

00361
14
2ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

"Cinética de proliferación celular e intercambios de cromátidas hermanas basales e inducidas por Mitomicina C en linfocitos humanos cultivados en solución salina balanceada suplementada con plasma autólogo".

TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
(BIOLOGIA)

Presenta: Biól. Maria Eugenia Gonsebatt Bonaparte

Director de la tesis: Dr. Osvaldo Mutchinick Baringold

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1990



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.

INDICE

INTRODUCCION.....	1
CICLO CELULAR	3
Fases del ciclo celular.....	4
INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS.....	8
MITOMICINA C	13
PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO	14
MATERIAL Y METODOS	
Preparación de soluciones.....	15
Cultivo de linfocitos.....	17
Análisis al microscopio.....	19
RESULTADOS	
Ciclo celular.....	21
Ciclo celular en presencia de MMC.....	23
Indices mitóticos	24
Intercambios de cromátidas hermanas.....	25
DISCUSION	
Ciclo celular.....	26
Intercambios de cromátidas hermanas.....	30
CONCLUSIONES.....	31
BIBLIOGRAFIA.....	32

INTRODUCCION

Es un hecho conocido, que si se logran las condiciones adecuadas, la mayoría de los diferentes tipos de células pueden sobrevivir, multiplicarse y expresar sus propiedades características en el laboratorio (1). Esto permite estudiar el efecto que tiene en la fisiología celular, el modificar concentraciones de sustancias como hormonas, factores de crecimiento u otros nutrientes.

Para mantener a las células "in vitro" se utilizan diversos medios de cultivo. La mayoría de ellos consisten en mezclas de sustancias que han demostrado ser necesarias (Tabla 1), aunque el conocimiento de su acción es incompleta, por lo que muchos medios sintéticos se han producido empíricamente (1, 2). Sin embargo, los componentes esenciales para la sobrevivencia de las células y tejidos están precisamente definidos. Se sabe que es necesario controlar la presión osmótica y el pH, proveer además, una fuente de energía y ciertas sales inorgánicas como Ca^{++} , Mg^{++} , Na^{+} y K^{+} . Las soluciones salinas balanceadas reúnen estos requisitos, por lo que son utilizadas en estos casos. Cuando el cultivo es más prolongado (días, meses), otros factores son indispensables, empleándose rutinariamente medios de cultivo enriquecidos con suero fetal de bovino (SFB), de caballo o humano, los que contienen estos nutrientes necesarios para una proliferación más prolongada (2). El material biológico aportado

TABLA 1

Composición de un medio típico para el cultivo de células de mamífero ⁽¹⁾

Aminoácidos	Vitaminas	Salas	Miselaéneos
Arginina	Biotina	NaCl	Glucosa
Cistina	Colina	KCl	Penicilina
Glutamina	Folato	NaH ₂ PO ₄	Estreptomcina
Histidina	Nicotinamida	CaCl ₂	Rojo de Fenol
Isoleucina	Pantotenato	MgCl ₂	Suero total
Leucina	Piridoxal		
Lisina	Tiamina		
Metionina	Riboflavina		
Fenilalanina			
Treonina			
Triptofano			
Tirosina			
Valina			

La glucosa se usa a concentraciones de 5 a 10 mM. Los aminoácidos en su forma L, se usan en concentraciones de 0.1 a 0.2 mM, las viitaminas a concentraciones 100 veces menor o sea a aproximadamente 1 µM. El suero, usualmente de caballo o de ternera se usa a 10 % del volumen total. Penicilina y Estreptomcina son antibióticos - agregados para inhibir el crecimiento bacteriano. El rojo fenol - es un indicador de pH cuyo color se utiliza para reconocer un pH de aproximadamente 7.4 .

por ellos está constituido principalmente por hormonas y factores de crecimiento. Cuando la intención es conocer los requerimientos específicos que tienen células y tejidos para su crecimiento y diferenciación se usan medios libres de suero que contienen cantidades perfectamente definidas de estas hormonas y factores, lo cual facilita la identificación de su efecto y la búsqueda de nuevos componentes vitales (1).

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 primeros son los responsables de la inmunidad humoral, producen los anticuerpos a través de un proceso de maduración en el cual están involucrados los linfocitos T, quienes son además los encargados de la inmunidad celular (3).

Los cultivos de linfocitos humanos y de otros mamíferos no sólo tienen aplicación para estudios inmunológicos y cariológicos, sino también como sistema de prueba para la detección de mutágenos y/o carcinógenos, ya sea en el laboratorio o en poblaciones expuestas a ellos. Permiten así mismo, establecer frecuencias de mutación al nivel del locus de la enzima HGPRT (hipoxantina-guanina fosforribosil transferasa).

Los medios y los métodos de cultivo usados para los linfocitos de sangre periférica no son sustancialmente diferentes

de aquellos usados para cultivar otros tipos de células y líneas celulares. Los linfocitos humanos pueden proliferar en distintos medios, los que se pueden enriquecer o no con suero fetal (4). Se ha demostrado, sin embargo, que el número de células que se dividen y el tiempo que transcurre entre una división y la siguiente (ciclo celular), después de la estimulación con fitohemaglutinina, dependen del tipo de medio y de suero o plasma utilizados (5, 6, 7, 8).

CICLO CELULAR

Se llama ciclo celular (CC) al intervalo de tiempo que transcurre entre una división celular y la subsecuente, e incluye los procesos de crecimiento, replicación del ADN y citocinesis.

Estrictamente hablando, el inicio y el fin del ciclo radican generalmente, al comienzo de la interfase, que es cuando se decide detener la proliferación o continuar con la siguiente división celular (9).

Los distintos eventos de este proceso se ordenan como se muestra en la Fig. 1, siguiendo dos sucesos fácilmente identificables como la replicación del ADN y la división celular (10, 11). Esto permite, como inicialmente sugirieron Howard y Pelc (12), dividir al ciclo en los intervalos G₁, S, G₂ y M. G₁ transcurre entre la terminación de la división celular y el

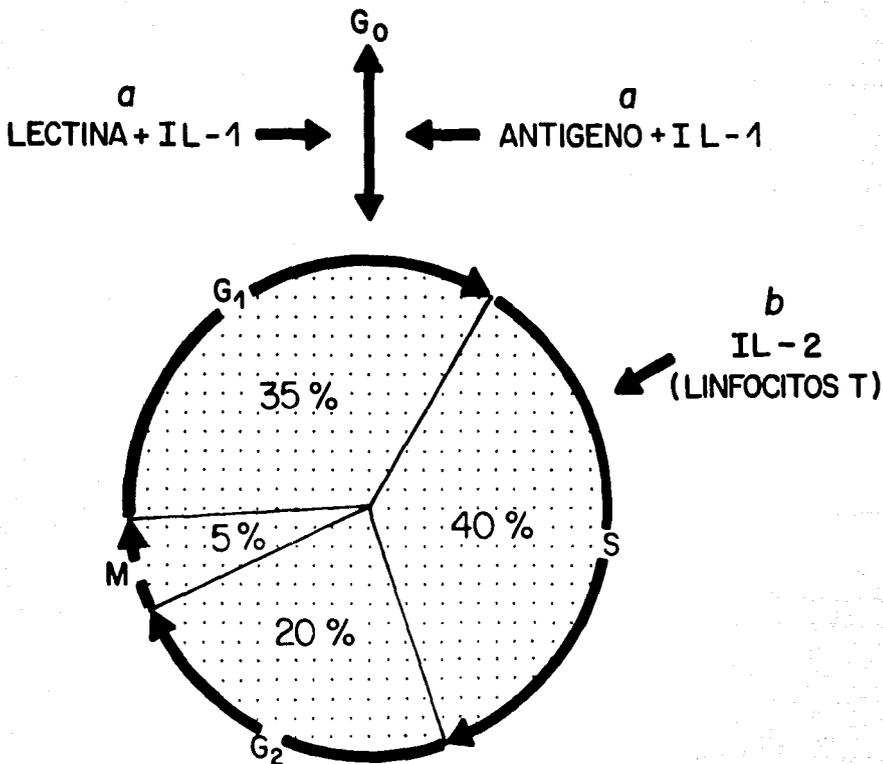


FIGURA 1: Ciclo celular de los linfocitos. Las células T en G_0 , se activan por cualquiera de las señales (a) y pasan a la fase G_1 donde sintetizan IL-2 (b) que induce la síntesis de ADN previa a la división celular (13).

comienzo de la duplicación del material genético o fase S. G2 corresponde al lapso que transcurre entre la terminación de la replicación y el comienzo de la división celular (9). Por otro lado, Lajtha demostró que existían células que no se dividían sino que estaban en reposo. Este estado se conoce como fase G0, y ahora su inclusión como etapa del ciclo celular es discutida (13).

La mayoría de las líneas celulares en cultivo tienen un ciclo que varía entre 10 y 30 horas (10), ya que es diferente de un tipo celular a otro. De tal manera que, mientras la fase de mitosis dura aproximadamente una hora, G2 entre 2 y 4 hs, S entre 7 y 8 hs y G1, que es la más variable puede tener de 1 a 9 horas de duración (9).

Fases del ciclo celular

G0: se considera como una etapa de reposo, en donde el contenido de ARN es bajo, el cual se incrementa cuando la célula se induce a proliferar. Se ha demostrado que los niveles de calmodulina (proteína reguladora de enzimas intracelulares sensibles al calcio), se elevan cuando la célula entra en G0, mientras que dichos niveles disminuyen cuando la célula es inducida a proliferar y sale de dicha fase para entrar a G1 (14).

G1: las variaciones de tiempo observadas en el ciclo celular entre distintos tipos celulares, se debe principalmente a esta

etapa ya que las restantes tienen un tiempo relativamente constante. En esta etapa como en la anterior, se sintetizan

las histonas constituyentes de la cromatina, pero en pequeñas cantidades (15). También en este momento los linfocitos T activados aumentan sus antígenos de diferenciación CD3, CD4, y CD8, así como los de la clase I del complejo mayor de histocompatibilidad, aunque su relación con los procesos de proliferación y su significado sean aún oscuros (16). Al final de este periodo, nuevamente se elevan los niveles de calmodulina, considerándose que esta proteína (y por lo tanto el calcio) es importante en la regulación de la síntesis de ADN (14). Aparentemente, los eventos cruciales que controlan la regulación del crecimiento celular ocurren en esta fase, cuya duración puede ir de 1 a 9 horas.

S: los sucesos sobresalientes son la síntesis de ADN e histonas, que duran aproximadamente de 6 a 8 horas. La replicación del material genético se realiza simultáneamente en diferentes cromosomas y en segmentos de un mismo cromosoma. Cada segmento o unidad de replicación se conoce como replicón. Este periodo puede dividirse en tres subestadios, en el primero se duplica el 15% del ADN y el restante en los dos subsiguientes. Durante los dos primeros se replican las bandas G negativas (claras), mientras que las G positivas (oscuras), lo hacen en el último. La síntesis de histonas, se sabe que esta acoplada a la del ADN (17).

G2: el tiempo de duración de G2 es de 2 a 6 horas, aquí la célula se prepara para la mitosis, por lo cual se produce gran condensación de la cromatina (1).

MITOSIS: tiene un tiempo de duración de aproximadamente una hora y corresponde a la división celular propiamente dicha. Consta de varias etapas: profase, metafase, anafase, y telofase, caracterizándose cada una de ellas por los diversos eventos que ocurren en las mismas (1).

Los linfocitos circulantes están normalmente en reposo (G0) y para hacerlos proliferar "in vitro", se utilizan una serie de mitógenos, de los cuales el más común es la fitohemaglutinina (PHA), una glucoproteína extraída de Phaseolus vulgaris. Se considera que la PHA induce la producción en los linfocitos T (humanos y de otras especies de mamíferos) de una proteína, la interleucina 2 (IL-2), en presencia de macrófagos, y la expresión de receptores de IL-2 en las células T correspondientes (4). Estos procesos ocurren en G1, mientras que el progreso hacia S involucra el consumo de IL-2. La mayoría de las líneas de células T de tiempo prolongado de cultivo, requieren de IL-2 exógeno para su continua proliferación. En resumen, la evidencia existente (18), indica que la estimulación de las células T por antígenos o lectinas puede ser dividida en dos estadios. El primero manifestado por la expresión de receptores a IL-2 y la producción

de IL-2, que normalmente requiere de un antígeno específico y células accesorias y representa la transición del estado de reposo a G1. El segundo involucra a IL-2 que permite a las células progresar hacia S. Lo que no está claro es el papel del antígeno en el segundo y subsecuentes ciclos de división.

Las células cultivadas "in vitro" disminuyen o detienen su ciclo celular cuando son colocadas en concentraciones limitadas de nutrientes, de factores de crecimiento o si se les añade un inhibidor de la síntesis de proteínas (10). Estas podrían ser en parte las razones por las cuales, como se mencionó anteriormente, la duración del ciclo celular de los linfocitos humanos depende del medio de cultivo utilizado (6, 7), de la presencia de SFB, aunque en este caso los resultados son contradictorios (5, 6, 8), o de plasma autólogo.

El pH intra y extracelular también afecta al ciclo. Cuando el pH extracelular está entre 7.2 y 6.8, el crecimiento es 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 de 6.3, se inhibe casi por completo (19). Los linfocitos que se encuentran proliferando tienen un pH más alcalino que los que están en reposo (19).

Estudios sobre la duración del ciclo celular en un mismo

individuo, a quien se le tomaron muestras consecutivas con intervalos de algunas semanas, muestran diferencias en la duración del mismo (20). También hay variaciones interindividuales en cuanto a la cinética de proliferación de los linfocitos humanos "in vitro", ya que mientras algunos individuos tienen hasta un 50% de células en segunda división en cultivos de 48 horas (6, 21), otros investigadores describen que en una muestra de 100 donadores, el 63% de ellos solo tienen entre 0 y 5% (22).

Los agentes alquilantes, los plaguicidas y la mayoría de las drogas citostáticas utilizadas en los pacientes con cáncer aumentan el tiempo del ciclo celular (22, 23, 24, 25).

Aunque la duración del ciclo celular no afecta la frecuencia de intercambios de cromátidas hermanas, dentro de ciertos límites (26), ésta sí varía al utilizar distintos medios de cultivo (26, 27), habiéndose dado como una posible explicación las diferencias en la concentración de timidina de dichos medios.

INTERCAMBIOS DE CROMATIDAS HERMANAS

El intercambio de cromátidas hermanas (ICH) es un cambio recíproco de secuencias de ADN en loci homólogos entre cromátidas en el estadio de cuatro cadenas durante la replicación del ADN cromosómico. Este intercambio molecular puede ser fácilmente

visualizado al microscopio de campo claro en las metafases después de una autorradiografía por la incorporación de timidina tritiada (28), o por la técnica de tinción diferencial que se basa en la utilización de un análogo de base de la timidina, la 5-Bromodesoxiuridina (BrdU) o 5-Clorodesoxiuridina en las células (29, 30). Este parece ser un fenómeno natural que ocurre sólo durante la replicación de ADN, ya que una célula somática normal se observa cierto nivel basal de ICH y estos no pueden observarse en células que no han sufrido replicación de ADN en presencia de los marcadores (26).

Actualmente se emplea una técnica descrita hace 16 años por Latt (29) y posteriormente modificada por Perry y Wolff (30), conocida como el método de fluorescencia más Giemsa (FPG). Esta se basa en la incorporación de un análogo de base del ADN, la 5-Bromodesoxiuridina, por dos ciclos consecutivos de replicación. Al final del segundo ciclo de replicación del ADN, en las metafases de segunda división, una cromátida de cada cromosoma metafásico está unifilarmente sustituido con BrdU mientras que su hermana está bifilarmente sustituida. La sustitución diferencial de las cromátidas con BrdU produce cromátidas fácilmente diferenciables gracias a la tinción apropiada. La técnica de FPG provoca cromátidas claras y oscuras (Fig. 2), para las cromátidas bi y unifilarmente sustituidas respectivamente y cualquier intercambio entre éstas cromátidas pueden ser detectadas con claridad y alta resolución en el microscopio de luz.



(A)



(B)



(C)

FIGURA 2. Aspecto al microscopio de luz de una metafase que ha completado un ciclo en presencia de BrdU (A), dos ciclos (B) y tres o más ciclos (C).

Se ha postulado que este fenómeno de tinción diferencial puede deberse a la fotólisis que sufre el ADN en la cromátida bisustituida , seguida de la extracción de ADN degradado (31, 32). Esta fotólisis ocurre cuando las preparaciones se exponen a la luz U.V. o con longitudes de onda cercanas a ella, después de la tinción con fluorocromos como el Hoescht 33258 o la naranja de acridina, los cuales sensibilizan al ADN que ha incorporado BrdU e incrementando la fotólisis.

Desde su desarrollo, esta técnica se ha convertido en parte del grupo de pruebas para la detección de mutágenos y/o carcinógenos químicos (26), con la ventaja que permite al mismo tiempo, observar la cinética de proliferación celular, mediante la cuantificación de la frecuencias de primeras, segundas y terceras divisiones "in vitro", a diferentes tiempos de cultivo.

Los mecanismos moleculares implicados en la inducción de ICH no han sido aclarados (26), sin embargo tienen que involucrar rompimiento de la hebra de ADN y reunión. Se ha sugerido que formando ICH las células puedan superar el daño no reparado durante las replicaciones de ADN. Esto parece lógico, ya que hay un doble rompimiento y reunión reversible y concertado del ADN que ocurre espontáneamente durante la replicación del material genético. Por lo tanto se espera que un incremento en rompimientos de la cadena durante la fase S produzca un

incremento de ICH (26). También se piensa que pueden deberse a recombinación somática o a procesos de amplificación o diversificación de genes (33, 34).

Existen diferentes modelos que intentan explicar los mecanismos moleculares que dan origen a los ICH. Painter, en 1980 (35), propone que el ADN al estar dañado retarda su duplicación por lo que los duplicones terminan la síntesis a diferentes tiempos en el replicón, lo que produce una ruptura en la continuidad de la hebra parental. Esto favorecería la posibilidad de una asociación aleatoria entre hebras parentales e hijas, lo que produciría un intercambio de doble cadena. Como este modelo se basa en que el retardo en la duplicación es producido por el daño que se evidencia posteriormente en ICH, se le critica el hecho que se pueda realmente discernir si son los ICH los que inducen el retraso en la división celular o viceversa (36).

Morales en 1990 (36), propone un modelo que se basa en los modelos propuestos por Comings, Kato, Shafer e Ishii y Bender, y en datos obtenidos en su laboratorio. Este consiste en considerar que durante la duplicación del ADN, como consecuencia de una lesión que no permite la síntesis de la hebra hija, se induce la recombinación de la hebra opuesta al daño con la cadena de la misma polaridad. Este intercambio de cadena única, cruza la zona en donde está la lesión y permite que la brecha frente a la lesión pueda ser subsanada utilizando la complementariedad de la

hebra recientemente sintetizada.

En cultivos de linfocitos de individuos no expuestos a mutágenos el número basal de ICH por célula varía de 0 a 16, o sea una frecuencia de 0 a 0.348 por cromosoma (27). Los ICH se observan tanto en cultivos "in vitro" como en estudios realizados "in vivo", en estos últimos la frecuencia es siempre menor (37, 38, 39). Esto parece estar dado por variaciones en las concentraciones de BrdU usadas, ya que esta substancia induce ICH (40, 41).

Dado que el ICH es un fenómeno dependiente de la replicación del ADN, existen factores celulares como los niveles de nucleótidos, biorritmos, enzimas de reparación y replicación que pueden jugar un papel importante en su formación (26).

A pesar de serios intentos para minimizar la influencia de una serie de factores potenciales, existen todavía variaciones en los resultados entre laboratorios y a veces dentro de laboratorios (26). Los medios de cultivo comerciales que se usan comúnmente pueden producir diferencias significativas en la cinética de proliferación celular y en la frecuencia de ICH espontáneos en linfocitos humanos (6, 40, 41, 42). Sharma y Das (40), han reportado que distintos medios de cultivo requieren diversas cantidades de BrdU para provocar la tinción diferencial de los cromosomas, posiblemente por la heterogeneidad en los

contenidos de timidina y ácido fólico. Lamberti y col. (41) encuentran una gran variación en la frecuencia basal de ICH cuando las células son crecidas en tres formas diferentes del mismo medio TC 199: TC 109, TC 199 y TC 640.

El suero, componente esencial del cultivo celular, afecta la frecuencia de ICH, dependiendo del tipo y de la concentración usada (43, 44, 45, 46, 47). En numerosos laboratorios se ha observado una variación significativa del ICH si se usan alternativamente, suero autólogo, humano AB o SFB. Generalmente el suero autólogo da una menor frecuencia de ICH que el SFB. En cuanto a los efectos producidos por la concentración de suero usado, los resultados son contradictorios. Gosh y Nand (45), encuentran que la frecuencia de ICH incrementa en función de la cantidad de suero agregado al medio de cultivo, mientras que Mc Fee y Sherrill (46) así como también Das y Sharma (47) no hallan esta relación. Por otro lado, un estudio reciente de Wiencke (48) muestra que factores del suero pueden hasta modificar la sensibilidad a mutágenos cuando se inducen ICH en linfocitos humanos.

MITOMICINA C

La mitomicina C (MMC) es un antibiótico aislado de Streptomyces caepitosus. Es un poderoso agente alquilante, propiedad que adquiere cuando es activado por reductasas

intracelulares (49). Su mecanismo de acción consiste en formar enlaces cruzados de ADN actuando en la guanina y citocina, esta acción se presenta de manera más importante durante la fase S y G2 del ciclo celular, a pesar que se le considera un agente no específico. También, a dosis altas, inhibe la síntesis de RNA y de proteínas (50).

La MMC, en distintos sistemas de prueba, ha resultado ser mutagénico e inducir un marcado incremento de ICH en células tratadas, tanto "in vitro" como "in vivo", a concentraciones que inducen muy pocas aberraciones cromosómicas estructurales (51). Cuando los tratamientos producen una alta frecuencia de intercambios, también causan retraso en el ciclo celular (25)

PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

El cultivo de linfocitos tiene gran relevancia como sistema de prueba para el estudio del daño genético inducido tanto "in vivo" como "in vitro" por diversos agentes mutagénicos y/o carcinogénicos. Es importante, que los datos obtenidos en el laboratorio reflejen la susceptibilidad real de las células a estas sustancias, por lo que el objetivo de este trabajo es el de estudiar la cinética de proliferación, la frecuencia basal de ICH y la inducida por un agente alquilante como la mitomicina C, en linfocitos humanos cultivados en condiciones lo más fisiológicas posibles como es el caso de una solución salina balanceada enriquecida con plasma autólogo, ya que los nutrientes esenciales son provistos por el plasma del mismo individuo y no por un medio de cultivo o por SFB, mientras que la solución salina isotónica aporta iones como K^+ , Na^+ , Ca^{++} y Mg^{++} , glucosa como fuente de energía y un sistema amortiguador de pH.

Debido a esta situación experimental, la hipótesis de trabajo es, que las condiciones de cultivo propuestas, afecten la cinética de proliferación y la frecuencia de ICH, principalmente cuando esta se hace en presencia de un agente genotóxico como la MMC.

MATERIAL Y METODOS

Preparación de las Soluciones

La solución salina balanceada de Hank (SSB) se preparó de acuerdo a lo especificado por Paul (2), con reactivos de J.T. Baker, a excepción del rojo fenol que fue de Harleco y el cloruro de magnesio que fue de E. Merck, todos ellos con pureza de grado analítico.

Las soluciones se esterilizaron en autoclave a 20 lbs de presión durante 20 minutos, después se dejaron enfriar, se reposo el agua evaporada durante el proceso de esterilización, se agregaron antibióticos y se almacenaron a 4° C hasta su uso.

El amortiguador de fosfatos utilizado en la tinción diferencial de cromátidas hermanas se hizo con fosfato monopotásico 9.08 g/l (1/15 M) y 11.88g/l de fosfato disódico (1/15 M).

El colorante empleado en la tinción diferencial fue el azul de metileno Giemsa de Merck, a una concentración 1:10 en el amortiguador de fosfatos antes mencionado.

La solución hipotónica usada en la cosecha de los linfocitos

fue hecha con KCl a una concentración 0.075 M (5.59 g/l).

El medio de cultivo elegido como testigo fue el RPMI 1640 con L-Glutamina y bicarbonato de sodio de laboratorios GIBCO en su presentación de frascos de 100 ml.

La colchicina se preparó disolviendo 20 pastillas de 1 mg c/u de Cochi-Quim (Lab. Química y Farmacia S.A. de C. V.) en 100 ml de agua bidestilada y filtrando en Millipore (0.2 μ m) para su esterilización.

La solución de BrdU (SIGMA) se elaboró disolviendo 4 mg en 40 ml de agua bidestilada y esterilizando por filtración en Millipore, de igual manera que la colchicina.

La solución de Hoescht-33251 para la tinción diferencial de cromátidas hermanas se realizó disolviendo 1 mg del fluorocromo en 10 ml de agua bidestilada.

El plasma autólogo utilizado en los cultivos se obtuvo de la sangre de cada uno de los donadores por centrifugación a 1200 rpm durante 10 minutos.

Cultivos de linfocitos

Se extrajeron 60 ml de sangre periférica en jeringas heparinizadas, a cuatro individuos sanos, dos hombres y dos mujeres. La mitad de la sangre se dejó sedimentar para extraer el paquete de leucocitos y posteriormente plasma de la manera antes mencionada.

Se diseñaron cuatro tipos diferentes de cultivos, todos con un volumen final de 3 ml, con 3×10^6 leucocitos por frasco, 0.2 ml de PHA y 50 ug/ml de BrdU, de la siguiente manera: Los cultivos tipo A con medio de cultivo RPMI 1640, los tipo B con solución salina balanceada de Hank y los tipo C y D con solución de Hank suplementada con 1 ml de plasma autólogo. De acuerdo al número de glóbulos blancos contada en cámara de Neubauer, la cantidad de sangre total agregada a los tres primeros tipos de cultivos (A, B y C) varió entre 0.25 y 0.5 ml, cantidades similares se utilizaron del paquete de leucocitos para los cultivos del tipo D.

Se adicionó colchicina, 5×10^{-3} mg/ml, a cada frasco de cultivo, noventa minutos antes de cosechar a 36, 48, 60 y 72 horas. Al momento de la cosecha, los cultivos se centrifugaron en tubos cónicos a 1000 rpm durante 5 min., se extrajo el sobrenadante y se incubaron con solución hipotónica durante 20 min. a 37° C. Esta se desechó luego de una nueva centrifugación, y las células del paquete se fijaron en 5 ml con metanol-ácido acético glacial (3:1) durante 10 min. La suspensión celular así

fijada se centrifugó a 1000 rpm durante 5' y se quitó el sobrenadante y el paquete celular se lavó con fijador dos veces más y se resuspendió en 0.5 ml de fijador y se procedió a gotearlo sobre laminillas. En cada una se depositaron 5 gotas y se dejaron secar al aire, se codificaron para un análisis ciego y se trataron para obtener la tinción diferencial de cromátidas hermanas descrita por Perry y Wolff (30). Esta consistió brevemente, en teñir a las laminillas durante 20 min. con una solución del fluorocromo Hoeschst 33258, enjuagarlas con agua destilada y exponerlas a una lámpara de luz negra montadas en solución tampón de fosfatos, pH 6.8, durante 1.30 -2 horas. Después de este lapso, se volvieron a enjuagar con agua destilada y se tiñeron con Giemsa:solución tampón de fosfatos (1:10) durante 1.50 minutos y se secaron al aire.

Después de haber observado que los cultivos del tipo C tenían una cinética de proliferación similar a los del tipo D entre las 60 y 72 horas y siendo su implementación más sencilla, se decidió que para estudiar la inducción de ICH por MMC, se hicieran cultivos del tipo A y C de diferentes donadores, cada uno con diversas concentraciones de MMC: 10, 15, 20 y 40 ng/ml. El alquilante al igual que la BrdU se adicionaron a las 24 horas de iniciados los cultivos. Estos se cosecharon a las 66 horas, procesándolos de igual manera que en los cultivos anteriores.

Hallazgos previos (48), sugirieron que los linfocitos

expuestos a 40 ng/ml se cultivaran, asimismo, en SSB enriquecida con suero bovino, y en RPMI con plasma autólogo y con suero bovino respectivamente.

Análisis al microscopio

Indice mitóticos y Cinética de proliferación

Como los cultivos se hicieron por duplicado, para el registro de los índices mitóticos (IM), se tomó el promedio de ambos frascos contando el número de metafases presentes en el análisis de mil núcleos consecutivos en las laminillas de cada frasco. El mismo procedimiento se siguió para el análisis de la cinética celular, contándose 100 metafases consecutivas de cada frasco de cultivo para cada tiempo de cultivo y el promedio de las proporciones de las metafases de primera (M1), segunda (M2), tercera o subsecuente (M3), divisiones "in vitro" fue el que se usó para cada individuo.

Intercambios de cromátidas hermanas

En los cultivos tipo A, C y D se determinó la frecuencia basal de ICH analizando 30 metafases de segunda división "in vitro" con más de 43 cromosomas (52), obteniéndose en cada una de ellas la frecuencia de ICH/cromosoma. (En los cultivos tipo B no hubo suficientes M2 para el análisis). Como la distribución de

los ICH no es normal, para poder efectuar el análisis estadístico, se realizó la transformación logarítmica de los resultados para ajustarlos a una distribución normal, de la siguiente manera: se le sumó 1 a la frecuencia de ICH/cromosoma y se obtuvo el valor de su logaritmo decimal: $\text{Log}(1 + \text{ICH/cromosoma})$ (53). Para establecer la frecuencia de ICH inducida por MMC, en las diferentes condiciones de cultivo, se procedió de la misma manera.

Se utilizó la prueba de Ji cuadrada para comparar la distribución de frecuencias de M1, M2 y M3 en los distintos tipos de cultivo, y se decidió normalizar las frecuencias de ICH para aplicar una prueba de F, lo que permite analizar al mismo tiempo, la contribución, en los resultados obtenidos, de las diversas condiciones de cultivos y del hecho que los linfocitos analizados provienen de diferentes donadores.

RESULTADOS

Ciclo celular

En la tabla 2 se muestran las proporciones de M1, M2 y M3 de cada individuo, para las diversas horas de cultivo. Los promedios y las desviaciones estándar de M1, M2 y M3 en las distintas condiciones y tiempos en que se cultivaron los linfocitos de los cuatro individuos, se presentan en la tabla 3.

Tabla 2. Porcentaje de M1, M2 y M3 de cuatro donadores a 36, 48, 60 y 72 horas de cultivo.

Tipo de cultivo	Donador	36 Hs			48 Hs			60 Hs			72 Hs		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
A	1	99	1	0	45	55	0	45	36	19	7	26	67
	2	100	0	0	52	46	2	33	63	4	46	31	23
	3	100	0	0	NC*			39	43	18	43	36	18
	4	100	0	0	87	13	0	69	31	0	39	47	14
B	1	100	0	0	100	0	0	42	36	22	75	25	0
	2	100	0	0	98	2	0	77	23	0	80	17	3
	3	100	0	0	NC			53	47	0	43	53	4
	4	100	0	0	100	0	0	100	0	0	98	2	0
C	1	100	0	0	80	20	0	38	29	33	50	36	14
	2	99	1	0	75	24	1	51	44	4	16	33	51
	3	100	0	0	100	0	0	36	56	8	42	42	16
	4	100	0	0	99	1	0	94	6	0	76	24	1
D	1	99	1	0	46	50	4	30	52	18	67	18	15
	2	100	0	0	46	52	2	49	39	12	19	40	41
	3	100	0	0	83	17	0	65	35	0	43	41	16
	4	100	0	0	66	34	0	40	57	3	38	44	18

* NC: No crecio

Tabla 3. Promedios y D.E. de las frecuencias de M1, M2 y M3 en las diferentes condiciones de cultivo a 36, 48, 60 y 72 horas.

Tipo de cultivo		horas de cultivo			
		36 ⁽¹⁾	48 ⁽²⁾	60 ⁽²⁾	72 ⁽¹⁾
A	M1	99.7±0.5	61.5±22.8	46.5±15.8	34.0±18.2
	M2	0.2±0.5	38.1±22.5	43.5±14.3	34.9±9.0
	M3	0.0±0.0	0.5±0.8	10.0±9.6	31.1±24.3
B	M1	100.0±0.0	99.3±1.1	68.1±25.8	73.8±22.8
	M2	0.0±0.0	0.7±1.1	26.5±20.4	24.4±21.3
	M3	0.0±0.0	0.0±0.0	5.4±10.7	1.9±1.9
C	M1	99.7±0.5	88.6±12.7	54.8±26.9	46.1±24.7
	M2	0.2±0.5	11.1±12.3	34.1±21.8	33.6±7.7
	M3	0.0±0.0	0.2±0.5	11.0±14.7	20.2±21.6
D	M1	99.7±0.5	60.6±17.8	46.2±14.9	42.4±19.9
	M2	0.2±0.5	37.8±10.3	45.6±10.6	35.2±12.2
	M3	0.0±0.0	1.5±1.9	8.1±8.0	22.4±12.8

A: 3×10^4 leucocitos en sangre total cultivados en PPM 1640

B: 3×10^4 leucocitos en sangre total cultivados en SSB

C: 3×10^4 leucocitos en sangre total cultivados en SSB y plasma autóloga

D: 3×10^4 leucocitos cultivados en SSB y plasma autóloga

(1): No hubo diferencias entre A, B, C y D ($p > 0.05$)

(2): A y D difieren de C ($p < 0.05$), A y D no difieren entre sí ($p > 0.05$)

(3): A y C difieren de A ($p < 0.05$), A y C no difieren entre sí ($p > 0.05$)

Los promedios de las proporciones de M1, M2 y M3, no manifiestan diferencias entre los diversos tipos de cultivo ni entre los individuos a 36 horas de incubación, ya que todas las metafases registradas son de primera división. A las 48 horas, se observa lo mismo para los cultivos tipo B, pero en los C ya existe un valor de 11.1% de M2, mientras que en los cultivos tipo A y D se encuentran más de tres veces esta cantidad de M2 y una pequeña proporción de M3. Una prueba de Ji cuadrada revela que no existen diferencias estadísticas entre la distribución de frecuencias de M1, M2 y M3 entre A y D con una $p > 0.05$, mientras que ambos son distintos de C ($p < 0.05$). A las 60 horas, una cierta cantidad de M2 se halla en los cultivos de tipo B. Los cultivos A y D muestran patrones de cinética celular muy similares ($p > 0.05$), que son estadísticamente diferentes de los de C ($p < 0.05$) dado que este último presenta una mayor proporción de M1 y una menor cantidad de M2. A las 72 horas, se encuentran números muy similares de M1, M2 y M3 ($p > 0.05$) en los cultivos C y D, las que ahora difieren estadísticamente de las de A ($p < 0.05$), debido que en este último se observó una menor cantidad de M1 y una mayor de M3. Los valores obtenidos en los cultivos del tipo B difieren estadísticamente con los demás a partir de las 48 horas debido a que las células mostraron una cinética mucho más lenta en estas condiciones. Se puede observar también en la tabla 3 la variación interindividual en la cinética de proliferación, en todas las condiciones de cultivo, después de las 36 horas.

Si tomamos en cuenta los cambios observados en las proporciones de M1, M2 y M3 en los cultivos del tipo B a los diferentes tiempos de cultivo, podemos inferir una duración del ciclo celular del linfocito en estas condiciones de cultivo, de aproximadamente 24 horas, mientras que para los tipos A y D es menor, alrededor de 12 horas, y un poco más de 12 horas para los cultivos del tipo C.

Los resultados del cálculo del índice de replicación (IR) sugeridos por Ivett y Tice (54), que se muestran en la tabla 4, confirman lo mencionado por estos autores. Los cultivos que evidencian los valores más altos en sus IR tienen el ciclo más corto, como los tipo A, C y D.

Ciclo celular en presencia de MMC

En la tabla 5 se presentan los promedios y las desviaciones estándar de las proporciones de M1, M2 y M3 obtenidas en los cultivos de linfocitos de dos donadores, después de 66 horas de incubación, cuando se estudió la inducción de ICH por 40 ng/ml de MMC. En ausencia del alquilante, los cultivos iniciados con SSB y suero bovino, muestran la proliferación más lenta, seguidos luego de los linfocitos cultivados en SSB suplementada con plasma autólogo, en éstos últimos, la frecuencia promedio de M1, M2 y M3 es similar a la obtenida en el estudio de cinética inicial (ver

Tabla 4. Indices de replicación obtenidos después de 36, 48, 60 y 72 horas en los cultivos tipos A, B, C y D.

Tipo de cultivo	Horas de Cultivo			
	36	48	60	72
A	1.00	1.39	1.63	1.97
B	1.00	1.00	1.37	1.28
C	1.00	1.11	1.66	1.74
D	1.00	1.41	1.62	1.78

A: 3×10^6 leucocitos en sangre total cultivados en RMI 1640

B: 3×10^6 leucocitos en sangre total cultivados en SSB

C: 3×10^6 leucocitos en sangre total cultivados en SSB y PA

D: 3×10^6 leucocitos en SSB y PA

TABLA 5. Promedios y D.E. de las frecuencias de M1, M2 y M3 en diferentes condiciones de cultivo

	CONDICIONES DE CULTIVO									
	SS Hant c/S.B.		SS Hant c/P.A.		RPMI		RPMI c/S.B.		RPMI c/P.A.	
	-RMC	+RMC	-RMC	+RMC ^a	-RMC ^b	+RMC ^c	-RMC ^a	+RMC ^d	-RMC ^a	+RMC ^d
M1	78.5±4.9	-	46.0±9.9	42.5±4.9	15.5±3.5	69.5±2.1	23.0±1.4	88.5±7.7	26.5±0.7	93.0±9.8
M2	18.0±0	-	37.0±1.4	33.5±0.7	24.0±0	30.5±2.1	25.5±2.1	11.5±7.7	28.5±0.7	7.0±9.8
M3	3.5±4.9	-	17.0±11.3	4.0±4.2	58.5±3.5	0	51.5±0.7	0	45.0±0	0

+RMC: 40 µg/ml

(a) difieren estadísticamente p<0.05

(b) difieren estadísticamente p<0.01

(c) difieren estadísticamente p<0.05

(d) difieren estadísticamente p<0.001

tabla 3, cultivos tipo C). En cambio, los cultivos testigos iniciados con RPMI solo y enriquecido con plasma o SB, revelan la cinética de proliferación más rápida. Una prueba de Ji cuadrada, sin embargo, demuestra diferencias significativas ($p < 0.05$), entre los cultivos con RPMI solo y RPMI suplementado. Mientras que, entre estos últimos, el ciclo no es distinto ($p > 0.05$), ya sea que se emplee suero o plasma.

En presencia de 40 ng/ml de MMC, los linfocitos no son capaces de proliferar en la SSB suplementada con suero bovino. El resto de los cultivos evidencia un retraso en su ciclo celular, siendo ahora mayor en donde el RPMI fue suplementado. Las frecuencias de M1, M2 y M3 que se obtuvieron en los cultivos iniciados tanto con RPMI solo, como con SSB y PA, fueron muy similares ($p > 0.05$) y estadísticamente diferentes de las observadas en los cultivos de linfocitos con RPMI suplementado.

Indices mitóticos

En la tabla 6 se presentan los índices mitóticos (IM) en los diferentes horarios para las distintas condiciones de cultivo, de cada individuo. En la figura 3, se promedian los IM de los cuatro donadores y se pueden ver las curvas de distribución de los valores obtenidos a 36, 48, 60 y 72 horas para los cultivos A, B, C y D. Los promedios muestran que A y C tienen valores similares a 36 horas, mientras que D tiene un IM muy elevado,

Tabla 6. Indices Mitóticos de los individuos en los cultivos tipo A, B, C y D. a 36, 48, 60 y 72 horas.

Tipo de Cultivo	Individuo	Horas de cultivo			
		36	48	60	72
A	1	14.5	20.5	12.0	17.0
	2	0	14.5	14.5	14.0
	3	0	NC*	17.0	10.5
	4	3.0	8.0	18.0	11.0
B	1	0	14.0	11.0	3.0
	2	0	2.0	7.5	4.0
	3	0	0	2.0	5.0
	4	0	2.0	2.0	5.0
C	1	9.0	20.0	13.5	8.0
	2	3.0	18.5	8.5	15.0
	3	0	10.5	10.5	11.5
	4	0	NC	4.5	NC
D	1	35.0	19.5	7.5	7.5
	2	2.5	29.0	25.5	5.0
	3	3.0	3.5	24.0	6.5
	4	15.5	12.0	13.0	6.0

*NC: no crecio

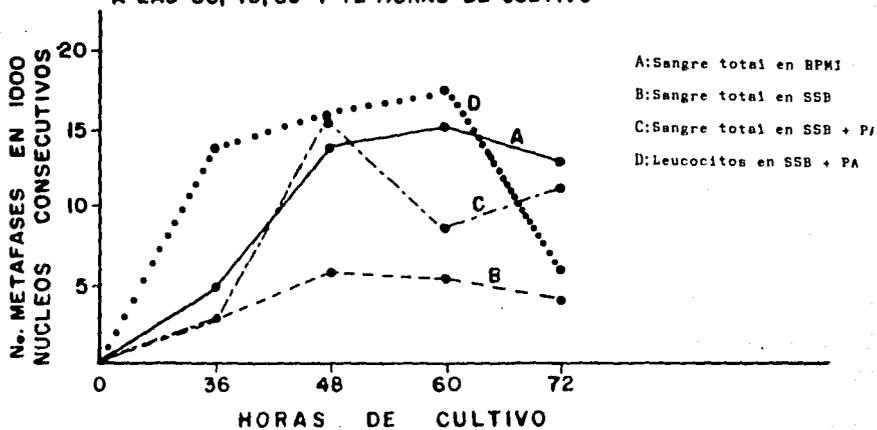
A: 3×10^6 leucocitos en sangre total cultivada en RPMI 1640

B: 3×10^6 leucocitos en sangre total cultivada en SSB

C: 3×10^6 leucocitos en sangre total cultivados en SSB y PA

D: 3×10^6 leucocitos en SSB y PA

FIG.3 PROMEDIO DE LOS INDICES MITOTICOS DE LOS CUATRO INDIVIDUOS EN LOS EXPERIMENTOS A,B,C Y D A LAS 36, 48, 60 Y 72 HORAS DE CULTIVO



dado principalmente por los datos de uno de los individuos. A las 48 horas, A, C y D evidencian valores similares, entre 12 y 16 mitosis por 1000 células mononucleares. Los IM de los cultivos tipo A y D son similares también a 60 horas, y mayores que los del tipo C que comienzan a decaer lentamente, a las 72 horas, mientras que A mantiene su promedio, en los del tipo D se manifiesta un pronunciado decremento. Los índices mitóticos obtenidos en los cultivos del tipo B, tienen una curva de distribución muy plana con valores entre 0 a las 36 y no más elevados de 5.6 a las 60 horas.

Intercambios de cromátidas hermanas

Los promedios y las desviaciones estándar de las frecuencias basales de ICH por cromosoma, para los individuos I, II y III en los cultivos tipo A, C y D pueden observarse en la tabla 7. Los resultados entre paréntesis son los valores obtenidos después de la transformación logarítmica. Una prueba de F demostró que no existen diferencias estadísticamente significativas de las frecuencias de ICH entre los individuos ni entre los diferentes tipos de cultivo ($p > 0.05$).

En la tabla 8 se presentan las frecuencias de ICH por cromosoma inducidas por distintas concentraciones de MMC en cultivos de diversos individuos. Una prueba de F en los grupos testigos demuestra que no existen diferencias estadísticamente

TABLA 7. Promedios y D.E. de las frecuencias basales de ICH en diferentes condiciones de cultivo

Tipo de cultivo	Individuo		
	1	2	3
A	0.155±0.065 (0.062±0.025)*	0.184±0.068 (0.073±0.025)*	0.149±0.074 (0.059±0.027)*
C	0.163±0.070 (0.065±0.026)*	0.205±0.081 (0.080±0.028)*	0.132±0.052 (0.052±0.020)*
D	0.171±0.063 (0.068±0.023)*	0.164±0.091 (0.065±0.033)*	0.147±0.053 (0.059±0.020)*

*log (1+ICH/crom)

A: sangre total en RPM; 16%

B: sangre total en SSE y plasma autoi.

C: Leucocitos en SSE y plasma autoi.

F entre cultivos=4.94 F(0,95) (2,4)=6.94

F entre indiv.=0.88 F(0,95) (2,4)=6.94

TABLA 8. Frecuencias de ICH inducidas por MMC en diferentes condiciones de cultivo

Condiciones de cultivo	MMC 20ng/ml		MMC 15ng/ml		MMC 10ng/ml	
	Testigos		Testigos		Testigos	
RPM1	0.147±0.066	0.518±0.159	0.177±0.063	0.328±0.099	0.180±0.080	0.293±0.095
1640	0.070±0.022*	0.184±0.037*	0.070±0.022*	0.122±0.032*	0.071±0.030*	0.110±0.031*
SSB	0.151±0.079	0.487±0.165	0.143±0.060	0.252±0.094	0.141±0.044	0.241±0.073
PA	0.062±0.027*	0.175±0.041*	0.056±0.023*	0.094±0.032*	0.057±0.017*	0.093±0.025*

*log (1+ICH/crom.)

F entre cultivos=1.2<(F(0.95)(1,2)=18.5)

F entre testigos=14.3<(F(0.95)(2,2)=19.00)

significativas ni entre los individuos ni entre las condiciones en que se cultivaron los linfocitos ($p > 0.05$). Las diferencias entre testigos y expuestos fueron significativas en todos los casos ($p < 0.05$) cuando se compararon a través de una prueba de "t", la que sin embargo, mostro que no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) entre los ICH provocados por la MMC en RPMI 1640 versus los inducidos en los linfocitos cultivados en solución de Hank suplementada con PA.

Por la falta de una cantidad adecuada de segundas divisiones "in vitro", no se pudieron comparar las frecuencias de ICH inducidas por 40 ng/ml de MMC en solución salina y plasma autólogo versus las producidas en los linfocitos cultivados en medio RPMI.

DISCUSION

Cinética celular

Los resultados obtenidos demuestran que la proliferación de los linfocitos humanos en SSB de Hank suplementada con plasma autólogo es similar a la observada en medio de cultivo RPMI 1640.

Este hecho es especialmente evidente si comparamos la cinética celular en los cultivos donde se utilizó sangre total en RPMI versus la obtenida con el paquete leucocitario en SSB y PA (cultivo tipo D) a 48 y 60 horas. Las proporciones de M2 en estos cultivos son mayores que las encontradas por Wolff y col. (8) con RPMI y comparables con las halladas por Crossen y Morgan y Mutchinick y col. (6, 21), quienes usando diferentes medios de cultivo descubrieron que a 48 horas de incubación, cerca de la mitad de las metafases fueron segundas divisiones .

Si bien, a las 72 horas se notó una mayor cantidad de M1 en los cultivos enriquecidos con PA (tipos C y D) que en los iniciados con RPMI, estas proporciones de primeras divisiones, fueron menores aún que las reportadas por Giuliotto y col. (27) y Sinha y col. (7) a 77 y 72 horas usando medio mínimo esencial de Eagle y/o medio TC 199 respectivamente, siendo sus resultados comparables a los obtenidos en los cultivos testigos con 66 horas de incubación en SSB suplementada con SB (Tabla 5). En ellos, la proporción de M1 fue de casi dos veces la observada en SSB suplementada con PA para el mismo periodo de incubación, lo que sugiere que el SB no resulta tan adecuado como el plasma autólogo para enriquecer la solución salina de Hank.

Las diferencias observadas entre los linfocitos cultivados en SSB y en SSB suplementada con PA, hace evidente que es el plasma autólogo el que contiene los factores y nutrientes

necesarios para la proliferación adecuada de los linfocitos humanos "in vitro". Sin embargo, estas células pudieron dividirse por algunos ciclos en SSB sola (Tablas 2, 3), probablemente porque la sangre que las contenía aportó la cantidad mínima necesaria de nutrientes. Este hecho puede representar una herramienta útil para estudiar la expresión de sitios frágiles en los cromosomas, inducidos por privación de nutrientes en los medios de cultivo (55).

Estos hallazgos sugieren que, aunque el medio sintético es de 4 a 5 veces más rico en vitaminas y aminoácidos (2) que la solución salina de Hank enriquecida con plasma humano (56), una cantidad comparable de mitosis y una cinética de proliferación celular similar pueden obtenerse en estas condiciones, que representan una situación fisiológica más natural para estudios de genotoxicidad, ya que los nutrientes y factores no son aportados por una mezcla formulada artificialmente, sino por el tejido de cada individuo de donde fueron extraídas las células para iniciar los cultivos.

La similitud observada entre los cultivos testigos y los iniciados con SSB y PA, en cuanto a cinética, índice mitótico, índice de replicación y reproducibilidad, sugieren que la solución de Hank suplementada con plasma autólogo puede reemplazar exitosamente el medio sintético enriquecido o no con SFB en cultivos breves de linfocitos. Estas observaciones son

consistentes con hallazgos previos de Ling y Kay (4) y otros (5), que demuestran que la transformación es mayor y el ciclo más rápido cuando el medio de cultivo está enriquecido con suero humano o con PA en vez de SFB, respectivamente.

Según la tabla 5, en los cultivos testigos iniciados con RPMI suplementado con PA o con suero bovino, se nota un retraso en la proliferación celular, comparados con los iniciados con RPMI solo, similar a la descrita por Wolf y col. (8). Este retraso puede estar mediado por la activación de un forma inhibidora de la proteína cinasa C, via receptores en la membrana a factores del suero (o plasma), según hallazgos reportados en líneas celulares de ratón y de conejo (57).

Por otro lado, cuando los linfocitos fueron expuestos a 40 ng/ml de MMC, los cultivos que tienen mayor retraso en su CC en presencia del alquilante son los iniciados con RPMI, especialmente los enriquecidos con suero o plasma. Morimoto (25), observó que cuando las dosis del alquilante producen altas frecuencias de ICH, inducen concomitantemente, retrasos proporcionales en el ciclo celular. Se puede afirmar entonces que los linfocitos cultivados en medio sintético presentaron una mayor sensibilidad al alquilante que los que proliferaron en SSB con plasma autólogo. Es factible que, como la MMC adquiere sus propiedades alquilantes cuando es activada por reductasas intracelulares (50), esta acción enzimática sea mayor en los

cultivos iniciados con RPMI suplementado, y de esta manera la cantidad de MMC activada en ellos sería mayor (58), explicándose así el retraso en su ciclo celular.

Este hallazgo de la proliferación diferencial de los linfocitos en presencia de concentraciones de MMC que inducen no solo ICH sino también, aberraciones cromosómicas (25), puede correlacionarse con los requerimientos farmacológicos que hacen de la MMC un agente antineoplásico utilizado preferentemente en tumores cancerosos con alta actividad reductora (50).

La confirmación de estas observaciones con estudios posteriores, permitiría implementar un sistema de prueba con actividades metabólicas diferenciales de una manera sencilla, simplemente variando la cantidad de plasma autólogo con la que se enriquece la SSB y/o reemplazando a esta última por medio sintético.

Intercambios de cromátides hermanas

Se ha postulado que distintos tipos de medios y de sueros influyen en las frecuencias de ICH, debido a las diferencias que existen entre ellos en cuanto a niveles de ácido fólico y de timidina, por lo que para cada medio de cultivo, de acuerdo con esto, habría que determinar la concentración óptima de BrdU a agregar, para no influir en la generación de ICH (26). Siguiendo

este razonamiento, se podría pensar, que como no se encontraron diferencias ni entre las frecuencias basales ni entre las inducidas por 10, 15 o 20 ng/ml de MMC, que fueron las que se pudieron comparar, no existirían diferencias marcadas entre ellas en cuanto a estas sustancias, en las distintas condiciones de cultivo que se estudiaron, o sea : RPMI y SSB con PA.

CONCLUSIONES

-La solución salina balanceada de Hank suplementada con plasma autólogo, resulta una mezcla adecuada para la proliferación de linfocitos humanos "in vitro".

-Las frecuencias de ICH basales en estas condiciones de cultivo, al igual que las inducidas por 10, 15 y 20 ng/ml de MMC, no varían con las obtenidas en RPMI 1640.

-Constituye un sistema de cultivo muy barato que permite obtener una cantidad adecuada de metafases tanto para los estudios de citogenética clínica como para la investigación de efectos genotóxicos.

-La alteración de la proliferación de los linfocitos por xenobióticos, está influenciada por las sustancias presentes en el medio de cultivo.

BIBLIOGRAFIA

1. Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. (1989) Molecular biology of the cell. Garland Publishing Inc. New York.
2. Paul, J. (1975) Cell and tissue culture. Churchill Livingstone, London, p.446.
3. Ling, N.R. y Kay, J. E. (1975) Lymphocyte stimulation. North Holland, Amsterdam.
4. Roitt, I. M., Bronstoff, J. y Male, D. E. (1989). Immunology. C.V. Mosby, Missouri. p.2.2.
5. Auf der Maur, F. y Berlingourt-Bohni, L. (1975) Human lymphocyte cell cycle: Studies with the use of BrdU. Hum. Genet. 49: 209-215.
6. Mutchnick, G., Kup, L. y Casas, L. (1980) Time of first generation metaphases: The effect of various culture media and of fetal calf serum in human lymphocyte cultures. Mutation Res. 71: 127-134.
7. Sinna, A. J., Linscombe, V. E., Gollapudi, B. B. y Flake, R. E. (1984) Evaluation of culture media for effects on cell cycle kinetics and incidence of chromosomal aberrations in human blood cells. Can. J. Genet. Cytol. 26: 7-12.
8. Wolff, S., Haber, V. y Lindqvist, F.B. (1969) Cultured human lymphocytes proliferate faster in medium lacking fetal calf serum and antibiotics. Mutation Res. 70:241-250.
9. Prescott, D. M. (1976) Reproduction of the eucaryotic cells. Academic Press, New York.
10. Fardeas, A.E., Duthrow, F., Hamlin, J. L. y Kleijnen R. F. (1978) Animal cell cycle. Ann. Rev. Biochem. 47: 715-750.
11. Marcus, M., Fainrod, A. y Diamond, G. (1985) The Genetic analysis of mammalian cell cycle mutants. Ann. Rev. Genetics 19:385-421.
12. Andreeff, M. (1980) Cell kinetics of leukemia. Semin. Hematol. 23:309-314.
13. Lajtha, L. G., Oliver, R. y Gurney, C. W. (1982) Kinetics model of a bone-marrow stem-cell population. Brit. J. Haematol. 8:442-460.

14. Means, A. R., Tash, J. S. y Chafouleas, J. G. (1982) Physiological implications of the presence, distribution and regulation of calmodulin in eukaryotic cells. *Physiol. Rev.* 62:1-39.
15. Waite, W. I., Renaud, J., Nadeau, P. y Pallota, D. (1983) Histone synthesis by lymphocytes in G₀ and G₁. *Biochemistry* 22:1778-1783.
16. Matsui, Y., Shapiro, H. N., Sheehy, M. J., Christenson, L., Stauton, D. E., Eynon, E. E. y Yunis, E. J. (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.
17. Delegeane, A. M. y Lee, A. S. (1982) Coupling of histone and DNA synthesis in the somatic cell cycle. *Science* 215:79-81.
18. Klaus, G. G. F. y Harkylosian, L. M. (1984) Cell cycle control in lymphocyte stimulation. *Immunol Today* 5:15-19.
19. Taylor, I. W. y Hudson, F. J. (1984) Cell cycle regulation by environmental pH. *J. Cell Physiol* 121:517-525.
20. Speit, G., Durong, R., Mehrent, I. (1980) Variation in the frequency of sister chromatid exchanges in repeated human lymphocyte cultures. *Hum. Genet.* 51:177-181.
21. Crossen, F. E. y Horain, W. F. (1977) Analysis of human lymphocyte cell cycle time in cultures measured by sister chromatid differential staining. *Exp. Cell Res.* 104:453-457.
22. Beel, E. y Obe, G. (1979) Sister chromatid exchanges in human leucocyte chromosomes: Spontaneous and induced frequencies in surviving sister-proliferating cells in vitro. *Hum. Genet.* 49:51-61.
23. Chen, H. H., Neuh, C. L., Simeoni, S. R. y Huang, C. C. (1981) Induction of sister chromatid exchanges and cell cycle delay in cultured mammalian cells treated with eight organophosphorous pesticides. *Mutation Res.* 88:307-316.
24. Singh, N. P. y D'Ambrosio, S. M. (1984) Sister chromatid exchange frequency and cell cycle kinetics in cancer patients treated with cytostatic drugs. En: Tice, R. R. y Hollaender, A. (Eds) *Sister Chromatid Exchanges, 25 years of experimental research*, Part B. Plenum press, New York, pp. 885-893.
25. Morimoto, K. (1984) Proliferative kinetics and chemical-induced sister chromatid exchanges in human lymphocyte

cultures. Eds: Tice, R. R. y Hollaender, A. (Eds) Sister Chromatid Exchanges, 25 years of experimental research, Part B. Plenum Press, New York, pp. 677-693.

26. Das, B.C. (1988) Factors that influence formation of sister chromatid exchanges in human blood lymphocytes. *CRC Critical Reviews in Toxicology*, Vol 19, Issue 1, pp. 43-86.
27. Giullotto, E., Mottura, A., Giorgi, R., de Carli, L. y Nuzzo, F. (1980) Frequencies of sister chromatid exchanges in relation to cell kinetics in lymphocyte cultures. *Mutation Res.* 70: 347-350.
28. Taylor, J.H. (1958) Sister chromatid exchanges in tritium-labelled chromosomes. *Genetics* 43: 515-519.
29. Latt, S. A. (1974) Sister chromatid exchanges in human chromosomes. *Science* 185:74.
30. Perry, F. y Wolff, S. (1974) New Giemsa method for differential staining of sister chromatids. *Nature (London)* 261: 156.
31. Goto, T., Maeda, S., Iano, T. y Sugiyama, T. (1978) Factors involved in differential Giemsa-staining of sister chromatids. *Chromosome Res.* 251-259.
32. Buys, C. H. L. M., van der Velden, H. J. (1982) Different effects of 3H-thymidine and 3H-TdR in fluorescent staining of sister chromatid differentially substituted with bromodeoxy uridine. *Histochem.* 75: 169-177.
33. Latt, S. A., Schreck, R. R., D'Andrea, A., Laiser, T. N., Schlesinger, A., Lester, S. y Sarai, I. (1984) Detection, significance and mechanism of sister chromatid exchange formation: past experiments, current concepts, future challenges. Eds: Tice, R. R. y Hollaender, A. (Eds) Sister Chromatid Exchanges, 25 years of experimental research, Part A. Plenum Press, New York, pp. 81-100.
34. Guttorf, G., Bernheim, E., and Schaefer, J. P. (1984) Endonuclease-independent and endonuclease-dependent SCEs as components of SCE yields: implications for their cellular significance. Eds: Tice, R. R. y Hollaender, A. (Eds) Sister Chromatid Exchanges, 25 years of experimental research, Part A. Plenum Press, New York, pp. 83-90.
35. Painter, R. B. (1980) A replication model for sister-chromatid exchange. *Mutation Res.*, 70: 337-341.
36. Morales-Ramirez, F., Rodriguez-Reyes, R., and Vallarino-Kelly, T. (1990) Fate of DNA lesions that elicit sister-chromatid exchanges. *Mutation Res.* (in press).

37. Bloom, S. E. y Hsu, T. C. (1975) Differential fluorescence of sister chromatids in chicken embryos exposed to 5-bromodeoxyuridine. *Chromosoma* 51: 261-267.
38. Allen, J. W. y Latt, S. A. (1976) In vivo BrdU-33258 Hoescht analysis of DNA replication kinetics and sister chromatid exchange formations in mouse somatic and meiotic cells. *Chromosoma* 58: 325-340.
39. Latt, S. A., Schreck, R. R., Loveday, L. S. y Shuler, C. F. (1979) In vitro and in vivo analysis of sister chromatid exchange. *Pharmacol. Rev.* 30: 501-535.
40. Sharma, I. y Das, B. C. (1981) Culture media and species related variations in the requirement of 5-bromodeoxyuridine for differential sister chromatid staining. *Mutation Res.* 70: 327-341.
41. Lambert, L., Biatti, R. F. y Ardito, G. (1983) Cell kinetics and sister-chromatid exchange frequency in human lymphocytes. *Mutation Res.* 120: 193-196.
42. Matsubara, S., Sugita, S. y Tombara, Y. (1984) The effects of diagnostic media and contrast media on lymphocyte chromosomes. *Hum. Genet.* 19: 115-120.
43. Kato, H. (1975) Spontaneous and induced sister chromatid exchanges as revealed by the BrdU-labelling method. *Int. Rev. Cytol.* 41: 53-69.
44. Kato, H. y Landberg, G. A. (1977) The effect of sera on sister chromatid exchanges in vitro. *Exp. Cell Res.* 109: 443-447.
45. Gosh, P. L. y Nandi, K. (1979) Reduced frequency of sister chromatid exchanges in human lymphocytes cultured with autologous serum. *Hum. Genet.* 51: 167-169.
46. Mc Fee, A. F. y Sherrill, M. K. (1981) Mitotic response and sister chromatid exchanges in lymphocytes cultured in sera from different sources. *Experientia* 37: 27-30.
47. Das, B. C. y Sharma, I. (1983) Reduced frequency of baseline sister chromatid exchanges in lymphocytes grown in antibiotic and serum-excluded culture medium. *Hum. Genet.* 64: 249-251.
48. Wiecke, J. K., Hesley, K., Kreig, R. y Garry, V. F. (1984) Serum and plasma-dependent variations of benzo(a)pyrene-induced sister chromatid exchange in human lymphocytes. *Basic Life Sci.* 25 (Part B) 715-722.
49. Rodriguez Carranza, R. (1984) *Vademecum académico de medi-*

- camentos. Tomo II. Ediciones Difusión Académica UNAM. p.591.
50. Katzung, B. G. (1987) *Farmacología Básica y Clínica El Manual Moderno S. A. de C. V.* pp. 686-700.
 51. Kato, H. y Shimada, H. (1975) Sister chromatid exchanges induced by Mitomycin C, a new method of detecting DNA damage at chromosomal level. *Mutation Res.* 28: 459-464.
 52. Carrano, A. V. y Natarajan, A. T. (1988) Considerations for population monitoring using cytogenetic techniques. *Mutation Res.* 204: 379-406.
 53. Palmer, R. G., Dore, L. J., Henderson, L. y Benman, A. M. (1987). Sister chromatid exchange frequencies in fibroblasts and lymphocytes of patients with systemic lupus erythematosus. *Mutation Res.* 177: 125-132.
 54. Ivett, J. L. y Tice, R. R. (1982) Average generation time: a new method of analysis and quantitation of cell proliferation kinetics. *Environ. Mutagen.* 4:356 (abstract).
 55. Sutherland, G. R. and Hecht, F. (1985) En: *Fragile Sites on Human Chromosomes*. Oxford Monographs on Medical Genetics No. 13. Oxford University Press. New York. pp.59-76.
 56. Strand, F. L. (1978) *Physiology*. Mac Millan. New York. p. 556.
 57. Hoshijima, M., Kawahara, K. y Goto, T. (1986) Negative actions of protein kinase C on the regulation of cell proliferation. En: *Growth Factors, Cell Growth and Differentiation*. Gunga University (eds.). Gunga Symposium on Endocrinology. Vol. 25. Tokyo. pp. 51-68.
 58. Littlefield, G. L., Coover, S. F. y Du Frain, K. J. (1981) Physical, chemical and biological factors affecting sister chromatid exchange induction in human lymphocytes exposed to mitomycin C prior to culture. *Mutation Res.* 81: 371-386.