevo esto coincide con trabajos hechos con mujeres (Purtilo y col., 1972)

El encontrar que en los días 0, 1 y 2 tanto la PHA como el estradiol inhiben la producción de figuras mitóticas y que al encontrarse juntas sinergizan, se puede explicar como los días en que la población de timocitos pasa por la fase de adaptación al medio de cultivo previo a la estimulación de la PHA (Castro-Rodríguez) que en timocitos de conejo sucede en el día 2 de cultivo. La lectina y la hormona, en cambio, tienen efectos opuestos en los días 3, 4 y 6 en cultivo.

A las figuras mitóticas que presentaron un aspecto diferente al convencional se les consideró como con efecto de goteo. Este aspecto es semejante al que presentan células infectadas con micoplasmas (Chen, 1977) aunque para asegurar la presencia de estos organismos se tendrían que hacer

pruebas para su detección. También se plantea que este aspecto se podría deber a una dosis o un tiempo mayor de exposición al Colcemid. Esto último es poco probable debido a que hubo figuras mitóticas con un aspecto convencional.

El no encontrar figuras mitóticas a partir del día 4 en los tratamientos con el estradiol se podría atribuir al efecto inhibitorio de la hormona sobre la incorporación en la fase S del ciclo celular por lo cual las células no son capaces de dividirse.

En el parámetro de viabilidad celular, en el tratamiento con la PHA el número total de células se mantuvo a lo largo de los días de cultivo no así la viabilidad. Esto indica que la PHA da como resultado la muerte de un mayor número de células en cultivo.

Si se toma en cuenta la proporción de células vivas con respecto a las muertas se encuentra que en los tratamientos con la hormona, esta es mayor que en el control. Existe un efecto de protección hacia las células. Esto es interesante, ya que las hormonas inhiben la respuesta inmune durante el embarazo para la protección del feto (Carter, 1977), pero no existe evidencias de que las destruyan.

Entre los individuos de una población existe una variabilidad la cual se debe a su información genética y a su respuesta hacia los factores del medio (Dobzhansky y col., 1977) (Smith, 1980). Esta variabilidad se encontró (Tablas II y VI) en las repuestas de los timocitos de los diferente conejos. En la incorporación de  $^3\text{H}$  timidina se observa que el comportamiento decreciente en las series I y III, pero los niveles de incorporación fueron de diferentes ordenes de magnitud. Si se toma en cuenta que en la respuesta inmune intervienen linfocitos moduladores y supresores los cuales regulan este proceso a través de la inducción de otros linfocitos (Laurence, 1986) (Marrack y Kapler, 1986), que en etapas avanzadas de la respuesta inmune el efecto de los linfocitos supresores se hace inminente para detenerla (Jaret, 1986), que existe la evidencia de lectinas las cuales estimulan la proliferación de linfocitos supresores en humanos como es el caso de la Concanavalina A (Lis y Sharon, 1986) y que en la

incorporación en el día 1 de las series I y III hubo una inhibición en lugar de una estimulación como en la serie II; se puede pensar que los conejos utilizados en las series I y III presentaban algún tipo de infección que previamente desencadenó la respuesta inmune y ésta ya estaba en etapas más avanzadas.

En un futuro se puede trabajar con conejos que tuvieran diferentes tiempos de infección para comprobar si debido a esto se pueden estimular diferentes poblaciones de linfocitos.

En el promedio de los cultivos del tratamiento con PHA (Tablas III, IV y VI) se observa claramente la secuencia del ciclo celular. Se registró un aumento en el número de figuras mitóticas en los días 2 y 3 como producto de la incorporación de la timidina tritiada captada en el día 2. Así mismo hubo un aumento en la viabilidad celular y en el número total de células en el día 3. A pesar de que hubo un aumento no significativo en la incorporación en el día 5, se registró un aumento en la producción de figuras mitóticas en el día 6 y un aumento en el número total de células el día 7. Esto demuestra que se manifestaron dos ciclos completos en el tratamiento con PHA. Sin embargo este comportamiento no se observó en los tratamientos con la hormona.

Aunque se puede concluir que la PHA y la hormona influyen en los timocitos de conejo, sería interesante conocer donde se recibe la señal de la sustancias, como se integran y el nivel en el que actúan las hormonas mediante el uso de precursores marcados y pruebas de dosis-respuesta tomando en cuenta lo que sabe al respecto.

La PHA se combina con galactosa o acetyl galactosamina a nivel de membrana plasmática (Goldstein y Poretz, 1986). En cuanto a las hormonas esteroides todavía no se sabe con certeza a que nivel actúan. Miyata y Takaya (1984) reportan que existen cambios a nivel de membrana plasmática que traen como consecuencia la formación de uniones celulares entre macrófagos y entre éstos y linfocitos tras la aplicación de hormonas esteroides. Weisz y colaboradores (1986) reportan la existencia de uno de los tres sitios de unión de los receptores a estradiol en el ADN del timo de ternera. Este

receptor además presenta la misma afinidad que su homólogo en el ADN de las células de tejido uterino. Weusten y colaboradores (1986) encontraron sitios de unión a estradiol en baja cantidad, pero de alta afinidad en timocitos de humano. Por otro lado, (Sato et al, 1986) no encontraron receptores en timocitos de ratón, sino que en el tejido conjuntivo del timo.

Si se toman en cuenta los parámetros utilizados en este trabajo (Tabla VII), en los cuatro tratamientos se presenta un crecimiento logístico al igual que en los trabajos reportados por Ongay-Larios (1978) y Castro-Rodríguez (1983); pero a diferencia de los linfocitos de sangre periférica de humano, los timocitos de conejo presentan una fase de adaptación o período lag más corto. En el control el período lag se encuentra en el día 0. El crecimiento exponencial es en el día 1 y 2. Posteriormente decrece. En el tratamiento con PHA se observa un período lag hasta el día 2. En el día 3 crece y en el día 4 disminuye. A partir de este día, se observa un crecimiento bajo pero constante. Aunque en el día 5 hubo un ligero aumento. En los tratamientos con el estradiol se observa que hay un crecimiento exponencial registrado en el día 1 y posteriormente, una disminución progresiva, pero la población se mantiene.

En este trabajo se encontró que la lectina tiene un efecto estimulante a partir del día 2 en cultivo y que ambas sustancias influyen el comportamiento de la población por separado y juntas. Carter (1976) reporta que el estradiol y la progesterona reducen la respuesta inmune *in vivo*. Aquí se encontró el mismo efecto del estradiol *in vitro*. Así mismo se abren otras posibilidades para continuar con el estudio de la población de timocitos de conejo en condiciones de cultivo y conocer la relación entre el sistema inmune y hormonas esteroides.

## VI. REFERENCIAS

\_Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y J. D. Watson. 1983. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing Press. N. Y. 1146 pp.

\_Anderson, J. M. 1971. Transplantation --Nature's Success. *Lancet* ii: 1077-1082.

\_Arakaki, D. T. y R. S. Sparkes. 1963. Microtechnique for Culturing Leukocytes from Whole Blood. *Cytogenetics*. 2: 57-60.

\_Betancourt - Rule, J. M., M. A. Aguilar - Santamaría, Y. C. Ducolomb - Ramírez y J. M. León - Cázares. 1978. Ciclo Celular del Linfocito Humano *in vitro*. XLVII Reunión Reglamentaria de la Asociación de Investigación Pediátrica A. C. México. 31-41.

\_Carrel, A. 1931. The New Cytology. *Science*. 73. 1890: 297- 303.

\_Carter, J. 1976. The Effect of Progesterone, Oestradiol and HGC on Cell-Mediated Immunity in Pregnant Mice. *J. Reprod. Fertil.* 46: 211-216.

\_Castro - Rodríguez, E. M. 1983. *Estudio del Crecimiento de una Población de Linfocitos Humanos en Cultivo*. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. U N A M.

\_Chen, T. R. 1977. In Situ Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by Fluorescent Hoechst 33258 Stain. *Exp. Cell Res.* 104: 255-262.

\_Cline, M. J. 1975. *The White Cell*. Harvard University Press. Cambridge, Mass. 564 pp.

\_Dickman, Z., S. K. Dey y J. Sen - Gupta. 1975. Steroidogenesis in Rabbit Preimplantation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 72, 1: 298- 300.

\_Dobzhansky, T., F. J. Ayala, G. L. Stebbins y J. W. Valentine. 1977. *Evolution*. W. H. Freeman and Co. San Francisco. 572 pp.

\_Goldstein I. J. y R. D. Poretz. 1986. Isolation, Physicochemical Characterization and Carbohydrate-Binding Specificity of Lectins en The Lectins, *Properties, Function and Applications in Biology*. Ed. I. E. Liener, N. Sharon y I. J. Goldstein. Academic Press. N. Y. 35-245.

\_Greenstein, B. D., F. T. A. Fitzpatrick, I. M. Adcock, M. D. Kendall y M. J. Wheeler. 1986. Reappearance of the Thymus in Old Rats after Orchidectomy: Inhibition of Regeneration by Testosterone. *J. Endocrinol.* 110, 3: 417-422.

\_Grobstein, C. 1979. External Human Fertilization. *Sci. Amer.* 240, 6:57-67.

\_Grossman, C. J. 1985. Interaction Between the Gonadal Hormones and the Immune System. *Science.* 227: 257-261.

\_Halina, L. y N. Sharon. Biological Properties of Lectins en The Lectins, *Properties, Function and Applications in Biology*. Ed. I. E. Liener, N. Sharon y I. J. Goldstein. Academic Press. N. Y. 266 - 291.

\_Hopkins, C. R. 1978. *Structure and Function of the Cells*. Saunders Co. London. 266 pp.

\_Jaret, P. 1986. Our Immune System: The War Within. *National Geographic.* 169, 6: 702-735.

\_Kessel, R. G. y H. K. Kardon. 1979. *Tissues and Organs: a Text - Atlas of Scanning Electron Microscopy*. W. H. Freeman and Company. San Francisco. 317pp.

\_Kocourek, J. 1986. Historical Background en en The Lectins, *Properties, Function and Applications in Biology*. Ed. I. E. Liener, N. Sharon y I. J. Goldstein. Academic Press. N. Y. 3- 32.

\_Kraus, A., S. Weisbroth, R. Flatt y N. Brewer. 1984. Biology and Diseases of Rabbits. *Laboratory Animal Medicine*. J. Fox, B. Cohen y F. Loew. (Eds.) Academic Press. N. Y. 207-240.

\_Krebs, C. J. 1978. *Ecology, the Experimental Analysis of Distribution and Abundance*. Harper & Row. N. Y. 678 pp.

\_Kruse, P. F. y M. K. Patterson Jr. 1973. *Tissue Culture Methods and Applications*. Academic Press. N. Y. 868 pp.

\_Laurence, J. 1985. The Immune System in AIDS. *Sci. Amer.* 256, 6: 70-79.

\_Lehninger, A. L. 1978. *Biochemistry*. Worth. N. Y. 1104 pp.

\_Lerner, R. A. y F. J. Dixon. 1973. The Human Lymphocyte as an Experimental Animal. *Sci. Amer.* 228, 6: 82-91.

\_Ling, N. R. y J. E. Kay. 1975. *Lymphocyte Stimulation*. North-Holland Publishing Co. Holland. 398 pp.

\_Lis, H. y N. Sharon. 1986. Isolation, Physicochemical and Carbohydrate-Binding Specificity of Lectins en The Lectins, *Properties, Function and Applications in Biology*. Ed. I. E. Liener, N. Sharon y I. J. Goldstein. Academic Press. N. Y. 35 - 245.

\_Marrack, P. y J. Kappler. 1986. The T Cell and its Receptors. *Sci. Amer.* 254, 2: 28-37.

\_Mazia, D. 1953. Cell Division. *Sci. Amer.* 189, 2: 53-63.

\_Mazia, D. 1961. How Cells Divide. *Sci. Amer.* 205, 3: 100-120.

\_Mazia, D. 1974. The Cell Cycle. *Sci. Amer.* 230, 1: 54-64.

\_Mishell, B. B. y S. M. Shiigi. 1980. *Selected Methods in Cellular Immunology*. W. H. Freeman and Co. San Francisco. 486 pp.

\_Miyata, K. y K. Takaya. 1984. Intercellular Junctions between Macrophages in the Regional Lymph Node of the Rat after Injection of Large Doses of Steroids. *Cell Tissue Res.* 236, 2: 351-355.

\_Moorhead, P. S., P. C. Nowell, W. J. Mellman, D. M. Battips y D. A. Hungerford. 1960. Chromosome Preparation of Leukocytes Cultured from Human Peripheral Blood. *Exp. Cell Res.* 20: 613 - 616.

\_O'Malley, B. W. y W. T. Schrader. 1976. The Receptors of Steroid Hormones. *Sci. Amer.* 234, 2: 32-43.

\_Ongay - Larios, L. M. 1978. *Modelo Experimental del Desarrollo de una Población de Linfocitos Humanos in vitro*. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. U N A M.

\_Ostrosky - Shejet, M. P. 1972. *Reacción de Linfocitos Humanos en Cultivo. Efecto del Ciclo Menstrual en la Producción de Mitosis*. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. U N A M.

\_Papiernik, M. y J. B. Jacobson. 1986. Thymic Lymphocyte III. Cooperative Phenomenon in Proliferation of Thymocytes under ConA Stimulation. *Cell. Immunol.* 97, 1: 23-33.

\_Peña - Rangel, M. T. 1983. *Efectos de Algunas Hormonas Esteroides sobre la Estimulación por Fitoheماغلutinina (PHA), en linfocitos de humano en cultivo*. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. U N A M.

-Purtilo, D. T., H. M. Hallgren y E. J. Yunis. 1972. Depressed Maternal Lymphocyte to Phytohaemagglutinin in Human Pregnancy. *Lancet.* i: 769-771.

\_Ranelletti, F. O., M. Piantelli, A. Carbone, N. Maggiano, L. M. Larocca, F. B. Aiello y P. Musiani. 1986. The

Mature, Mitogen - Responsive Human Thymocyte Population Comprises Two Functionally Distinct T - Cell Subsets Differing in Exogenous Interleukin Requirements for Mitogenesis and in Sensitivity to Glucocorticoids. *Scandinavian J. Immunol.* 23, 4: 407-414.

\_Richter, M., M. Berry y P. Barron. 1986. Cells Involved in the Immune Response. XXXI The Role of Spleen in Primary and Secondary Immune Responses in Normal Adult Outbred Rabbit. The Initial Location of Memory Cells to the Spleen and Their Subsequent Dissemination to the Thymus and Peripheral Lymph Nodes. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 38, 1: 101-110.

\_Rogers, J. C., D. Boldet, S. Kornfeld, S. S. Skinner y C. R. Valeri. 1972. Excretion of Desoxyribonucleic Acid by Lymphocytes Stimulated with Phytohemagglutinin or Antigen. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 69, 7: 1685-1689.

\_Rohlf, F. J. y R. R. Sokal. 1981. *Statistical Tables.* W. H. Freeman and Co. San Francisco. 219 pp.

\_Sachs, L. 1986. Growth, Differentiation and Reversal of Malignancy. *Sci. Amer.* 254, 1: 30-37.

\_Schulof, R. S., T. L. K. Low, G. B. Thurman y A. L. Goldstein. 1981. Thymosins and other Hormones of the Thymus Gland. Progress Clinical Research en *The Lymphocyte.* 58: 191-215.

\_Sell, W. K. y W. V. Miller. 1981. Progress in Clinical and Biological Research en Progress Clinical Research. *The Lymphocyte* 58: 228.

\_Sharon, N. 1977. Lectins. *Sci. Amer.* 236, 6: 108-119

\_Sharon, N e I. J. Goldstein. 1986. Historical Background en The Lectins, *Properties, Function and Applications in Biology.* Ed. I. E. Liener, N. Sharon y I. J. Goldstein. Academic Press. N. Y. 3 - 32.

\_Smith, R. L. 1980. *Ecology & Field Biology*. Harper & Row. N. Y. 835 pp.

\_Sokal, R. R. y F. J. Rohlf. 1981. *Biometry*. W. H. Freeman & Co. San Francisco. 859 pp.

\_Sutherland, E. W. 1972. Studies on the Mechanism of Hormone Action. *Science*. 177: 401-407.

\_Weisz, A., L. Coppola y F. Bresciani. 1986. Specific Binding of Estrogen Receptor to Sites Upstream and Within the Transcribed Region of the Chicken Ovalbumin Gene. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 139, 2: 396-402.

\_Weusten, J. J. A., M. A. Blankenstein, F. H. Gmelig - Meyling, H. J. Schuurman, L. Kater y J. H. H. Thijssen. 1986 Presence of Oestrogen Receptors in Human Blood Mononuclear Cells and Thymocytes. *A. Endocrinol.* 112: 409-414.

**TABLAS Y FIGURAS**

Tabla I. Número de cultivos de timocitos aislados de conejo para cada día.

Tratamiento	Parámetro <sup>1</sup>	Día							
		0	1	2	3	4	5	6	7
A (control) y B (PHA)	I	15	12	12	9	9	9	9	12
	V	5	4	4	3	3	3	3	4
	F	1	1	1	1	1	1	1	1
C (estradiol) y D (PHA + estradiol)	I	9	9	9	9	3	0	0	0
	V	3	3	3	3	1	0	0	0
	F	1	1	1	1	1	1	1	1

1

I = incorporación de <sup>3</sup>H timidina

V = determinación de viabilidad celular

F = producción de figuras mitóticas

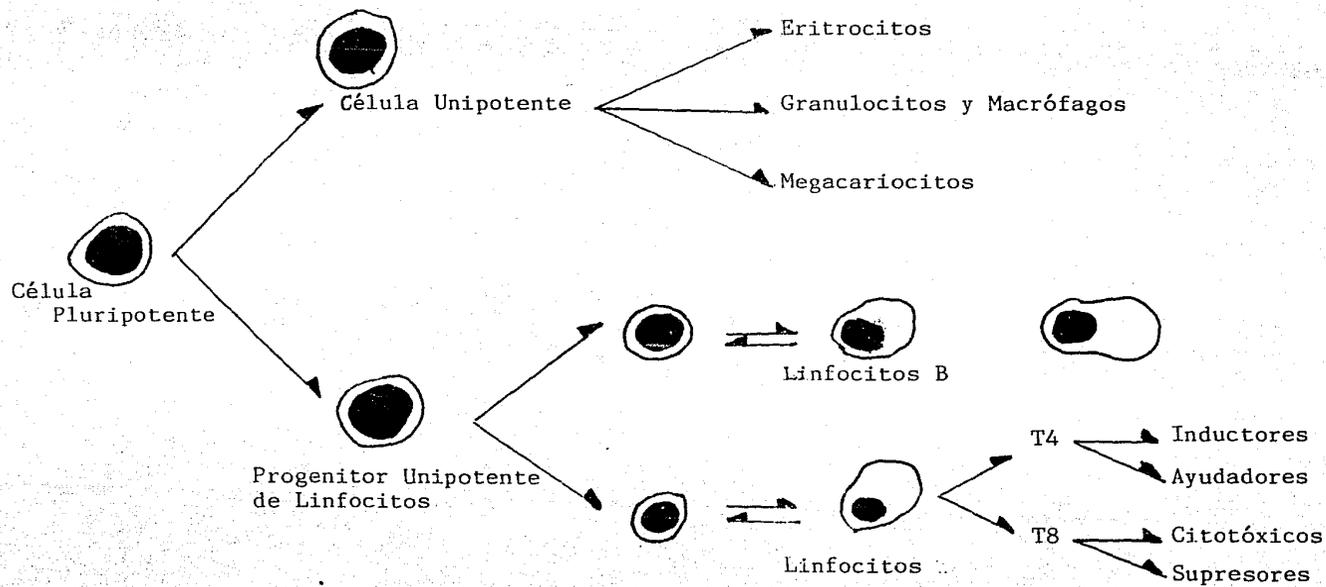


Fig. 1. Hematopoyesis (adaptado de Cline, 1975 y de Laurence, 1985)

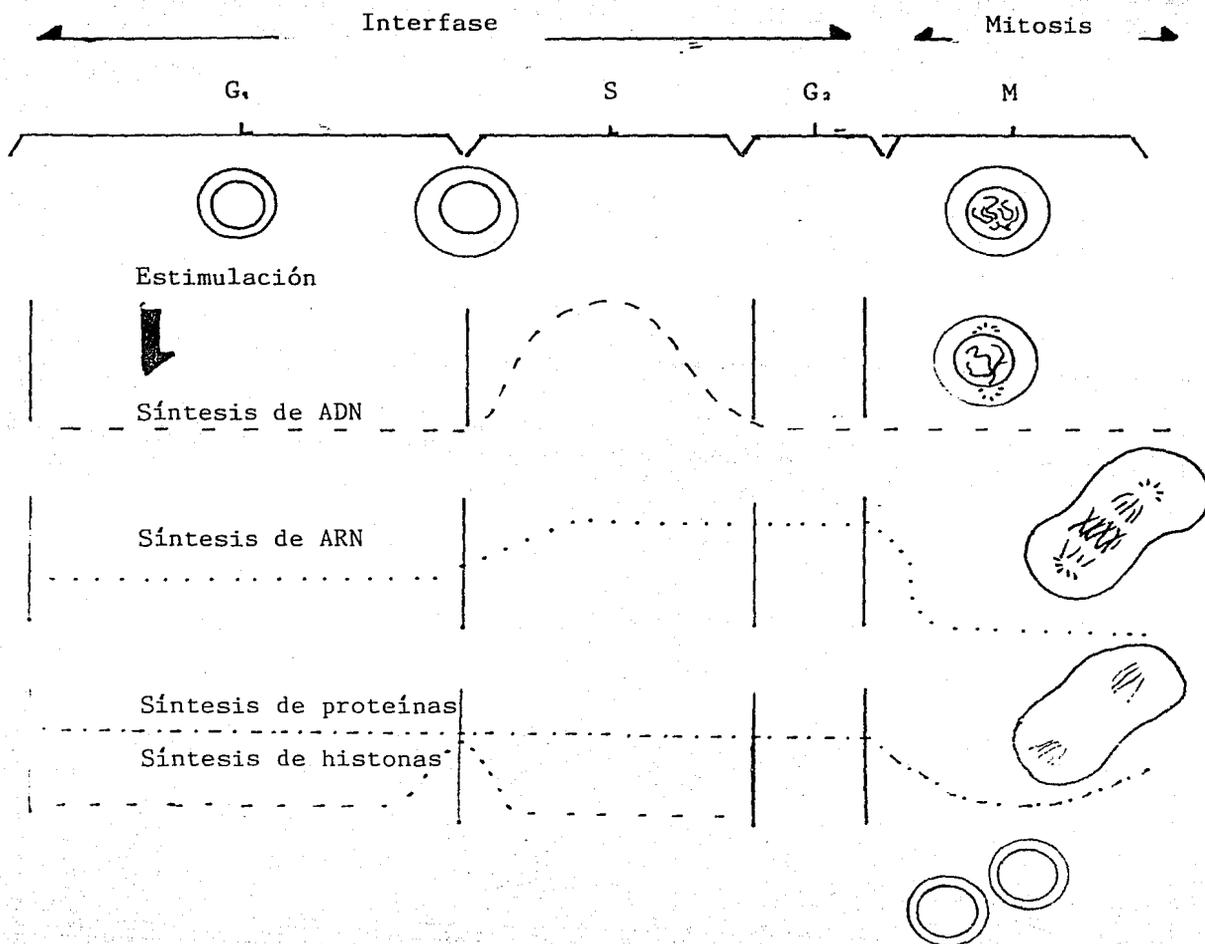


Fig. 2. Algunos eventos que se llevan a cabo durante el ciclo celular (Hopkins, 1978).

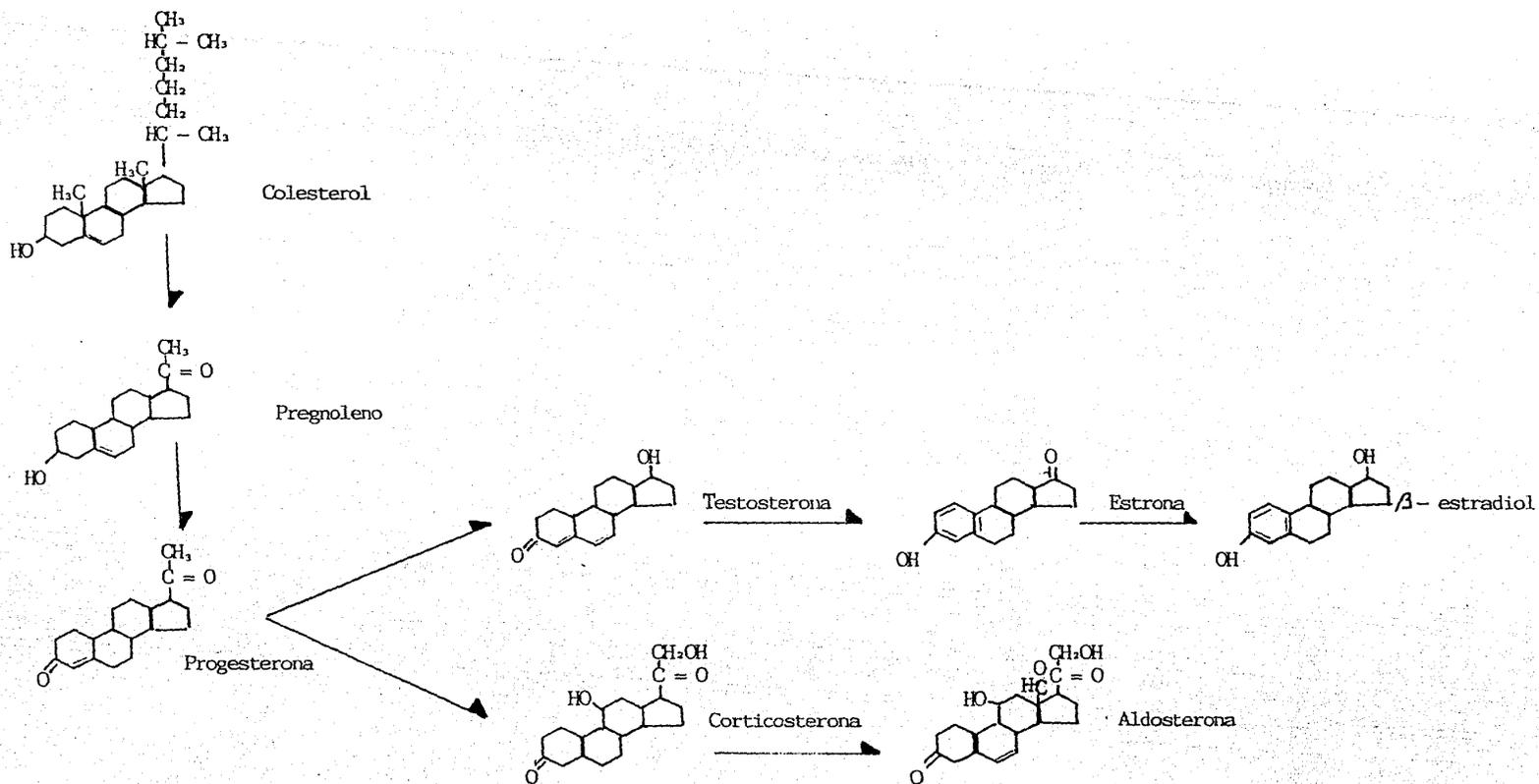


Fig. 3. Formación de hormonas esteroides (adaptado de Lehninger, 1978).

Tabla II. Incorporación de <sup>3</sup>H timidina.

serie	día	c.p.m.(x)	E.S. % E		c.p.m.(x)	E.S. % E	
		A (control)			B (PHA)		
I	0	7251.3	411.8	5.7	7558.3	1032.6	13.7
	*	2902.5	51.5	1.8	2665.4	452.2	17.0
	1	4140.7	1303.0	31.7	1870.7	296.2	15.8
	2	225.9	100.7	44.6	245.0	117.3	47.7
	3	148.3	58.0	39.1	63.4	18.8	29.7
	4*	57.5	5.0	8.6	41.6	5.9	12.2
	5*	47.1	4.1	8.7	51.9*	9.4	18.1
	6	41.5	2.2	5.4	38.4	0.6	1.5
7	46.0	1.4	3.0	46.9	4.7	10.0	
II	0	17418.8	2937.7	16.9	17241.7	1362.4	7.9
	1	24694.7	2301.0	9.3	21576.8	2353.5	10.9
	2	8925.8	456.1	11.6	6790.9	641.0	9.4
	3	1146.4	79.0	6.9	2844.0	45.5	1.6
	4	596.6	62.5	10.5	755.3	111.3	14.7
	5	263.8	62.5	23.7	970.6	63.8	6.6
	6	87.3	3.8	4.4	585.3	99.9	17.1
	7	76.8	6.1	7.9	355.5	46.6	13.1
III	0	4668.1	807.0	17.2	10545.6	685.4	6.5
	*	6891.3	1586.5	23.0	4286.7	372.0	8.7
	1	6850.4	606.4	8.9	7225.0	1178.3	16.3
	*	19177.4	1393.2	7.3	3990.9	700.3	17.6
	2	45.3	6.4	14.0	64.9	12.9	19.9
	*	1377.3	219.0	15.9	61.8	2.0	0.6
	3	36.6	2.8	7.8	66.3	11.0	16.6
	4	43.2	2.4	5.5	42.5	2.0	4.6
	5	43.5	0.8	1.8	38.5	1.7	4.3
	6	38.2	3.8	10.1	36.7	2.6	7.0
	7	42.9	0.3	0.7	53.1	14.7	27.7
*	40.4	4.7	11.7	38.7	3.3	8.6	

		C (estradiol)			D (PHA + estradiol)		
I	0	4710.8	179.4	3.8	3155.7	145.5	4.6
	1	11509.9	165.0	4.0	5464.3	796.5	14.6
	2	682.7	210.9	30.9	661.1	54.9	8.3
	3	51.3	13.2	25.7	38.3	3.0	7.7
	4	40.9	4.2	10.2	40.8	1.4	3.4
II	0	552.2	20.7	3.8	496.2	62.0	12.3
	1	2448.4	150.9	6.2	1564.5	182.3	1.7
	2	183.6	22.7	12.3	297.9	126.9	42.6
	3	136.5	7.1	5.2	110.3	5.3	4.8
III	0	736.3	162.4	22.1	872.6	50.2	5.8
	1	798.1	148.0	18.5	669.4	69.7	10.4
	2	53.9	3.5	6.5	46.8	10.1	21.5
	3	41.9	0.4	0.9	36.3	1.4	3.8

\*Un conejo diferente en una misma serie.

Tabla III. Promedios de los cultivos de <sup>3</sup>H timidina.

Día	c.p.m.(x)	E.S.	% E
<b>A (control)</b>			
0	8450.1	1626.6	19.3
1	13715.8	2644.8	19.3
2	1530.1	560.0	36.5
3	443.8	178.7	40.2
4	232.4	92.1	39.6
5	118.1	40.7	34.4
6	55.7	8.1	14.5
7	52.3	5.1	9.8
<b>B, (PHA)</b>			
0	8310.5	1788.2	21.5
1	8724.2	2624.2	30.1
2	1949.8	950.0	48.7
3	991.2	463.4	46.8
4	279.8	123.2	44.0
5	353.7	155.4	43.9
6	220.2	95.8	43.5
7	123.5	41.7	33.8
<b>C (estradiol)</b>			
0	1999.8	681.9	34.1
1	918.9	1671.4	34.0
2	306.7	113.7	37.1
3	76.6	15.7	20.5
4	40.9	4.2	10.2
<b>D (PHA + estradiol)</b>			
0	1508.1	418.2	27.7
1	2566.1	773.1	30.1
2	335.3	97.7	29.2
3	61.6	12.3	20.0
4	46.8	2.4	5.3

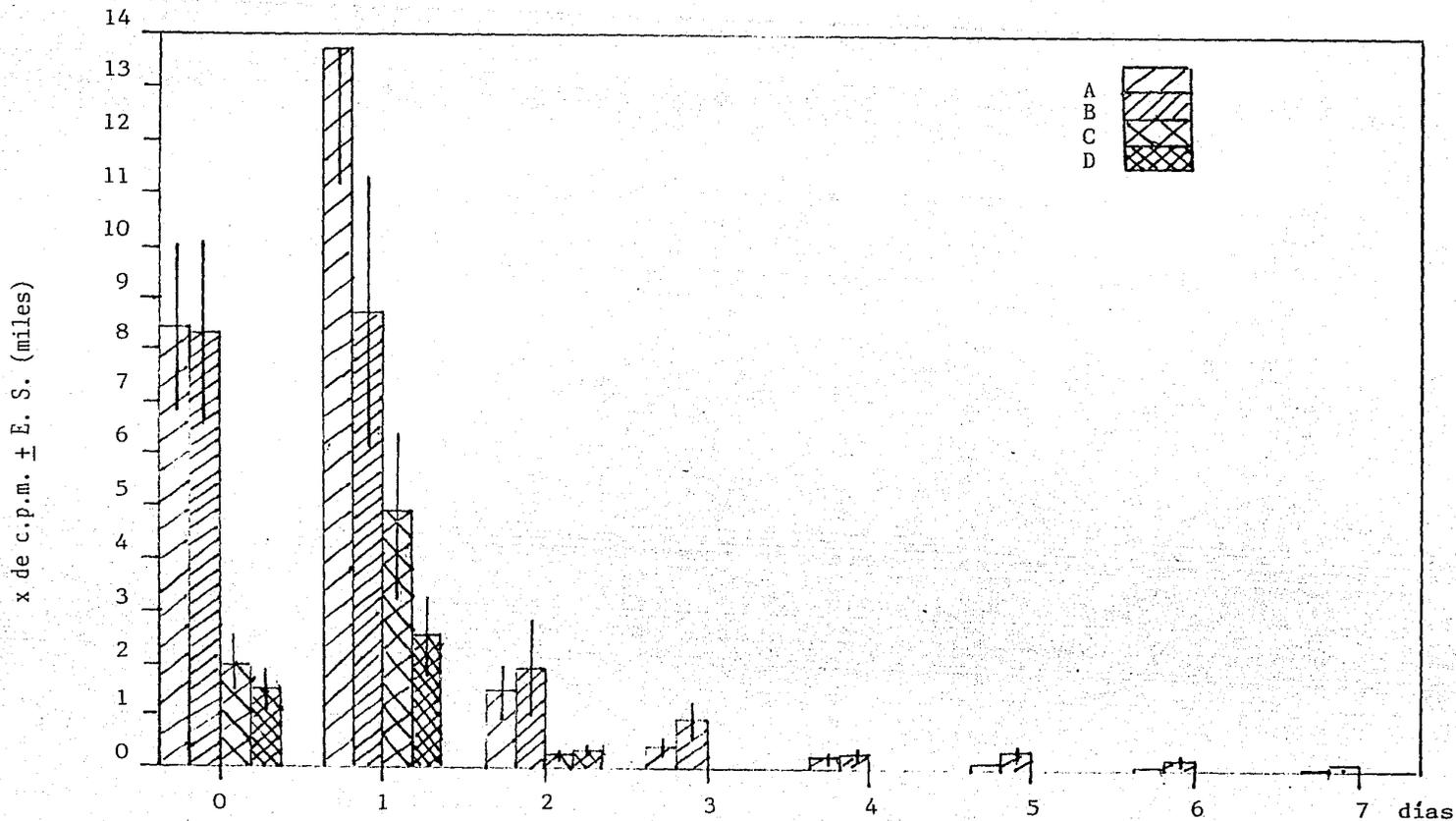


Fig. 4. Incorporación de  $^3\text{H}$  timidina por el control (A) y los tratamientos con PHA (B), estradiol(C) y con ambas sustancias (D).

Tabla IV. Figuras mitóticas.

día	profases	metafases	peg	meg	otras	total
A (control)						
0	8367	256	852	0	13	9488
1	9966	67	1075	0	12	11108
2	13698	240	1482	0	24	15444
3	3267	11	168	0	7	3455
4	2550	19	233	199	1	3002
5	329	47	106	5520	0	6004
6	246	16	59	2262	0	2583
7	17	0	4	1228	0	1249
B (PHA)						
0	5658	19	69	0	1	5745
1	1893	9	466	0	0	2368
2	2628	71	365	0	0	3004
3	730	141	762	3720	0	5353
4	301	59	2138	256	0	2754
5	102	85	104	2416	0	2707
6	0	9	0	3023	0	3132
7	0	2	4	559	0	565
C (estradiol)						
0	2493	2	430	0	1	2934
1	1651	0	167	2	1	1821
2	599	0	42	16	0	657
3	42	0	17	11	0	70
D (PHA + estradiol)						
0	2880	2	640	0	0	3520
1	829	0	253	0	0	1082
2	315	0	74	0	0	389
3	45	0	0	0	0	45

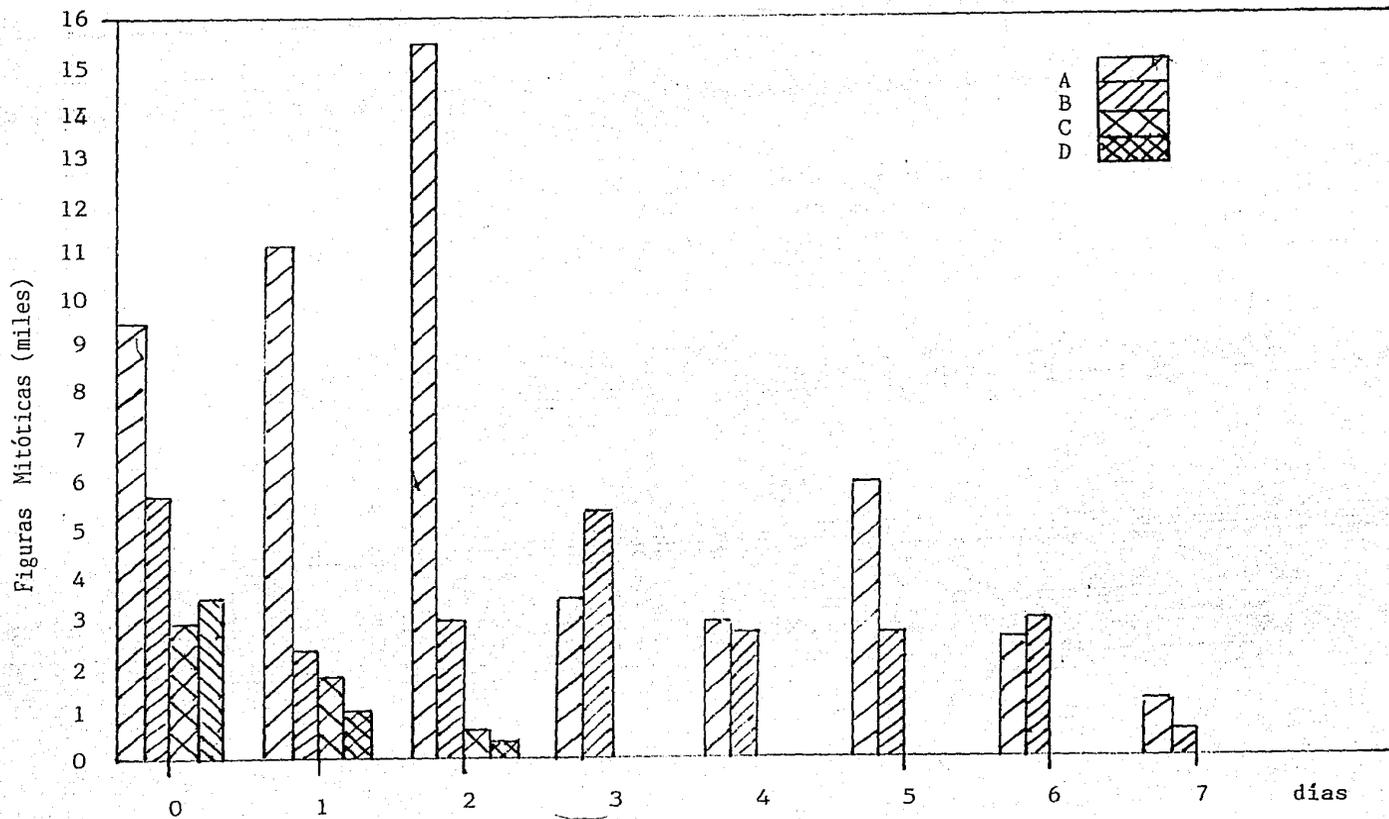


Fig. 6. Figuras mitóticas producidas por el control (A) y los tratamientos con PHA (B), estradiol (C) y con ambas sustancias (D).

Tabla V. Viabilidad celular ( $\times 10^3$ ).

Serie	Día	Vivas	E.S.	muertas	E.S.	Total	vivas	E.S.	muertas	E.S.	Total
		A (control)					B (PHA)				
I	0	1582	51	86	12	1668	380	31	54	13	434
	*	1500	97	662	69	2162	494	46	70	19	564
	1	232	53	614	70	846	94	16	42	6	136
	2	144	22	270	36	414	94	13	100	29	194
	3	130	28	380	37	510	180	22	150	24	330
	*4	0	0	354	41	354	0	0	144	45	144
	*5	0	0	56	14	56	0	0	136	26	136
	6	34	15	486	43	520	28	11	88	12	116
7	0	0	654	73	654	66	27	554	52	620	
II	0	1800	72	30	8	1830	806	59	20	9	826
	1	2084	144	486	64	2570	250	22	152	23	402
	2	1076	80	788	41	1864	484	50	358	51	842
	3	508	96	562	13	1070	432	63	517	69	949
	4	210	44	316	57	526	360	24	722	48	1082
	5	118	20	670	95	788	144	15	1058	58	1202
	6	58	6	188	19	246	46	4	1026	27	1072
7	112	23	620	32	732	36	9	672	158	708	
III	0	2544	123	204	52	2748	368	84	34	4	402
	*	3640	114	82	14	3722	1640	99	72	18	1712
	1	1518	68	226	37	1744	576	62	348	57	924
	*	2788	225	376	40	3164	824	52	82	14	906
	2	420	47	1494	82	1914	152	4	296	24	448
	*	1626	85	674	53	2300	832	124	152	61	986
	3	280	19	1102	116	1382	210	26	410	78	620
	4	132	17	1090	66	1222	182	30	550	56	732
	5	98	19	766	38	864	64	9	190	30	254
	6	84	9	1218	36	1302	76	10	798	40	857
	7	54	10	1256	73	1310	102	10	738	48	840
*	44	12	930	73	974	40	13	538	69	578	

		C (estradiol)					D (PHA + estradiol)				
I	0	2376	37	321	44	2697	2004	19	129	24	2133
	1	1266	48	571	32	1837	959	46	484	39	1443
	2	956	78	381	73	1337	597	32	418	22	1078
	3	725	32	477	57	1202	454	72	393	60	847
II	4	388	40	320	67	708	376	55	401	10	777
	0	4582	74	72	5	4654	3195	71	99	6	3294
	1	1348	58	110	31	1458	1138	57	96	18	1234
	2	974	62	164	41	1138	710	62	50	10	760
III	3	547	70	325	59	872	51	29	292	35	343
	0	3421	79	108	27	3529	3380	52	31	7	3411
	1	2602	24	311	8	2913	2111	66	202	65	2313
	2	1007	29	431	77	1438	954	32	345	80	1299
	3	620	71	535	39	1155	413	15	314	16	727

\*Otro conejo dentro de una serie.

Tabla VI. Promedio de los cultivos para la determinación de viabilidad celular (x 10<sup>3</sup>)..

día	vivas	E. S.	muertas	E. S.	total
A (control)					
0	2213	401	213	116	2426
1	1655	541	425	82	2081
2	816	333	806	254	1623
3	306	110	681	217	987
4	114	61	587	252	701
5	72	36	497	222	569
6	59	14	643	319	702
7	52	23	865	148	917
B (PHA)					
0	738	239	50	10	788
1	436	164	156	68	592
2	391	170	226	60	617
3	274	79	359	109	633
4	180	104	472	171	653
5	69	41	461	299	531
6	50	14	637	282	687
7	61	15	625	48	686
C (estradiol)					
0	3460	637	167	78	3627
1	1739	432	331	133	2069
2	979	149	325	82	1304
3	631	52	446	63	1076
4	388	40	320	67	708
D (PHA + estradiol)					
0	2860	431	86	29	2945
1	1403	358	261	116	1663
2	754	105	292	127	1046
3	306	127	333	31	793
4	376	55	401	10	777

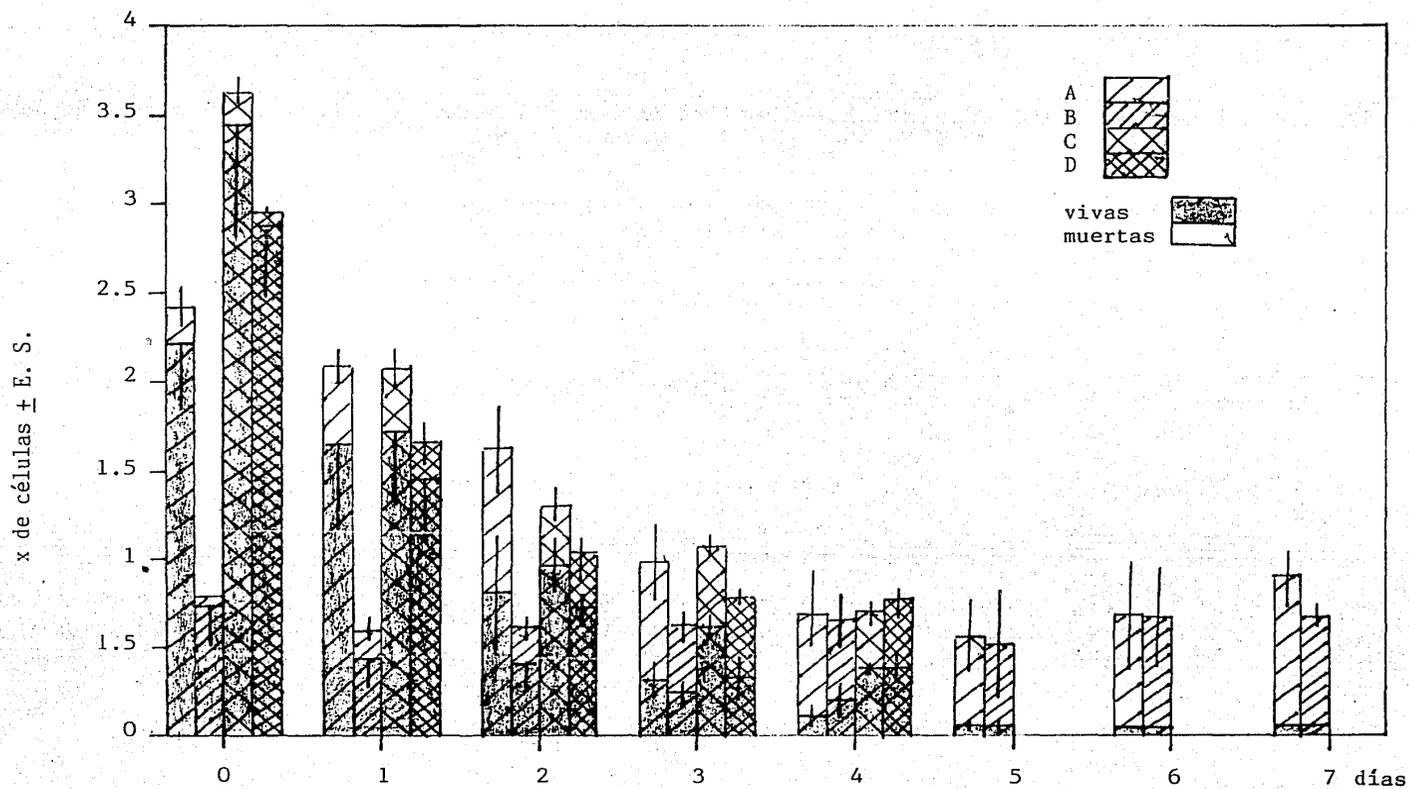


Fig. 7. Viabilidad celular para el control (A) y los tratamientos con PHA (B), estradiol (C) y con ambas sustancias (D).

Tabla VII. Datos en porcentaje con respecto al control (A)

Día	Tratamiento	Parámetro									
		I	F			V			total		
		cpm	E	S	%E	vivas	E	S	muertas	E	S
0	A	100.0	19.3	19.3	100.0	91.2	16.6	8.8	3.4	100.0	
	B	98.4	21.2	21.5	60.6	30.4	9.9	2.1	0.4	32.5	
	C	23.7	8.1	34.1	30.9	142.6	26.3	6.9	3.2	149.5	
	D	17.8	5.0	27.7	37.1	117.9	17.8	4.1	1.2	121.5	
1	A	100.0	19.6	19.6	100.0	79.6	26.0	20.4	4.0	100.0	
	B	63.6	19.1	30.1	21.3	21.0	7.9	7.5	3.3	28.4	
	C	35.9	12.2	34.0	17.3	83.6	20.8	15.9	6.4	99.5	
	D	18.7	5.6	30.1	9.7	67.4	17.2	12.5	5.6	79.9	
2	A	100.0	36.5	36.5	100.0	50.3	20.5	47.7	15.7	100.0	
	B	127.2	62.0	48.7	19.5	24.1	10.5	14.0	3.7	38.1	
	C	20.0	1.4	37.1	4.3	60.3	9.2	20.0	5.1	80.4	
	D	21.9	6.3	29.2	2.5	46.4	6.5	18.0	7.8	64.4	
3	A	100.0	40.2	40.2	100.0	31.0	11.3	69.0	22.0	100.0	
	B	223.3	104.4	46.8	154.9	27.8	8.1	36.4	11.0	64.2	
	C	17.6	3.5	20.0	2.0	63.9	5.2	45.1	6.3	109.0	
	D	13.9	2.8	20.0	1.3	46.6	3.0	33.7	3.1	80.4	
4	A	100.0	37.6	37.6	100.0	16.3	8.8	83.7	36.0	100.0	
	B	120.4	53.0	44.0	101.8	25.8	14.8	67.4	24.5	93.2	
	C	17.6	1.8	10.2	0	55.4	5.7	45.7	9.6	101.1	
	D	20.1	0.6	5.3	0	53.7	7.9	57.2	0.1	110.9	
5	A	100.0	34.4	34.4	100.0	12.7	6.4	87.4	3.9	100.0	
	B	299.5	131.6	34.4	45.1	12.3	2.3	81.0	52.5	93.3	
	C	—	—	—	0	—	—	—	—	—	
	D	—	—	—	0	—	—	—	—	—	
6	A	100.0	14.5	14.5	100.0	8.4	2.1	91.7	45.4	100.0	
	B	395.3	172.0	43.5	117.4	7.1	2.0	90.8	40.2	97.7	
	C	—	—	—	0	—	—	—	—	—	
	D	—	—	—	0	—	—	—	—	—	
7	A	100.0	9.8	9.8	100.0	5.7	2.5	94.3	16.1	100.0	
	B	234.6	80.1	33.8	45.2	6.7	1.7	68.2	5.2	74.8	
	C	—	—	—	0	—	—	—	—	—	
	D	—	—	—	0	—	—	—	—	—	

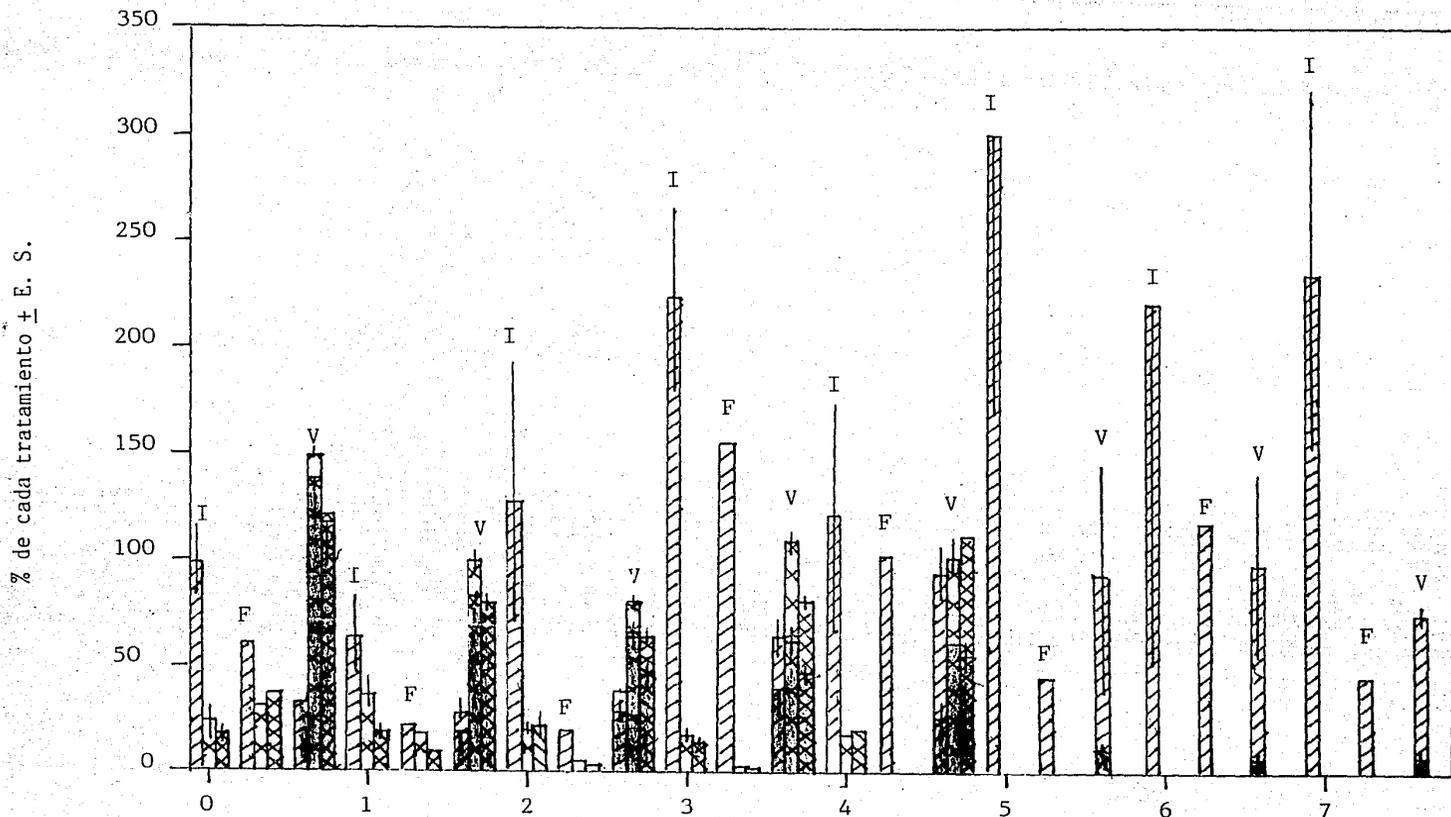


Fig. 8. Porcentaje de los tratamientos con PHA (B ) , con estradiol (C ) y con ambas sustancias (D ) con respecto al control para los parámetros de: incorporación de <sup>3</sup>H timidina (I), producción de figuras mitóticas (F) y viabilidad celular (V); vivas  y muertas  .

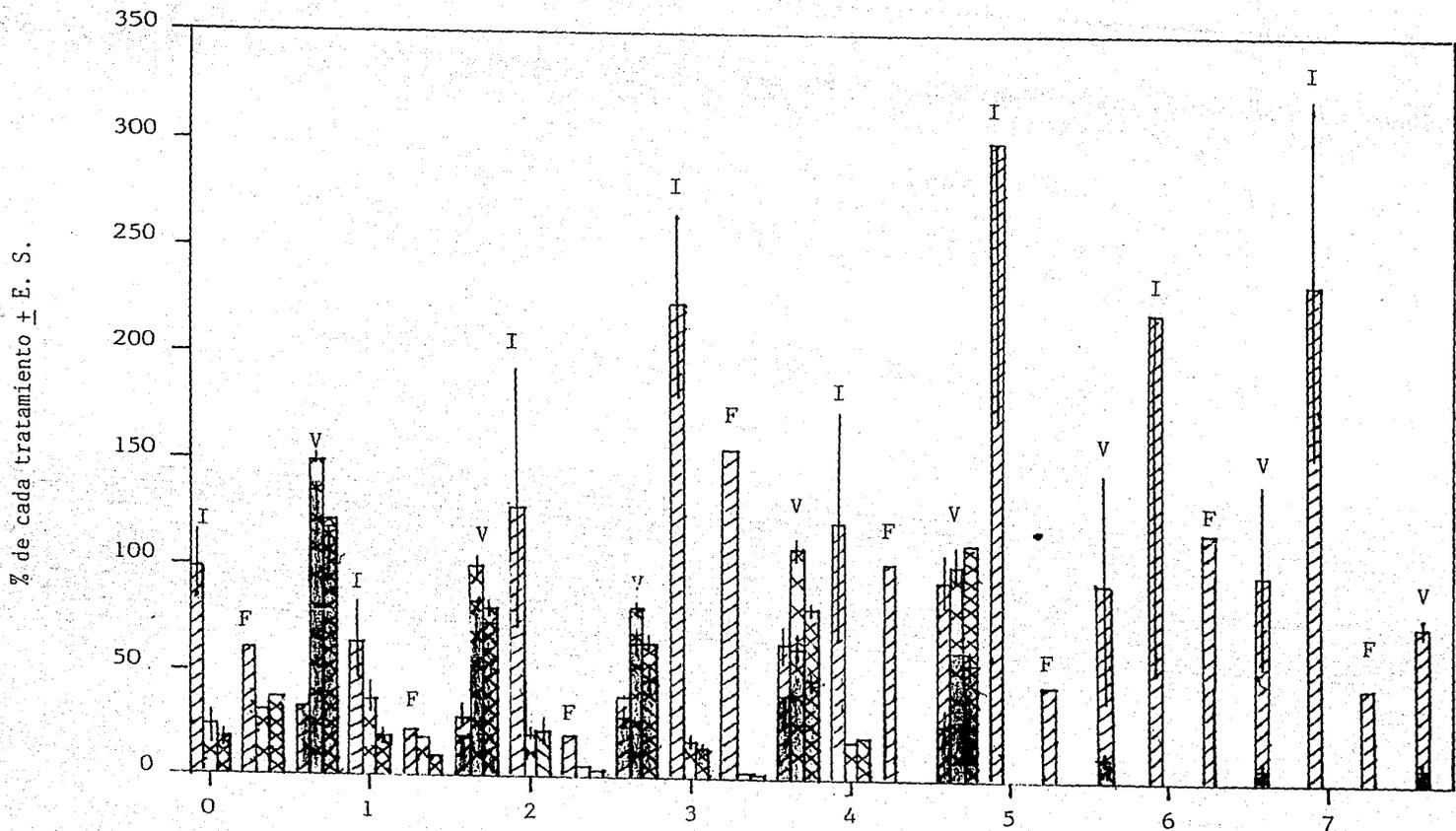


Fig. 8. Porcentaje de los tratamientos con PHA (B ) , con estradiol (C ) y con ambas sustancias (D ) con respecto al control para los parámetros de: incorporación de  $^3\text{H}$  timidina (I), producción de figuras mitóticas (F) y viabilidad celular (V); vivas  y muertas .