

39  
2 ej



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EFFECTO DE LA OCTILGUANIDINA SOBRE LA DIVISION  
CELULAR DE LOS LINFOCITOS DE HUMANO  
EN CULTIVO

T E S I S  
Que para obtener el Titulo de  
B I O L O G O  
p r e s e n t a

Constantino Bernardo Cuetos Martinez

FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1 9 9 0



## **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.

## CONTENIDO

	Página
I RESUMEN	3
II INTRODUCCION	6
a) DERIVADOS DE LAS AMIDINAS	
b) ALGUNAS CARACTERISTICAS DE LAS GUANIDINAS	
c) PRESENCIA Y EFECTO DE GUANIDINAS Y SUBSTANCIAS DERIVADAS EN LOS ORGANISMOS	
d) OCTILGUANIDINA	
e) CULTIVOS DE SANGRE PERIFERICA	
III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
IV MATERIALES Y METODOS	19
V RESULTADOS Y DISCUSION	23
VI CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS	33
VII BIBLIOGRAFIA	34
VIII APENDICE	38

## I RESUMEN

Entre los derivados de las amidinas se encuentran moléculas que presentan el ión amidinium cuya característica es la de tener resonancia entre los dos grupos aminos que están unidos al átomo de carbono, el que puede estar unido directamente a un radical alquilico como en las amidinas o a través de un grupo imino para formar las alquilguanidinas; este grupo presenta propiedades que lo hacen objeto de estudio tanto por sus características fisicoquímicas, como por la presencia y efectos de sustancias con grupo guanidino en los organismos, ya sea en forma natural, como agentes terapéuticos o en experimentación. La octilguanidina (8G) es una alquilmonoguanidina que se ha utilizado para explorar sus efectos principalmente en los sistemas enzimáticos que dependen de iones metálicos en las membranas de diversos sistemas biológicos.

Debido a que los linfocitos presentan proliferación clonal después de ser estimulados por antígenos, representan un buen modelo para el estudio de los fenómenos relacionados con la división celular; y a que la fitohemaglutinina (PHA) es una lectina que puede interactuar con grupos de carbohidratos presentes en las membranas y es capaz de estimular a los linfocitos en cultivo e inducirlos a que se dividan, mediante la interacción de la PHA con su probable receptor a nivel de membrana; se considera la posibilidad de que la 8G interaccione a nivel de la membrana celular de los linfocitos en cultivo y esto modifique la afinidad de los probables receptores a la PHA, de lo que dependería en un momento dado, la inducción de la división celular de los linfocitos de humano para el tipo de cultivo utilizado en este trabajo.

Se realizaron 16 experimentos con 3 muestras para cada tratamiento, con base en la microtécnica de Arakaki y Sparkes modificada con sangre de humano periférica completa incubada a 37 C durante 72 horas; los experimentos se efectuaron con las siguientes variantes: sangre completa sin PHA ni 8G para la observación de la proliferación celular sin estimulación (experimento piloto); 8G a dosis de 19, 56 y 190  $\mu\text{M}$  al momento de la siembra, con y sin PHA y con y sin choque hipotónico para saber si a estas concentraciones la 8G interviene en la respuesta mitogénica y determinar si la presencia de la PHA y el empleo del choque hipotónico son necesarios para la inducción y observación, respectivamente, de figuras mitóticas (experimentos preliminares); 8G en concentraciones de 0.19 hasta 13  $\mu\text{M}$ , con PHA a la siembra, para obtener una curva dosis-respuesta por medio del análisis citogenético directo (experimentos dosis-respuesta); las mismas dosis de 8G utilizadas anteriormente, pero sin PHA, para saber si su presencia es necesaria para la inducción de la proliferación celular aún cuando a estas concentraciones de 8G se produzca algún tipo de respuesta (experimento sin PHA); las concentraciones de 8G empleadas para la obtención de la curva dosis-respuesta para evaluar la respuesta de los linfocitos por medio de la incorporación de timidina tritiada (experimentos dosis-respuesta con timidina); 1.9  $\mu\text{M}$  de 8G a diferentes tiempos de agregación y PHA al momento de la siembra, para averiguar si la adición de la

8G a diferentes tiempos modifica el comportamiento de la PHA (experimento efecto de la 8G a diferentes tiempos); y PHA a diferentes tiempos de agregación con 1.9  $\mu\text{M}$  de 8G al momento de la siembra para saber si la adición de la 8G antes de la PHA, modifica la respuesta de la PHA agregada a diferentes tiempos de agregación después de la siembra (experimento efecto de la PHA a diferentes tiempos).

Para la evaluación de los resultados se utilizaron los criterios del análisis citogenético directo y la incorporación de timidina tritiada; el tratamiento estadístico de los datos consistió en obtener el valor promedio de las repeticiones para cada tratamiento, determinar la desviación estándar, el error estándar y el porcentaje del promedio con respecto al control, el cual se utilizó para la elaboración de las tablas e histogramas correspondientes.

En el experimento piloto no se observaron figuras mitóticas, por lo que se consideró que la presencia de inductores mitogénicos es necesaria para la división celular de los linfocitos de humano para este tipo de cultivo. En los experimentos preliminares se observó que a concentraciones mayores de 19  $\mu\text{M}$  de 8G no hubo figuras mitóticas, a concentraciones de 5.6 y 1.9  $\mu\text{M}$  hubo figuras mitóticas en 71.7 y 114.3% respectivamente, por lo que estas concentraciones se consideran dentro del intervalo adecuado para producir algún tipo de respuesta observable y la PHA y el choque hipotónico son necesarios para la inducción y obtención de figuras mitóticas respectivamente.

Los resultados obtenidos en los experimentos dosis-respuesta, sugieren dos tipos de comportamiento en la curva obtenida, uno con dosis de 0.56 a 1.9  $\mu\text{M}$  de 8G que presenta mayor porcentaje de figuras mitóticas que su control, y otro con dosis de 5.6 a 19  $\mu\text{M}$  que presenta menor porcentaje de figuras que el control; en la revisión de las figuras mitóticas se observó un mayor porcentaje de anafases a la concentración de 9.5  $\mu\text{M}$  de 8G; en el análisis citogenético directo no se observaron aberraciones cromosómicas, tal vez debido al empleo de colcemid.

Con relación al experimento sin PHA no se observaron figuras mitóticas, por lo que se puede decir que la 8G por sí sola no tiene efecto de inducción sobre la división celular para este tipo de cultivos. En los experimentos dosis-respuesta con timidina, se observó un perfil parecido al obtenido en los experimentos con dosis de 8G similares para figuras mitóticas, aunque al comparar los datos de este grupo con timidina contra su control, todos están por debajo del mismo. Los resultados obtenidos en el experimento: efecto de la 8G a diferentes tiempos, indican en general una respuesta por debajo de su control; la 8G agregada a los 45 y 60 minutos después de la siembra, para incorporación de timidina tritiada y figuras mitóticas respectivamente, mostraron una menor influencia sobre la respuesta de los linfocitos que en las demás condiciones experimentales utilizadas. Para el experimento: efecto de la PHA a diferentes tiempos de agregación se encontró que la PHA al momento de la siembra y a los 45 minutos después de la misma, para figuras mitóticas, produjeron mayor número de figuras con

relación a los demás tiempos de agregación; la PHA agregada a los 15 minutos después de la siembra, para incorporación de timidina tritiada, mostró menor actividad inductora que en las demás condiciones experimentales utilizadas.

Los resultados es estos 2 últimos experimentos muestran en general, una respuesta por debajo de sus respectivos controles; se desconoce la causa de estos comportamientos en ambos experimentos.

Se considera la posibilidad de que en función de la concentración de 8G, se modifique la permeabilidad de la membrana celular, lo cual podría facilitar o dificultar la interacción de la PHA con su posible receptor para formar el complejo: PHA-receptor, el cual iniciaría los fenómenos bioquímicos a nivel de membrana que conducen a la división celular de los linfocitos de humano en este tipo de cultivo. Asimismo, se hacen consideraciones teóricas sobre otros posibles mecanismos y se sugieren algunas ideas para la continuación de este trabajo.

## II INTRODUCCION

### a) DERIVADOS DE LAS AMIDINAS

Los derivados de las amidinas poseen un grupo básico fuerte que corresponde al ión amidinium (Fig.1) el que presenta la característica de tener resonancia entre los dos grupos aminos que estan unidos al átomo de carbono:



figura 1

En donde R es un radical alquílico unido al ión amidinium y dicho radical puede estar unido directamente como en las amidinas más comunes a través de un átomo de oxígeno como en alquilisotioureas, de un átomo de azufre que constituyen las alquilisotioureas o de un grupo imino el cual forma las alquilguanidinas. (Fastier, 1962).

Debido a su carga positiva los iones amidinium son atraídos por los grupos cargados negativamente, y en medios fisiológicos, no sólo por aniones pequeños sino también por los grupos aniónicos de macromoléculas como por ejemplo: grupos carboxil y fosfato de proteínas; sin embargo, puesto que el ion amidinium está sujeto a una interacción constante por parte de otras moléculas, la duración del contacto entre el ion amidinium y algún anión parece ser de corta duración a menos que la atracción electrostática entre ambos sea complementada por otro tipo de unión (Fastier, 1962).

En los derivados de las amidinas, como en la acetamida y sus homólogos, en los cuales sólo una cadena de hidrocarburos se une al grupo amidina, es poco probable que cualquier unión fuerte diferente del enlace iónico reforzado se forme entre el anión y el catión, sin embargo, los enlaces del tipo de Van der Waals se podrían formar entre los átomos del catión y los del anión. La atracción de Van der Waals entre moléculas puede ser substancial siempre y cuando ambas sean grandes y una buena proporción de los átomos de los dos grupos que participan en la unión, puedan acercarse (Fastier, 1962).

De lo citado anteriormente, se podría suponer que un ión amidinium con una cadena larga de hidrocarburos se uniría más fuertemente a un receptor aniónico, que a uno con una cadena más corta; aunque esta no es la única forma en la que la longitud de la cadena pudiera afectar la actividad farmacológica (Fastier, 1962).

Independientemente de si el sitio de acción de esta molécula es sobre la superficie celular o dentro de la célula, la concentración en el sitio de acción parece ser diferente de la que se encuentre en el medio que rodea a la célula. Una explicación detallada de éste fenómeno ha sido dada por Ferguson en 1939 (citado por Fastier, 1962), quien introdujo el término biofase para distinguir la fase en la que la molécula ejerce su acción, de la fase en la que la concentración es medida normalmente, por ejemplo: sangre, aire inhalado o solución Ringer circundante en un órgano aislado (Fastier, 1962).

Algunos solutos se concentran en una capa superficial, generalmente son substancias que tienen menos afinidad por el agua, tales solutos hidrófobos tienden a ser expulsados de la fase acuosa y a entrar en fases en las que haya moléculas no polares, sin embargo, este proceso puede ser inhibido por efecto de la temperatura. La actividad termodinámica o potencial químico de un soluto es una medida de su tendencia a escapar de la fase en la que se encuentre y mientras más cercano esté a su saturación, mayor será el potencial químico del soluto (Fastier, 1962).

En 1939 Ferguson (citado por Fastier, 1962) mostró que la intensidad de los efectos farmacológicos de ciertos tipos de substancias pueden predecirse con un grado considerable de exactitud a partir de la estimación de sus potenciales químicos bajo las condiciones experimentales empleadas, y parece ser que en tales casos, una substancia puede ser más potente que otra, no necesariamente debido a que es más efectiva en el sitio de acción, sino porque se puede lograr una mayor concentración en la biofase, para una concentración molar dada en la fase en la que se administró (Fastier, 1962).

Se podría suponer que la longitud de la cadena alquílica unida al ion amidinium afectara su actividad farmacológica en el sentido de que un homólogo mayor tuviera una distribución diferente en la fase que sirve de vehículo y la biofase, con respecto a un homólogo más pequeño, sin embargo, cuando la longitud de la cadena se incrementa mucho, se alcanza un estado en el que la solubilidad en el agua es tan poca, que pocas moléculas pueden llegar al sitio de acción por lo que no pueden producir un efecto muy grande (Fastier, 1962).

No es fácil saber si los cambios estructurales tienen influencia en la actividad debido a que modifican la distribución de la molécula entre la fase que sirve de vehículo y la biofase o a que modifican su afinidad por los receptores; para esto se tienen que considerar otros factores tales como saber si la molécula puede hacer contacto rápidamente con los receptores bajo las condiciones experimentalmente empleadas (Bevan, 1960; Fastier, 1952; Holmes et al 1951; Paton, 1961. Citados por Fastier, 1962) y si la molécula es capaz de unirse al receptor de manera que las fuerzas de Van der Waals se constituyan en una unión más fuerte. Todavía no se conoce una respuesta categórica (Fastier, 1962).



## b) ALGUNAS CARACTERISTICAS DE LAS GUANIDINAS

Entre los derivados de las amidinas se encuentran las guanidinas, este grupo presenta propiedades que las hacen objeto de estudio tanto por sus características químicas como por los efectos de substancias con grupos guanidino en los organismos, ya sea en forma natural o en experimentación.

Los primeros indicios de la especificidad biológica de las guanidinas se hicieron aparentes en los estudios realizados por Baumann en 1876 (citado por Davidoff, 1973) quien observó que la guanidina inyectada en ranas produjo espasmos tónicos extensores, así como contracciones musculares periféricas, que fueron abolidas por curare.

Fuhner en 1906 (citado por Davidoff, 1973) hizo notar la similitud de los efectos mencionados por Baumann, con los producidos por los metales alcalinos univalentes en la excitabilidad neuro-muscular, además, posteriormente observó que la acción tanto de la guanidina como la de los iones metálicos alcalinos fué antagonizada por calcio. La importancia de lo anterior fué la introducción de la idea de que las guanidinas y sus derivados podían interactuar específicamente con sitios receptores biológicos a iones metálicos.

Hesse y Taubmann en 1929 (citado por Davidoff, 1973) realizaron estudios sobre la acción de las biguanidas y sus derivados en el metabolismo de los glúcidos. Shapiro et al en 1959 (citado por Davidoff, 1973) hicieron notar la actividad hipoglicémica y su toxicidad relativamente baja al experimentar con biguanidas de cadenas laterales hidrófobas grandes y encontrar variación en la potencia hipoglicémica de diferentes compuestos N-alquilbiguanidas; las estructuras de cadenas de corta longitud, 1 a 3 carbonos, mostraron actividad hipoglicémica moderada; con 5 a 6 carbonos, actividad elevada al máximo y con 10 o más, caída de la actividad hasta cero. En estos experimentos es evidente la importancia de la longitud de la cadena lateral.

Estas relaciones entre la estructura y la función dentro de las series de moléculas N-alquil no son únicas de las biguanidas, datos similares se han descrito en detalle para compuestos N-alquilisotiureas y los efectos que producen en el sistema cardiovascular (Davidoff, 1973).

Al igual que el ión amidinium de las amidinas, la molécula de guanidina tiene un ión guanidinium que presenta resonancia (Fig. 2).

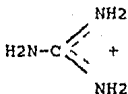


figura 2

Cuando la molécula de guanidina está en estado neutro (Fig.3) los grupos aminos unidos al átomo de carbono impiden que haya condiciones favorables para la resonancia (Wheland, 1955 citado por Fastier, 1962). Consecuentemente, la ionización de la guanidina es difícil de evitar (Fastier, 1962).

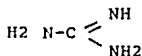


figura 3

La fuerza iónica es poco afectada por la metilación (Angyal y Warburton, 1951; Neivelt et al 1951 citados por Fastier, 1962).

La guanidina es una base orgánica fuerte con un pka de cerca de 12.5 (Davidoff, 1973), lo que significa que es una base casi tan fuerte como el hidróxido de sodio (Fastier, 1962), por lo tanto, a un pH fisiológico, con excepción de una pequeña fracción, la cual no presenta carga, casi todas las moléculas de guanidina en solución existen como moléculas cargadas positivamente (Davidoff, 1973).

Una característica es la simetría de la molécula protonada, la cual proporciona estabilidad; la sustitución de nitrógeno destruye la simetría, de aquí la tendencia a recobrar la forma simétrica, lo que produce que en los derivados en donde ha habido sustitución se formen compuestos de alta energía, por ejemplo: por fosfato en la creatina-fosfato. Otras características importantes son el tamaño y la forma: es una molécula plana con distancias de 13.2 nm entre las uniones del carbono central y cada nitrógeno, que es lo que probablemente hace al ión guanidinium tan pequeño como los iones sodio y potasio hidratados (Davidoff, 1973).

La disposición de los tres grupos aminos unidos al átomo de carbono permiten una amplia gama de unión con otros tipos de moléculas que dan como consecuencia una gran variedad de moléculas más o menos complejas que intervienen en diversos procesos biológicos.

Con respecto a la influencia de grupos sustituyentes, las observaciones con bloqueadores adrenérgicos parecidos al bretyllium y guanetidina implican que los requerimientos estructurales para la actividad en la porción final de la molécula cargada positivamente, no son absolutos. Al mismo tiempo, estos estudios enfatizan la importancia de la porción hidrofóbica no cargada de los derivados de guanidina (Davidoff, 1973).

En estudios con axón nervioso, la adición de un grupo alquil al ión guanidinium elimina la capacidad de mantener la excitabilidad eléctrica en ausencia de sodio (Davidoff, 1973).

Las guanidinas alquil-substituidas como la N-amilguanidina manifestaron efectos opuestos; estos compuestos hicieron que las fibras nerviosas se volvieran inexitables más rápidamente por la sola remoción de sodio y retardaron y redujeron notablemente la actividad restauradora de la guanidina y el sodio. La arginina, con el mismo número de carbonos en la cadena que el derivado N-amil, pero con un grupo carboxilo altamente polar en la porción final opuesta del ión guanidinium fue inerte en lo que se refiere a los efectos sobre la actividad eléctrica (Davidoff, 1973).

La molécula de guanidina tiene un amplio espectro de acción debido a que presenta actividad como molécula con resonancia o como molécula disociable; por su tamaño y propiedades anfifílicas puede introducirse en medios hidrofóbicos o hidrofílicos y porque se puede unir a diferentes tipos de moléculas de manera temporal o permanente y modificar las características de las moléculas a las que se mantiene unidas; presenta modificaciones en su actividad fisicoquímica que depende de los grupos substituyentes y de la longitud de la cadena lateral. Lo anterior da como resultado que los organismos presenten entre sus constituyentes y utilicen en diferentes procesos metabólicos, gran variedad de compuestos con grupos guanidino o con derivados de las guanidinas.

#### c) PRESENCIA Y EFECTO DE GUANIDINAS Y SUBSTANCIAS DERIVADAS EN LOS ORGANISMOS

Se han encontrado compuestos con grupo guanidino y derivados de las guanidinas en diversas entidades biológicas como integrantes del metabolismo de manera natural (Lehninger, 1976) como por ejemplo:

Guanina: base púrica integrante del ARN y el ADN.

Guanosín 5' monofosfato o GMP: nucleótido precursor en la biosíntesis de guanina.

Guanosín 5' difosfato o GDP: nucleótido precursor en la biosíntesis de guanina; interviene en la reacción de desacilación de succinil Co A cuyos productos son succinato, GTP + acetyl Co A; acarreador específico de azúcares en varias reacciones de transferencia enzimática de azúcares, en diferentes microorganismos y tejidos de vegetales y de animales.

Guanosín 5' trifosfato o GTP: nucleótido precursor en la biosíntesis de guanina; como reactante para transformar ácido inosínico en ácido adenilsuccínico en la biosíntesis de ATP; interviene

en la activación de ácidos grasos; en la gluconeogénesis y como fuente de energía en la síntesis de proteínas en ribosomas.

Guanosín 3'-5' monofosfato cíclico o GMP : mensajero intracelular, nucleótido cíclico regulador que funciona en relación recíproca con AMP.

Guanosín 5' difosfato, 3' difosfato y guanosín 5' trifosfato, 3' trifosfato: nucleótidos cíclicos que participan en la

transcripción génica en bacterias.

Arginina y creatina: aminoácidos.

Acido guanidín-acético: precursor de creatina.

Guanilato ciclasa: enzima que cataliza la reacción de conversión de GTP en GMP .

Guanina fosforibosil transferasa: enzima que convierte la guanina libre en GMP para volverse a utilizar durante la biosíntesis de ácidos nucleicos.

Guanina y metil-guanina: catabolitos encontrados en sangre y orina como productos del metabolismo.

Urea: catabolito producto del metabolismo protéico encontrado en sangre, linfa y orina.

La molécula de guanidina también se ha utilizado como herramienta en investigación (Fastier, 1962) para estudiar sus efectos en los sistemas biológicos siguientes:

Sistema cardiovascular: acción vasoconstrictora y aumento de presión sanguínea en concentraciones de 100 mg/kg en perros y gatos anestesiados.

Sistema nervioso central: producción de espasmos tónicos extensores en ranas, además de tirantez fibrilar; lo que fue atribuido por Gergens y Baumann en 1876 (citado por Fastier, 1962), a la acción periférica de la guanidina. Otro sitio de acción de esta molécula en el sistema nervioso, fue demostrado por Sato (citado por Fastier, 1962) quien observó que en presencia de guanidina, los impulsos aferentes desde las terminales nerviosas en la piel de la rana son iniciados espontáneamente. También se apreció estimulación antidrómica de los nervios sensoriales correspondientes como resultado de una reverberación de descargas desde esas terminales.

Músculo liso: incremento de tonicidad muscular a concentraciones de 1 mM o mayores, en intestino de conejo.

Músculo estriado: aumento de la contracción muscular y fibrilación a concentraciones de 2 a 5 mM. Amplifica la acción de la acetilcolina por aumento del potencial de la placa neuromuscular al incrementar la liberación de acetilcolina en anfibios.

Con relación al metabolismo, en dosis muy grandes disminuye la concentración de glucosa sanguínea en animales experimentales; la hipoglicemia puede ser lo suficientemente severa como para producir convulsiones. El inicio de las convulsiones después de una dosis de guanidina puede ser retardado, pero no evitado, por administración de glucosa. En conejos disminuye la hiperglicemia producida por glucosa o adrenalina, sin embargo, en muchas ocasiones produce hiperglicemia inicialmente (Fastier, 1962).

Puesto que los efectos de hiperglicemia no se observan en animales a los que se les ha extirpado la médula de las glándulas suprarrenales, se supone que la guanidina tiene la habilidad de hacer que se libere adrenalina In Vivo. En perros envenenados con guanidina, previene el almacenamiento de glucógeno, la pérdida de glucógeno de músculos e hígado parece ser el efecto primario; la

degeneración de grasas en el hígado es otro rasgo del envenenamiento por guanidina (Fastier, 1962).

El principal efecto de la guanidina en la utilización de carbohidratos es la interferencia con los procesos oxidativos en los tejidos, lo que ocasiona una acumulación anormal de ácido láctico en la sangre. El contenido de ácido cítrico en el suero también se incrementa y puede ser de 5 a 10 veces superior al valor normal, después de dosis tóxicas de guanidina. La acumulación de metabolitos tales como citratos, podrían reducir la concentración de calcio en sangre y otros tejidos, lo que explica por que bajo algunas, pero no en todas las condiciones experimentales, la toxicidad de la guanidina puede ser evitada notablemente por calcio (Fastier, 1962).

Una disminución significativa en la incorporación de oxígeno en tejidos aislados de cerebro, hígado y músculo pueden producirse a concentraciones de 5 mM de guanidina. Se encontró que en preparaciones de rebanadas de cerebro de rata, una concentración de 1 mM produjo una inactivación completa pero reversible del efecto Pasteur, lo que indica que en presencia de guanidina, un organismo tiene menor capacidad de conservar carbohidratos para ser utilizados en el metabolismo aerobio (Dickens, 1939 citado por Fastier, 1962). También se han reportado efectos de inhibición en la duplicación en poliovirus (Lwoff, 1966) (Davidoff, 1973).

Así mismo, compuestos derivados de la guanidina se han utilizado con fines experimentales como por ejemplo:

Fenilbiguanida: en estudios de depresión de reflejos (Davidoff, 1973).

Fenetilguanidina: como antiarrítmico (Davidoff, 1973).

Fenetilbiguanida: en estudios de inhibición en mitocondrias y activación de fibrinolisis (Davidoff, 1973).

Amilorida: bloqueo de transporte en membrana y bloqueo ganglionar; en la vejiga del sapo inhibe el transporte de sodio de manera no competitiva (Davidoff, 1973).

Tetrodoxina: inhibición de membranas excitables eléctricamente por bloqueo de movimientos de sodio (Davidoff, 1973).

Decametilendiguánida: inhibición de diamino oxidasa y como agente antitripanosómico (Davidoff, 1973).

Guanetidina: bloqueador adrenérgico; en la vejiga del sapo estimula el transporte de sodio (Fastier, 1962).

Hidrocloreto de guanidina: desnaturalización de ribonucleasas A y T1 y su dependencia con el pH en la estabilidad conformacional (Pace et al, 1990). Disociación y agregación de D-gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Liang et al, 1990). Desnaturalización de lisozima y ribonucleasa A y efectos competitivos con polioles (Gekko e Ito, 1990).

Guanil-5-imidodifosfato: estudio de receptores cinina B2 y regulación de nucleótidos de guanina (Fredrik Leeb-Lundberg y Mathis, 1990).

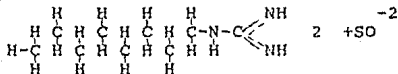
N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina: inductor de daño al ADN y por este hecho, estimulador de la síntesis de poli ADP-ribosa en linfocitos normales de humano (Sims et al, 1982).

La molécula de guanidina, así como algunos de sus derivados han sido empleados como agentes terapéuticos (Davidoff, 1973).

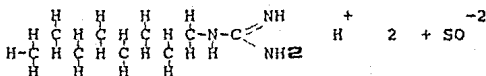
Guanidina: en botulismo y miastenia gravis. Guanetidina: en hipertensión arterial. Fenetilbiguanida: en diabetes y trombosis. Amilorida: como diurético. Cloroguanida-pirimetamida: en malaria. Clorofenil-isopropil biguanida: en malaria y Decametilendiguanida en la diabetes.

#### d) OCTILGUANIDINA

La octilguanidina (8G) es una N-alkilmonoguanidina que se puede sintetizar a partir de octilamina y cianamida; método por el cual se puede obtener tanto marcada radioactivamente como sin marca, generalmente no se obtiene completamente pura ya que junto con cada 2 moléculas de octilguanidina hay 1 sulfato, de aquí que se utilice como octilguanidina-sulfato (Salmón et al, 1976). Su estructura química es la siguiente:



como molécula en resonancia



en estado neutro como molécula ionizable

El peso molecular de la octilguanidina es de 172 y de 440 para 2 moléculas de octilguanidina y 1 sulfato.

La octilguanidina se ha utilizado para explorar las funciones de diversos sistemas biológicos; en estos estudios se observa que afecta las funciones de los sistemas enzimáticos que dependen de iones metálicos como el transporte de sodio y potasio que es sensible a guanidina en mitocondrias (Gómez-Puyou et al, 1973) en el que la octilguanidina es inhibidor de la fosforilación oxidativa en el sitio I en la mitocondria, con succinato como sustrato, el cual bloquea la incorporación de oxígeno estimulada por sodio y la liberación de potasio inducida por sodio. Esto indica que la mitocondria tiene un sistema sensible a guanidina que interviene en la translocación de sodio y potasio.

Los estudios con guanidinas en el transporte de potasio en levaduras (Peña, 1973) en donde la octilguanidina inhibe el transporte de potasio de modo competitivo pero sin alterar la extrusión de protones.

Mecanismo de acción de alquilguanidinas en la fosforilación oxidativa en mitocondria (Papa et al, 1975) en donde la octilguanidina actúa directamente en el complejo ATPasa y la unión en el sitio de acción es recíprocamente excluyente con la unión de oligomicina.

Inhibición de la H<sup>+</sup> ATPasa de la membrana plasmática de levaduras (Olivera, 1990), quien menciona que la inhibición observada fue mayor al incrementarse la longitud de la cadena asociada y por lo mismo los compuestos más hidrofóbicos tuvieron mayor efecto sobre la enzima, así mismo, observó que la inhibición inducida por las guanidinas fue lineal con respecto a su concentración; y que la H<sup>+</sup>ATPasa mostró menor afinidad por la octilguanidina cuando se determinó la inhibición a un pH bajo.

#### e) CULTIVO DE SANGRE PERIFERICA

El cultivo de sangre periférica es una herramienta experimental utilizada en la investigación de fenómenos inmunológicos, genéticos y citológicos principalmente, debido a que entre sus constituyentes tiene a estirpes celulares directamente relacionadas con la respuesta inmune, a la relativa facilidad con que se pueden obtener datos cariotípicos y de anomalías genéticas, así como el estudio de características y fenómenos citológicos. Estas estirpes celulares corresponden a los leucocitos los cuales son una de las bases del sistema inmune y para llevar a cabo adecuadamente sus funciones, deben estar en continuo movimiento a través de todo el organismo; por lo que son de las primeras células que tienen contacto con agentes extraños y en general con los cambios internos y ambientales que afectan a un organismo.

Los leucocitos se clasifican en dos grupos de acuerdo a la presencia o ausencia de gránulos en el citoplasma, revelados por técnicas específicas de tinción: granulocitos, que agrupan a eosinófilos, basófilos y neutrófilos; agranulocitos, que agrupan a monocitos, macrófagos y linfocitos (Dyson, 1976).

Los linfocitos en el humano constituyen alrededor del 20% de la población de leucocitos y miden, en promedio, aproximadamente 10 micras de diámetro (Dyson, 1976), presentan orgánulos escasamente desarrollados como mitocondrias, retículo endoplásmico, aparato de Golgi, un centriolo y ribosomas dispersos en el citoplasma (Ling y Kay, 1975), el cual se encuentra rodeando al núcleo que se localiza cerca del centro de la célula y que puede ser de forma redondeada o irregular, con una muesca producida por el centrosoma; la cromatina se encuentra en forma de grumos y se tiñe intensamente con colorantes básicos (Forteza, 1964).

Todos los linfocitos que circulan en la sangre se derivan de células indiferenciadas que se encuentran en la médula ósea; se

clasifican en linfocitos T y linfocitos B. Las células T también conocidas como timo dependientes, han circulado a través del timo durante su diferenciación y pueden eliminar a otros tipos celulares como son las células cancerosas y las de tejidos transplantados, lo que se conoce genéricamente como respuesta inmune celular. Los linfocitos T actúan en coordinación con los linfocitos B conocidos también como timo independientes, los cuales circulan en las aves durante su diferenciación a través de la bursa de fabricius y se supone que en reptiles y mamíferos hay sitios equivalentes a la bursa de fabricius de las aves, aunque estos lugares no se han determinado con exactitud. Los linfocitos B producen anticuerpos cuando están en contacto y han sido estimulados por antígenos a lo que se conoce como respuesta inmune humoral (Burnet, 1976a).

El primer paso esencial en la respuesta inmune humoral es el contacto entre los antígenos y los receptores de superficie de los linfocitos B, este contacto puede ser auxiliado por interacción del antígeno con los macrófagos y linfocitos T, dicho contacto modifica la expresión de los genes del linfocito B, lo que origina una serie de fenómenos que dan como resultado que la célula se divida, se diferencie y produzca anticuerpos contra el antígeno que la estimuló (Lerner y Dixon, 1973).

Burnet (1976b), y Coutinho et al (1975), mencionan que es necesaria la cooperación de los linfocitos T y los macrófagos con los linfocitos B, para que éstos alcancen el óptimo de producción de anticuerpos en la mayoría de los casos.

En los sistemas que requieren de la interacción entre un ligando y un receptor a nivel de superficie se induce un cambio conformacional en el receptor, como consecuencia de esta interacción se desencadena una serie de fenómenos a nivel de membrana tales como translocación de iones, alteraciones en el potencial de membrana, activación de los sistemas adenilato y guanilato ciclasa y otros cambios que posteriormente se traducirán en una respuesta metabólica (De Robertis, 1976).

De esta manera la fitohemaglutinina (PHA) o algunos de los agentes mitogénicos que Oppenheim describió en 1968 (Lucas, 1971), se combinarían con un sitio receptor en la membrana celular de los linfocitos (Faguet, 1977); estos cambios primarios incluyen un aparente incremento en la permeabilidad celular (Quastel y Kaplan, 1968 citado por Lucas, 1971), disminución de los depósitos intracelulares de nucleótidos de uridina (Lucas, 1967 en Lucas, 1971), incremento en la síntesis de fosfolípidos (Kay, 1967 citado por Lucas, 1971), incremento en la captación de aminoácidos (Whitney y Sutherland, 1973), variación en los niveles de nucleótidos cíclicos (Smith et al, 1971; Hadden et al, 1972; De Robertis et al, 1974), aumento en la captación de calcio (Allwood et al, 1971; Whitney y Sutherland, 1972a y 1972b), síntesis de ARN estable (Mazumder y Mandal, 1975) e inicio de la síntesis de ADN (Weinstein et al, 1974), que da como resultado final que los linfocitos se dividan y las células hijas resultantes queden en condiciones de ser estimuladas nuevamente.

Nowell en 1960, describió que una lectina, la



fitohemaglutinina (PHA), la cual se extrae del frijol común *Phaseolus vulgaris*, es capaz de estimular a los linfocitos en cultivo e inducirlos a que se dividan. Las lectinas son mucoproteínas de alto peso molecular, derivadas generalmente de los vegetales, que tienen la capacidad de interactuar con grupos de carbohidratos presentes en las membranas (Sharon, 1977). La PHA es uno de los agentes mitogénicos más comunmente utilizados en los estudios de proliferación de linfocitos in vitro por su alta efectividad y su rápida respuesta con respecto a otros mitógenos específicos (Whitney y Sutherland, 1972b).

La PHA se une a los linfocitos y después de una hora en el cultivo, en concentraciones normales de células y PHA, la estimulación es irreversible aunque las células se laven repetidas veces, además de requerirse concentraciones de PHA menores que con otros mitógenos para obtener un máximo de estimulación (Lindahl Kiessling, 1972).

Se ha encontrado que algunas glucoproteínas contenidas en el suero normal interfieren con la respuesta in vitro de los linfocitos a la PHA y Concanavalina A; también se ha encontrado que la presencia de compuestos policatiónicos incrementa la respuesta de los linfocitos a los mitógenos, y en contraste con esto, los compuestos polianiónicos inhiben dicha respuesta (Larsen y Heron, 1978). Asimismo, los cationes divalentes como el calcio, en medio carente de nutrientes y suero, inducen a la incorporación de timidina tritiada por los linfocitos estimulados con PHA de modo dependiente a la concentración de calcio en el medio (Ponce, 1979). Se ha reportado que los linfocitos B son capaces de responder a la PHA cuando ésta está unida a un sustrato insoluble (sephadex) o a Concanavalina A cuando ésta se encuentra unida covalentemente a cajas de Petri de plástico. Sin embargo, algunos absorbentes insolubles parecen activar las células B en mayor grado aún cuando sean tratados con proteínas inertes más que con mitógenos, lo que sugiere que esta forma de activación puede no ser estrictamente inducida por mitógenos específicos (Ling y Kay, 1975). Cuando los linfocitos de humano son estimulados con PHA, el incremento en la síntesis de ADN es precedido por un aumento en la poli ADP-ribosa polimerasa; asimismo, se sabe que al haber rompimiento en las bandas de ADN por agentes químicos como la N-metil-N-nitro-N-nitrosoguanidina hay elevación de la síntesis de poli ADP-ribosa; se encontró que en ambos procesos hay proteínas que actúan comoceptoras para la ribosilación del ADP, en particular una proteína de 62 K daltones en el proceso de daño al ADN, y otra proteína de 96 K daltones en la estimulación por PHA; y en ambos fenómenos la ribosilación del ADP de algunas histonas pueden estar implicadas en las modificaciones de la estructura cromatínica necesaria para el acceso de las enzimas tanto para la reparación como para la duplicación del ADN en donde la poli ADP-ribosa parece intervenir de manera importante (Surowy y Berger, 1983).

Debido a que los linfocitos son estirpes celulares que entre sus funciones normales presentan la de la proliferación clonal después de ser estimulados por antígenos, representan un buen modelo para el estudio in vitro de los procesos bioquímicos relacionados con la iniciación de la división celular (Hadden et al, 1972). Asimismo, Mazumder y Mandal en 1975, mencionan que los linfocitos de sangre periférica de humano en cultivos estimulados por PHA, proporcionan un sistema interesante para el estudio de la regulación de la división celular.

### III PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Con base en algunas características de la molécula de octilguanidina como son: tamaño, peso molecular, propiedades anfifílicas que le permiten introducirse en medios hidrófobos e hidrófilos y su actividad como molécula disociable o en resonancia; se considera la posibilidad de que la octilguanidina incremente o disminuya la acción de la PHA como inductora de la división celular en los linfocitos de humano en cultivo debido a la posible interacción de la octilguanidina con fosfolípidos y sistemas de transporte de iones de la membrana celular, lo que puede modificar la permeabilidad de dicha membrana, y debido a la alteración en la permeabilidad ocasionar cambios conformacionales en los probables receptores a la PHA; lo anterior facilitaría o dificultaría la interacción PHA-receptor, en función de la dosis de 8G, lo que podría determinar la activación de los fenómenos bioquímicos a nivel de membrana que conducen a la inducción de la división celular en los linfocitos.

#### IV MATERIALES Y METODOS

Esta sección se divide en los siguientes incisos: 1) Siembra 2) Cosecha 3) Variantes en los Experimentos 4) Análisis Citogenético Directo 5) Incorporación de Timidina Trittiada 6) Tratamiento Estadístico de los Datos.

##### 1) Siembra

Los cultivos de sangre periférica se realizaron según la microtécnica de Arakaki y Sparkes (1963) modificada: 0.3 ml de sangre de humano periférica completa, del mismo donador, adulto, varón, sano; extraída con jeringa previamente heparinizada momentos antes de la siembra, se colocaron en frascos ampula estériles de 100 ml de capacidad que contenían: 5 ml de medio de cultivo TC-199 (Difco 5477) mezclado con suero fetal de ternera (Gibco 614) al 20% previamente inactivado por calor a 60 C durante 30 minutos, 0.25 ml de PHA M (Difco 0528), 0.10 ml de penicilina-estreptomicina (Difco 5854) equivalentes a 1000 U I de penicilina y 1000 ug de estreptomina, 300 U I de heparina (Abbott de 1000 U I) y 0.10 ml de glutamina al 5% (Difco 5789). Los cultivos se incubaron a 37 C durante 72 horas.

Durante la incubación se realizaron dos variantes debido a que se utilizaron dos criterios para la obtención de resultados, que son el análisis cito genético directo y la incorporación de timidina tritiada; en la primera variante se agregó 0.05 ml de una solución de colcemid (Ciba 001641) a una concentración de 2 ug/ml a las 69 horas y se volvieron a incubar a 37 C durante 3 horas hasta cumplir las 72 horas; a la segunda variante se le agregó un pulso de 1 uCi de timidina tritiada (3H-metil-timidina, New England Nuclear NEN 0.27 X, con actividad específica de 2 Ci/mM) a las 57 horas, reincubándose a 37 C durante 15 horas más para tener un total de 72 horas.

##### 2) Cosecha

Se realizó según la técnica de Moorhead et al (1960) modificada: al finalizar las 72 horas de incubación, el contenido de cada frasco de cultivo, fue resuspendido suavemente con pipeta Pasteur, transferido a un tubo de centrifuga y centrifugado a 800 rpm durante 7 minutos, se desechó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió en agua destilada estéril hasta completar 5 ml para dar a las células un choque hipotónico, los tubos fueron incubados a 37 C durante 15 minutos, posteriormente se centrifugaron a 800 rpm durante 7 minutos se desechó el sobrenadante; el paquete celular se fijó con 5 ml de metanol-ácido acético, 3:1 v/v, se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos, se centrifugaron a 800 rpm durante 7 minutos, se desechó el sobrenadante y se volvió a resuspender en fijador. Este proceso se repitió hasta que el paquete celular estuviera libre de hemoglobina; una vez conseguido esto permanecieron en fijador por 24 horas en el congelador. Posteriormente se siguió la técnica de secado al aire de Moorhead et al (1960), se obtuvieron entre 2 y 3 preparaciones por cada tubo cosechado, las cuales se sometieron

a tinción con una solución de Giemsa-Leishman-agua (3:1:36, v/v/v) por 20 minutos a temperatura ambiente antes de ser revisadas en su totalidad con sistemas de microscopía óptica de campo claro y en algunos casos de contraste de fases.

Para los cultivos que contenían timidina tritiada, la cosecha se efectuó de la siguiente manera: los paquetes celulares no sufrieron choque hipotónico y una vez que estuvieron libres de hemoglobina, se desechó el sobrenadante y se agregó ácido tricloroacético (TCA) (Merck 6348250) frío al 7% hasta 5 ml; se dejaron a 4 C durante 1 hora, concluido este período se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos, se desechó el sobrenadante y se agregó TCA frío al 7% hasta 5 ml; cada paquete celular se resuspendió y se pasó a través de un filtro de celulosa Millipore de 0.65  $\mu$ m de diámetro; cada tubo se enjuagó con 5 ml de TCA frío al 7% los cuales se hicieron pasar a través del mismo filtro; cada filtro se depositó en un vial al que se le agregaron 0.4 ml de dodecil sulfato de sodio (SDS) (Sigma L5750) al 2%, se incubó a 60 C durante 30 minutos; posteriormente se agregaron 10 ml de líquido de centelleo tipo Bray a cada vial para ser analizados por un contador de centelleo líquido.

### 3) Variantes en los Experimentos.

Para cada experimento hubo 3 repeticiones por tratamiento.

Inicialmente se realizó 1 experimento sin PHA ni 8G para la observación de la proliferación celular por medio del análisis citogenético directo sin estimulación; el que se denominará: experimento piloto.

A continuación se efectuaron 3 experimentos a los que se les agregó al momento de la siembra, 0.2 ml de 8G en concentraciones de 0.1, 0.3 y 1 mg/ml para tener una concentración final en los cultivos de 19, 56 y 190  $\mu$ M respectivamente; en estos experimentos se utilizaron dos condiciones: con y sin PHA y con y sin choque hipotónico para saber si a estas concentraciones la 8G interviene en la respuesta mitogénica y determinar la influencia de la presencia de la PHA y el choque hipotónico; aquí solamente se utilizó el criterio del análisis citogenético directo. A este grupo se le denominará: experimentos preliminares.

Posteriormente se hizo una serie de 5 experimentos a los que se les agregó al momento de la siembra, PHA y 0.2 ml de 8G en concentraciones de 0.001, 0.003, 0.005, 0.01, 0.03, 0.05 y 0.07 mg/ml que corresponde a una concentración final en los cultivos de 0.19, 0.56, 0.95, 1.9, 5.6, 9.5 y 13  $\mu$ M respectivamente, para obtener una curva dosis-respuesta. En los 4 primeros experimentos solamente se utilizó el criterio del análisis citogenético directo; el experimento #5 se hizo en condiciones similares a los anteriores pero además del lote de frascos para el análisis citogenético directo, se hizo otro lote para la incorporación de timidina tritiada. A esta serie se le denominará: experimentos dosis-respuesta.

En otro experimento se agregaron a la siembra, las mismas concentraciones de 8G que se utilizaron para los experimentos dosis-respuesta, pero no se le agregó PHA con el objeto de saber

si su presencia es necesaria para la inducción de la proliferación celular aún cuando las concentraciones de 8G sean las que producen algún tipo de respuesta; en este experimento sólo se utilizó el criterio del análisis citogenético directo. A esto se le denominará: experimento sin PHA.

A continuación se efectuaron 4 experimentos con las concentraciones de 8G utilizadas en el experimento dosis-respuesta, pero se utilizó la incorporación de timidina tritiada como criterio para evaluar la respuesta de los linfocitos a la 8G. A éstos se les denominará: experimentos de dosis-respuesta con timidina.

Posteriormente se realizaron 2 experimentos: el primero consistió en agregar 1.9  $\mu\text{M}$  de 8G al momento de la siembra y a los 15, 30, 45 y 60 minutos después de la siembra respectivamente, en diferentes frascos de cultivo, con la dosis usual de PHA agregada a la siembra para saber si la 8G tiene algún efecto cuando se aplica después de la PHA; éste se denominará: experimento del efecto de la 8G a diferentes tiempos de agregación.

Al segundo experimento se le agregó 0.25 ml de PHA a la siembra y a los 15, 30, 45 y 60 minutos y a las 24 y 48 horas después de la siembra respectivamente, en diferentes frascos de cultivo, con la dosis de 1.9  $\mu\text{M}$  de 8G agregada a la siembra para saber si la PHA actúa al ser aplicada después de la 8G. A esto se le denominará: experimento del efecto de la PHA a diferentes tiempos de agregación. En ambos experimentos se utilizaron los criterios de análisis citogenético directo e incorporación de timidina tritiada.

#### 4) Análisis Citogenético Directo.

Se efectuó en todas las preparaciones obtenidas de los cultivos de sangre periférica completa, la revisión de cada una de las preparaciones se hizo siguiendo el método de "micra a micra" el cual consiste en colocar la preparación en la platina del microscopio y correr dicha platina hasta los toques horizontal y vertical de manera que el campo óptico observado sea una de las esquinas de la preparación, se sugiere que siempre sea la misma, por ejemplo la superior izquierda; sin mover el tornillo horizontal se revisa la preparación hacia abajo y una vez alcanzado el borde inferior del portaobjetos se corre horizontalmente un campo óptico, se toma como referencia alguna señal que se encuentre en el límite del campo anteriormente visto, con el objeto de evitar que se vuelva a registrar el material ya revisado o de dejar espacios sin observar; de este modo se revisa toda la preparación y se anotan los datos pertinentes.

La revisión se hizo en un microscopio Olympus de campo claro y en uno Zeiss de contraste de fases, ambos con platinas móviles graduadas, en donde se registraron por medio de los nonios de las platinas o por plantillas el total de mitosis encontradas en cada preparación; y a su vez, cada una de las figuras mitóticas encontradas, fue analizada con respecto a: número de cromosomas, fase de la mitosis en que se encontraba, y si presentaba aberraciones cromosómicas.

Todas las preparaciones fueron codificadas en clave y revisadas a "ciegas" o sea sin saber que preparación correspondía a que tratamiento. Posteriormente se veía a que tratamiento correspondía cada clave, se reunieron los datos obtenidos, se procedió a calcular la significancia estadística y a elaborar las tablas e histogramas correspondientes.

#### 5) Incorporación de Timidina Tritiada.

Los viales de los cultivos que contenían timidina tritiada, fueron analizados durante 2 ciclos de 4 minutos cada uno por un contador de centelleo líquido Packard Tri Carb modelo 2425 automático el cual proporcionó, entre otros datos, el registro de partículas beta emitidas, como cuentas por minuto (cpm), por la timidina tritiada incorporada en los ácidos nucleicos de las células, así como la eficiencia del aparato.

Con los datos proporcionados por el contador de centelleo líquido, cpm y % de eficiencia, el cual se determina periódicamente ya que varía con el tiempo; se calcula el número de desintegraciones por minuto (dpm) para cada muestra. Las dpm proporcionan una apreciación más fiel con respecto a la cantidad de isótopo incorporado.

cálculo de dpm:

$$\text{dpm} = \frac{\text{cpm} \times 100}{\% \text{ eficiencia}}$$

Con las dpm obtenidas por tratamiento para cada experimento se procedió a su evaluación, de la misma forma que para los datos obtenidos del análisis citogenético directo.

#### 6) Tratamiento Estadístico de los Datos.

Se obtuvo el valor promedio de las repeticiones para cada tratamiento, se determinó la desviación estándar, el error estándar y el porcentaje del promedio. Cuando éste valor es mayor del 40% se rechaza el resultado por exceder la variabilidad propia del sistema (Ongay, 1978); se utilizó el porcentaje del control para la elaboración de los histogramas, en los que se presentan los resultados del análisis citogenético directo conjuntamente con los de incorporación de timidina tritiada.

## V RESULTADOS Y DISCUSION

Se realizaron 16 experimentos en total; en el primero de estos denominado experimento piloto no se observaron figuras mitoticas por lo que se considero que en ausencia de inductores mitogenicos, en este caso PHA, los linfocitos de humano en este tipo de cultivo no se dividen.

Al efectuar el analisis de los datos obtenidos en los experimentos preliminares, se observo que a concentraciones mayores de 19  $\mu\text{M}$  de 8G no hubo figuras mitoticas, a concentraciones de 5.6 y 1.9  $\mu\text{M}$  de 8G hubo figuras mitoticas en 71.7 y 114.3% respectivamente con relacion a su control, con PHA y aplicacion de choque hipotonico. Con base en estos resultados se considero que las concentraciones de 5.6 y 1.9  $\mu\text{M}$  de 8G estan dentro del intervalo adecuado para producir algun tipo de respuesta observable en los cultivos; y que la presencia de PHA y el empleo de choque hipotonico son necesarios para la induccion y obtencion de figuras mitoticas respectivamente.

Tabla # 1 (apendice).

Los resultados obtenidos en la serie de experimentos:dosis-respuesta, tabla # 2 (apéndice) la que sirvio de base para elaborar los cuadros-resumen # 1 y # 2, indican que a una concentracion de 0.19  $\mu\text{M}$  de 8G se registro una actividad mitotica del 5% por debajo de su control y a concentraciones de 0.56, 0.95 y 1.9  $\mu\text{M}$  de 8G se obtuvo un mayor numero de figuras mitoticas en 6, 25 y 35% respectivamente con relacion a su control; a concentraciones de 5.6, 9.5, 13 y 19  $\mu\text{M}$  se observo disminucion en el numero de figuras mitoticas en un 64, 87, 93 y 100% respectivamente con relacion a su control (histograma # 1).

Estos resultados sugieren dos tipos de comportamiento en la curva dosis-respuesta, uno con dosis de 0.56 a 1.9  $\mu\text{M}$  de 8G que presenta mayor porcentaje de figuras mitoticas que su control, y otro con dosis de 5.6 a 19  $\mu\text{M}$  de 8G que presenta menor porcentaje de figuras mitoticas que su control. Esta diferencia se ha interpretado de la siguiente manera: en ambos casos la 8G interacciona con los fosfolipidos de la membrana celular debido a sus características anfifilicas y de tamaño y peso molecular; como resultado de esta interaccion puede haber modificaciones en la permeabilidad de la membrana por cambios en la fluidez y el potencial electroquimico, que serian dependientes de la concentracion de 8G, estas modificaciones en la permeabilidad a su vez, pueden inducir cambios conformacionales en los probables receptores a la PHA y estos cambios permitir o impedir la interaccion con la PHA, lo que podria determinar, mediante la activacion de estos fenomenos bioquimicos a nivel de membrana, la induccion de la division celular.



CUADRO-RESUMEN # 1

EFFECTO DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE BG CON RELACION AL NUMERO DE FIGURAS MITOTICAS OBSERVADAS EN LOS EXPERIMENTOS: DOSIS-RESPUESTA.

[BG $\mu$ M]							
13	9.5	5.6	1.9	0.95	0.56	0.19	CONTROL
7*	38	92	417	433	303	374	260
2.67†	12.30	35.38	160.38	166.53	116.33	143.87	100
2	38	231	488	512	473	458	339
0.58	11.20	68.14	143.95	151.03	139.52	135.10	100
2(2)	26(2)	162(2)	13	13	24(2)	6	8
62.5	325.0	2025.0	162.50	162.50	300	75	100
7(2)	25(2)	26(2)	27	20		13	17
41.17	147.05	152.94	158.82	117.64	(1)	76.47	100
26	23	29	74	42	88	50	139
18.70	16.50	20.86	53.23	30.21	63.33	35.97	100

\* FIGURAS MITOTICAS OBSERVADAS

(1) CONTAMINADO

† % CONTROL

(2) DATOS ESTADISTICAMENTE RECHAZADOS

CUADRO-RESUMEN # 2

TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS DATOS OBTENIDOS  
EN EL CUADRO-RESUMEN # 1

(BG $\mu$ M)	% CONTROL	n	DESVIACION ESTANDAR	ERROR ESTANDAR	% n
13	2.69 0.53 18.70	7.32	9.91	5.72	33.14
9.5	12.30 11.20 16.50	13.33	2.80	1.61	12.07
5.6	35.38 68.14 20.86	41.46	24.22	13.98	33.71
1.9	160.32 143.95 162.50 158.82 53.23	135.76	46.72	20.89	15.38
0.95	166.53 151.03 152.50 117.64 30.21	125.58	56.67	25.34	20.17
0.56	116.53 139.52 63.30	106.45	39.10	22.57	21.20
0.19	143.84 135.10 75.00 76.47 25.97	93.22	45.29	20.26	21.20

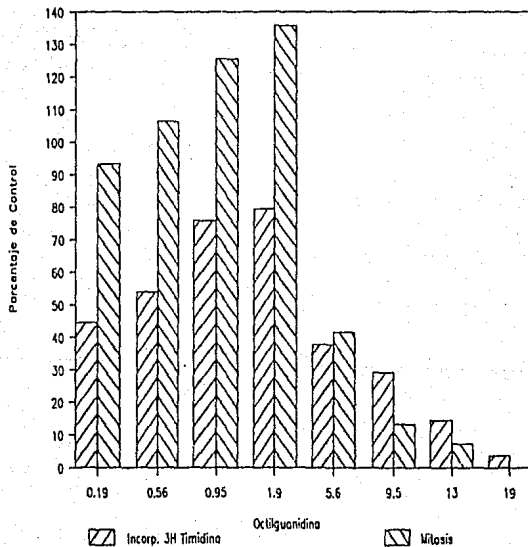
n=PROMEDIO

% n=PORCENTAJE DEL PROMEDIO

### HISTOGRAMA 1

Efecto de la 8G en distintas concentraciones sobre los linfocitos de humano tanto en el número de mitosis como en la incorporación de Timidina Triaada (3H T imidina) expresado en porcentaje del promedio relación al control

26



Al efectuar la revisión de las figuras mitóticas se registro el porcentaje de las diferentes fases de la mitosis en las que se encontraban estas figuras. Los resultados se muestran en la tabla # 3 (apendice) en donde se observo como dato sobresaliente que a la concentración de 9.5  $\mu\text{M}$  de 8G hubo mayor porcentaje de anafases, 7.89, con relacion a las demas concentraciones de 8G utilizadas, las cuales fueron de 13, 5.6, 1.9, 0.95, 0.56 y 0.19  $\mu\text{M}$  de 8G con porcentajes de 0, 0.43, 1.23, 0.39, 1.90 y 2.40 respectivamente, así como para su control que fue de 2.35%. La posible interpretación de lo observado es que la concentración de 9.5  $\mu\text{M}$  de 8G influya en la detención de las figuras en esa fase del proceso mitótico porque no se observaron telofases. A la concentración de 5.6  $\mu\text{M}$  de 8G se observó con claridad el efecto de colcemid, al encontrarse el 98.28% de figuras en metafase, 0.43% en anafase y 0 en telofase.

También se realizó el análisis citogenético directo para averiguar si las diferentes concentraciones de 8G o bien las técnicas de cultivo y cosecha producían aberraciones cromosómicas observables, en ninguno de los casos se encontraron estas. Como en todos los experimentos se utilizó colcemid tal vez esto dificultó la detección de las aberraciones en el análisis citogenético directo, que pudieran haber sido inducidas por la 8G; para averiguar lo anterior hubiera sido conveniente hacer experimentos sin colcemid; aunque esta no necesariamente evita la observación de aberraciones cromosómicas.

Con relación al experimento: sin PHA, no se observaron figuras mitóticas por lo que se consideró que la presencia de la PHA es necesaria para la inducción de la proliferación celular de los linfocitos de humano en este tipo de cultivo; aun cuando haya 8G a las concentraciones en las que se observa respuesta; por lo que se puede decir que la 8G por sí sola no tiene efecto inductor sobre la división celular en este tipo de cultivos.

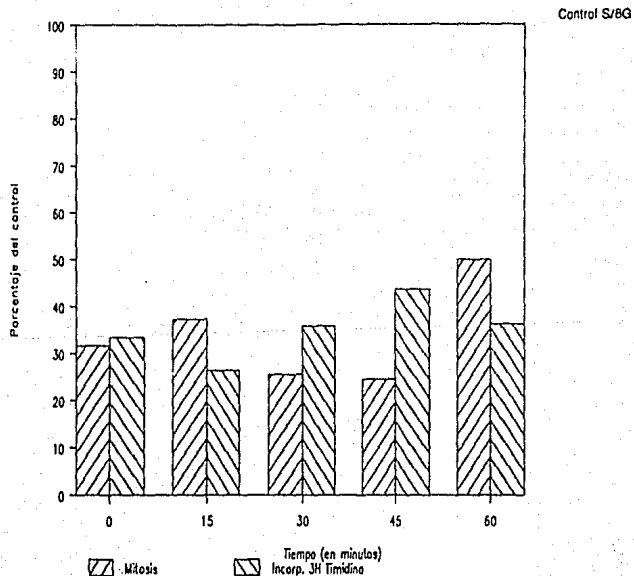
En los experimentos de dosis-respuesta con timidina, se observó un perfil parecido, en cuanto a los dos tipos de comportamiento, a lo obtenido en los experimentos de dosis-respuesta para número de figuras mitóticas con las mismas concentraciones de 8G utilizadas en ambos grupos de experimentos (histograma # 1), aunque al comparar los datos de este grupo contra su control, todos están por debajo del mismo. Los datos obtenidos se presentan en la tabla # 4 (apendice).

Para el experimento: efecto de la 8G a diferentes tiempos de agregación, se obtuvieron los siguientes resultados: para tiempos de agregación de 8G-1.9  $\mu$ M a 0, 15, 30, 45 y 60 minutos después de la siembra, se observó un menor número de figuras mitóticas de 68.4, 62.8, 74.5, 75.6 y 50 % respectivamente con relación a su control; y para la incorporación de timidina tritiada, con los mismos tiempos de agregación, un 66.6, 73.7, 64.3, 56.4 y 63.7 % por debajo de su control. Los datos obtenidos se muestran en la tabla # 5 (apéndice) para número de figuras mitóticas y en la tabla # 6 (apéndice) para incorporación de timidina tritiada, las que sirvieron de base para elaborar el histograma # 2; en donde se observó en general una respuesta por debajo de su control, como datos principales se apreció que la 8G a los 45 y 60 minutos de agregada después de la siembra, para incorporación de timidina tritiada y figuras mitóticas respectivamente, tuvo menor efecto de interferencia sobre el complejo PHA-receptor que en las demás condiciones experimentales utilizadas, lo que podría indicar que una vez que la PHA interactúa con su probable receptor, las posibles modificaciones a nivel de membrana producidas por la 8G influyen menos sobre la inducción de la proliferación celular.

## HISTOGRAMA 2

Efecto de la 8G [1.9  $\mu$ M] a diferentes tiempos de agregación después de la siembra, en todos los casos se añadió PHA a la dosis habitual al momento de iniciar el cultivo

52



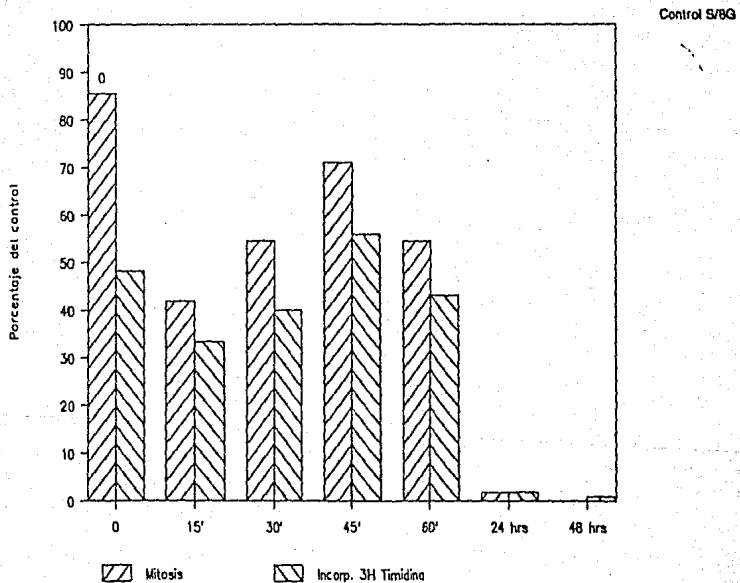
Los resultados obtenidos en el experimento: efecto de la PHA a diferentes tiempos de agregación, tabla # 7 (apéndice) para figuras mitóticas y tabla # 8 (apéndice) para incorporación de timidina tritiada, que se utilizaron para la elaboración del histograma # 3, indican que para tiempos de agregación de la PHA, después de la siembra, de 0, 15, 30, 45 y 60 minutos y 24 y 48 horas, hubo un menor número de figuras mitóticas de 14.6, 58.2, 45.5, 29.1, 45.5, 98.2 y 99.1 % respectivamente con relación a su control, y para la incorporación de timidina tritiada, con los mismos tiempos de agregación, un 51.8, 66.7, 60.1, 44.5, 98.2 y 99.1 % respectivamente por debajo de su control. Como datos relevantes, se observó que la PHA agregada al momento de la siembra y a los 45 minutos después de la misma, para figuras mitóticas, fueron los que produjeron mayor número de estas figuras con relación a los demás tiempos de agregación de la PHA; en cuanto a la incorporación de timidina tritiada, la PHA agregada a los 15 minutos después de la siembra mostró menor actividad inductora que en las demás condiciones experimentales.

Los resultados anteriores muestran en general, una respuesta por debajo del control, al igual que en el experimento: efecto de la 8G a diferentes tiempos de agregación. Se desconoce la causa de los comportamientos por debajo de sus respectivos controles en ambos experimentos.

### HISTOGRAMA 3

Efecto de la PHA (0.25 ml) agregada a diferentes tiempos después de la siembra, en todas las condiciones experimentales se añadió la 8G ( $\mu\text{M}$ ) al iniciar el cultivo

31





Como comentarios generales se considera posible que la 8G modifique la permeabilidad de la membrana celular y en función de la concentración de 8G ser el tipo de modificación, por ejemplo: mayor o menor fluidez, hiperpolarización o despolarización; y ésto provocar cambios conformacionales en los probables receptores a la PHA que faciliten o dificulten que se establezca el complejo PHA-receptor, el cual iniciaría los fenómenos bioquímicos a nivel de membrana que conducen a la división celular de los linfocitos de humano en este tipo de cultivo.

Sin embargo, la interpretación anterior no necesariamente puede ser la única forma en que actúe la 8G, pues cabe la posibilidad de que sucedan los siguientes fenómenos:

1.- Que haya interacción entre la PHA y la 8G en el medio de cultivo y con relación a la concentración de 8G sucedan dos cosas: a) el complejo PHA-receptor es inactivo y sólo la PHA actúe sobre los linfocitos; b) en función de la concentración de 8G sería el tipo de complejo PHA-receptor que se forme, el cual podría interactuar con los linfocitos o permanecer inactivo en el medio de cultivo.

2.- Que la 8G entre a la célula y desde su interior, modifique, de acuerdo con la concentración de 8G, el gradiente electroquímico de la membrana celular y/o interaccione con los niveles de nucleótidos cíclicos intracelulares, sistemas adenilato y guanilato ciclasa, lo que podría dar como resultado una respuesta diferente del probable receptor a la PHA.

Es evidente que en este trabajo se presentan resultados preliminares que en un momento dado están sujetos a modificaciones, debido a que no se cuenta con el número de datos suficientes como para ser considerados definitivos, pero se considera que aún con estos resultados iniciales, se puede visualizar la importancia de investigar los efectos de moléculas tan versátiles como la 8G en los fenómenos de la división celular.

## VI CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS

1.- Para las condiciones experimentales utilizadas se comprobó que: los linfocitos de humano no proliferan por si solos; y que la PHA y el choque hipotónico son necesarios para la inducción y observación, respectivamente, de figuras mitóticas.

2.- Se obtuvo una curva dosis-respuesta con dosis de 8G que están dentro del intervalo para producir respuestas observables con relación a la proliferación celular.

3.- La 8G por si sola no es inductora de la división celular.

4.- A las concentraciones utilizadas en este trabajo, la 8G no parece producir aberraciones cromosómicas observables.

A continuación se sugieren algunas ideas que posiblemente contribuyan a la obtención de nuevos datos para conocer el o los efectos de la 8G sobre los linfocitos de humano en cultivos de este tipo y en un momento dado el o los probables mecanismos:

1.- Obtención de datos con concentraciones de 8G menores de 0.19 uM y de concentraciones intermedias a las utilizadas, para completar la curva de dosis-respuesta.

2.- Rastreo de la 8G y PHA con elementos radiactivos (autorradiografía secuenciada para averiguar el sitio de acción de la 8G y si en un momento dado interacciona directamente con la PHA.

3.- Obtención de cultivos de linfocitos aislados y sincronización de los mismos, para comparar el efecto de la 8G con el obtenido en los linfocitos con sangre completa.

## VII BIBLIOGRAFIA

Allwood, G., Asherson, G.L., Davey, M.I., Goodford, P.J. 1971. The early uptake of radioactive calcium by human lymphocytes treated with phytohaemagglutinin. *Immunology*. 21 : 509-516.

Arakaki, D.T. y Sparkes, R.S. 1963. Microtechnique for culturing leukocytes from whole blood. *Cytogenetics*. 2: 57-60.

Bernheim, J.L., Dorian, R.E., Mendelsohn, J. 1978. DNA synthesis and proliferation of human lymphocytes in vitro. I Cell Kinetics of response to PHA. *J Immunol* 120 : 955-962.

Burnet, F.M. 1976 a. The mechanism of immunity. *Immunology. Readings from Scientific American*. W.H. Freeman and Company. San Francisco. U.S.A. 275 pp.

Burnet, F.M. 1976 b. *Immunology, Aging and Cancer*. Chap. 3 T and B Cells. W.H. Freeman and Company. San Francisco. U.S.A. 31-49.

Coutinho, A., Gronowicz, E., Moller, G. 1975. Activation of lymphocytes by antigen and mitogen. En: *Regulation of growth and Differentiated Function in Eukaryote Cells*. (Ed. Talvar, G.P.) Raven Press Pub. New York. U.S.A. 213-227.

Davidoff, F. 1973. Guanidine derivatives in medicine. *N Engl J Med* 289 : 141-146.

De Robertis, E. 1976. Synaptic receptor proteins and chemical excitable membranes. En: *The Structural Basis of membrane Function*. (Ed. Y. Hatefi y L. Djavadi-Ohanian). Academic Press. New York. U.S.A. 339-361.

De Rubertis, F.R., Zenser, T.V., Adler, W.H., Hudson, T. 1974. Role of cyclic adenosine 3,5-monophosphate in lymphocyte mitogenesis. *J Immunol* 113:151-161.

Dyson, R. D. 1976. *Cell Biology. A Molecular Approach*. 5a. Edition. Chap. 11: *Specialized Cells of the Blood and Lymph*. Allyn and Bacon Inc. Boston. U.S.A. 499-552.

Faguet, G.B. 1977. Mechanisms of lymphocyte activation. *J Biol Chem* 252 : 2095-2100.

Fastier, N.F. 1962. Structure-activity relationships of amidine derivatives. *Pharmacol Rev* 14: 37-90.

Fredrik Leeb-Lundberg, M.L., Mathis, A. S. 1990. Guanine Nucleotide Regulation of B2 Kinin Receptors. *J Biol Chem* 265:

9621-9627.

Forteza, G. 1964. Atlas of Blood Cytology. Second Part. Ed. Toray. U.S.A. 61-96.

Gekko, K., Ito, H., 1990. Competing solvent effects of polyols and Guanidine Hydrochloride on protein stability. J Biochem 107: 572-577.

Gómez-Puyou, A., Sandoval, F., Lotina, B., y Tuena de Gómez-Puyou, M. 1973. Guanidine sensitive transport of Na and K in mitochondria. Biochem Biophys Res Commun 52: 74-78.

Hadden, J.W., Hadden, E.M., Haddox, M.K., Goldberg, N.D. 1972. Guanosine 3',5'-cyclic monophosphate: a possible intracellular mediator of mitogenic influences in lymphocytes. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 69: 3024-3027.

Larsen, B., Heron, L. 1978. Modification of lymphocytes response to phytomitogens by polycations and polyanions. Experientia 34: 1224-1226.

Lehninger, A.L. 1976. Biochemistry. 2a Ed. Worth Publishers Inc New York. U.S.A. 1104pp.

Lerner, R.A., Dixon, F.J. 1973. The human lymphocyte as an experimental animal. Sci. Am. 228: (6) 82-91.

Lindahl-Kiessling, K. 1972. Mechanism of phytohemagglutinin (PHA) action. V PHA compared with Concanavalin A (Con A). Exp. Cell Res. 70: 17-26.

Liang, J.S., Lin, Z.Y., Zhou, M.J., Tsou, L.Ch., Wu, P., Zhou, Z., 1990. Dissociation and aggregation of D-glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase during denaturation by guanidine hydrochloride. Biochim Biophys Acta. 1038: 240-246.

Ling, R.N. y Kay, E.J. 1975. Lymphocyte Stimulation. 2a. Ed. North-Holland Publishing Company. Amsterdam. Netherlands 398 pp.

Lwoff, A. 1966 Interaction among virus, cell and organism. Science. 152: 1216-1220.

Lucas, J.Z. 1971. Regulatory control of nucleic acid synthesis during blastogenesis of lymphocytes in culture. En: Drugs and Cell Regulation. (Ed. E. Mihich). Academic Press. New York. U.S. A. 159-183

Mazumder, H.K., Mandal, R.K., 1975. Synthesis of stable RNA and regulation of growth in phytohemagglutinin stimulated human lymphocytes. En: Regulation of Growth and Differentiated Function

in Eukaryote Cells. (Ed. G. P. Talvar). Raven Press Pub. New York. USA 207-211.

Moorhead, P.S., Nowell, C.P., Mellman, W.J., Battips, D.M., Hungerford, D.A. 1960. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell Res.* 20: 613-616.

Nowell, C.P. 1960. Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of human leukocytes. *Cancer Res* 20: 462-466.

Olivera, D.H., 1990 Efecto de compuestos anfífilicos sobre la H+ATPasa de la membrana plasmática de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de grado de Maestría en Investigación Biomédica Básica. U A C P y P del CCH. UNAM.

Ongay, L.M.L. 1978. Modelo experimental del desarrollo de una población de linfocitos humanos in vitro. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. UNAM.

Pace, N.C., Laurents, V.D., Thompson, A.J. 1990. pH dependence of the urea and Guanidine Hydrochloride denaturation of Ribonuclease A and Ribonuclease T1. *Biochemistry*. 29: 2564-2572.

Papa, S. Tuena de Gómez-Puyou, M., Gómez-Puyou, A. 1975. On the mechanism of action of alkylguanidines on oxidative phosphorylation in mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 55: 1-8.

Peña, A. 1973. Studies with guanidines on the mechanism of K transport in yeast. *FEBS lett* 34: 117-119.

Ponce, D.P. 1979 El efecto del calcio sobre la división celular de los linfocitos humanos in vitro. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. UNAM.

Rogers, J.C., Boldt, D., Kornfeld, S., Skinner, S.A., Valeri, C.R. 1972. Excretion of deoxyribonucleic acid by lymphocytes stimulated with PHA or antigen. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.* 69:1685-1689.

Salmón, M., Tuena de Gómez-Puyou M., Gómez-Puyou, A. 1976. A method for the synthesis of 14C-octylguanidine sulphate. *Chemistry and Industry* 2:852.

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

Sims, L.J., Sikorski, W.G., Catino, M.D., Berger, J.S., Berger, A.N. 1982. Poly(adenosinediphosphoribose)polymerase inhibitors stimulate unscheduled deoxyribonucleic acid synthesis in normal human lymphocytes. *Biochemistry* 21: 1813-1821.

Smith, J.W., Steiner, A.L., Parker, Ch.W., 1971. Human lymphocyte metabolism. Effects of cyclic and noncyclic nucleotides on sti-

mulation by phytohemagglutinin. J Clin Inv. 50: 442-448.

Surowy, S.C., Berger, A.N. 1983. Unique acceptors for poly(ADP-Ribose) in resting, proliferating and DNA-damaged human lymphocytes. Biochim Biophys Acta. 740:8-18.

Weinstein, Y., Chambers, D.A., Bourne, H.R., Melmon, K.L. 1974. Cyclic GMP stimulates lymphocytes nucleic acid synthesis. Nature. 251: 352-353.

Whitney, R.B., Sutherland, R.M. 1972a. Enhanced uptake of calcium by transforming lymphocytes. Cell Immunol. 5:137-147.

Whitney, R.B., Sutherland, R.M. 1972b. Requirements for calcium ions in lymphocyte transformation stimulated by phytohemagglutinin. J Cell Physiol. 80:329-337.

Whitney, R.B., Sutherland, R.M. 1973. Effects of chelating agents on the initial interaction of phytohemagglutinin with lymphocytes and the subsequent stimulation of amino acid uptake. Biochim Biophys Acta. 298:790-797.

## VIII APENDICE

TABLA # 1

UTILIZACION DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE 8G, PRESENCIA DE PHA Y EMPLEO DE CHOQUE HIPOTONICO PARA LA OBTENCION DE FIGURAS MITOTICAS.

[8G $\mu$ M]	FIGURAS MITOTICAS OBSERVADAS	CONDICIONES	
0	5	S/PHA	C/CHOQUE HIPOTONICO
0	1	S/PHA	S/CHOQUE HIPOTONICO
190	0	S/PHA	C/CHOQUE HIPOTONICO
190	0	C/PHA	S/CHOQUE HIPOTONICO
		C/PHA	C/CHOQUE
CONTROL	0	C/PHA	S/CHOQUE HIPOTONICO
0	0	S/PHA	CON
190	0	S/PHA	
56	0	S/PHA	
19	0	S/PHA	CHOQUE
190	0	C/PHA	
56	0	C/PHA	
19	0	C/PHA	
CONTROL	612	C/PHA	HIPOTONICO
0	0	S/PHA	CON
19	0	S/PHA	
5.6	0	S/PHA	
1.9	0	S/PHA	CHOQUE
19	0	C/PHA	
5.6	256	C/PHA	
1.9	408	C/PHA	
CONTROL	357	C/PHA	HIPOTONICO

ESTA TESIS NO DEBE SALIR DE LA BIBLIOTECA



TABLA # 2

EFFECTO DE LA 8G A A DIFERENTES CONCENTRACIONES EN PRESENCIA DE PHA CON RELACION AL NUMERO DE FIGURAS MITOTICAS OBSERVADAS.

[86 $\mu$ M]	FIGURAS MITOTICAS OBSERVADAS
13	7
9.5	32
5.6	92
1.5	417
0.95	433
0.56	303
0.19	374
CONTROL	260
13	2
9.5	38
5.6	231
1.9	488
0.95	512
0.56	473
0.19	458
CONTROL	339
13	5 +
9.5	26 +
5.6	162 +
1.9	13
0.95	13
0.56	24 +
0.19	6
CONTROL	8
13	7 +
9.5	25 +
5.6	26 +
1.9	27
0.95	20
0.56	CONTAMINADO
0.19	13
CONTROL	17
13	50
9.5	88
5.6	42
1.9	74
0.95	29
0.56	23
0.19	26
CONTROL	139

+ DATO ESTADISTICAMENTE RECHAZADO

TABLA # 3

PORCENTAJE DE LAS FASES DE LA MITOSIS CON RELACION A LAS  
DIFERENTES CONCENTRACIONES DE 8G UTILIZADAS.

[8G $\mu$ M]	PROFASE	METAFASE	ANAFASE	TELOFASE	TOTALES
13	0	100	0	0	100
9.5	5.23	86.88	7.89	0	100
5.6	1.29	98.28	0.43	0	100
1.9	4.50	92.43	1.23	1.84	100
0.43	2.54	95.12	0.39	1.95	100
0.56	2.60	94.23	1.90	1.27	100
0.19	3.49	93.02	2.40	1.09	100
CONTROL	2.95	91.75	2.35	2.95	100

TABLA # 4

RESPUESTA DE LOS LINFOCITOS A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE 8G MEDIANTE LA INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA.

[8G $\mu$ M]	KDFM	DESVIACION ESTANDAR	ERROR ESTANDAR	% CONTROL	x % CONTROL	DESVIACION ESTANDAR	ERROR ESTANDAR	% x
19	688.57	151.01	87.18	3.8	---	---	---	+
13	1034.56 4471.12	73.08 987.36	42.19 570.05	18.94 10.07	14.51	6.27	4.44	30.5
9.5	630.75 2103.75 4386.11	268.34 644.98 1986.63	189.75 372.38 1146.98	35.90 38.52 13.10	29.17 29.17	13.98	8.07	27.66
5.6	2764.43 1299.40	713.98 669.19	412.21 386.36	50.62 24.78	37.70	18.27	12.92	34.27
1.9	1866.85 6785.90 13317.80 8506.35	411.74 1961.40 2548.57 1378.23	291.15 1132.41 1471.43 795.72	106.27 124.45 39.77 47.23	79.43	42.26	21.13	26.60
0.95	1731.30 4347.00 15919.48 13966.52	251.30 1114.26 1158.74 6221.74	177.70 643.32 699.00 3592.12	98.55 79.60 47.54 77.55	75.81	21.08	10.54	13.90
0.56	3116.91 16960.58	199.49 4796.98	115.17 2769.54	57.07 50.65	53.86	4.54	3.21	5.95
0.19	246.85 3121.11 12324.81 12608.14	14.07 294.73 1859.76 3136.28	9.95 170.16 1073.73 1810.73	14.05 57.15 36.81 70.01	44.51	24.48	12.24	27.49
CONTROL	1756.70 5460.60 33485.02 18008.59	28.00 1654.99 3954.73 910.21	19.80 955.51 2283.26 525.51	11.96 37.20 228.13 122.69	100	97.68	38.84	38.84

+ UN SOLO DATO

LAS CONCENTRACIONES QUE PRESENTAN MENOR NUMERO DE DATOS SON DEBIDO A QUE AL HACER LA PRUEBA DE VALIDEZ ESTADISTICA (PORCENTAJE DEL PROMEDIO) DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS, ESTOS EXCEDIERON EL 40% CONSIDERADO POR ONGAY (1978) PARA SER TOMADOS COMO VALIDOS ESTADISTICAMENTE PARA ESTE TIPO DE SISTEMA EXPERIMENTAL POR LO CUAL FUERON DESECHADOS.

TABLA # 5

MITOSIS OBSERVADAS CON LA ADMINISTRACION DE 8G [1.9  $\mu$ M] A DIFERENTES TIEMPOS DESPUES DE LA SIEMBRA; EN TODOS LOS CASOS, LA PHA SE AGREGO AL MOMENTO DE LA SIEMBRA.

FIGURAS		TIEMPO DE AGREGACION
MITOTICAS OBSERVADAS	% CONTROL	DE 8G [1.9 $\mu$ M] DESPUES DE LA SIEMBRA (EN MINUTOS)
31	31.63	0
37	37.25	15
25	25.51	30
24	24.48	45
49	50.00	60
98	100	CONTROL

TABLA # 6

INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA CON DIFERENTES TIEMPOS DE AGREGACION DE 8G [1.9 μM] DESPUES DE LA SIEMBRA. LA PHA SE AGREGO, EN TODOS LOS CASOS, A LA SIEMBRA.

(TIEMPO EN MINUTOS)	x DPM	DESVIACION ESTANDAR	ERROR ESTANDAR	% CONTROL	x % CONTROL	DESVIACION ESTANDAR	ERROR ESTANDAR	% x
0	8488.4	1231.94	711.26	36.32 27.84	33.43	4.85	2.80	8.37
				35.82				
15	6695.3	2443.33	1410.66	26.60 35.87 16.63	26.37	9.62	5.56	21.08
				43.30				
30	9081.1	2299.11	1327.39	38.27 25.72	35.76	9.05	5.23	14.62
				51.14				
45	11092.5	1836.97	1060.58	36.69 43.22	43.68	7.24	4.18	9.56
				42.58				
60	9225.1	1451.87	838.24	35.05 31.36	36.33	5.72	3.30	9.08
				142.71				
CONTROL	25389.9	10452.28	6034.63	60.57 96.70	100	41.17	23.77	23.77

TABLA # 7

MITOSIS ENCONTRADAS AL AGREGAR PHA (0.25 ML) A DIFERENTES TIEMPOS DESPUES DE LA SIEMBRA EN TODOS LOS CASOS; EXPERIMENTALES SE ADMINISTRO 8G [1.9  $\mu$ M] DURANTE LA SIEMBRA.

FIGURAS MITOTICAS OBSERVADAS	% CONTROL	PHA AGREGADA TIEMPO DESPUES DE LA SIEMBRA
47	85.45	0
23	41.81	15'
35	54.54	30'
39	70.99	45'
30	54.54	60'
1	1.81	24 HORAS
0	0	48 HORAS
55	100	CONTROL S/8G

TABLA # 8

INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA A DIFERENTES TIEMPOS DE AGREGACION DE PHA DESPUES DE LA SIEMBRA; EXCEPTO EN EL CONTROL, EN LAS DEMAS CONDICIONES SE ADICIONA 8G (1.9 μM) AL MOMENTO DE LA SIEMBRA.

PHA										
AGREGADA										
8G	TIEMPO	x DPM	DESVIACION	ERROR	λ	x λ	DESVIACION	ERROR	λ x	
(1.9 μM)	DESPUES DE LA SIEMBRA		ESTANDAR	ESTANDAR	CONTROL	CONTROL	ESTANDAR	ESTANDAR		
A LA					59.44					
SIEMBRA	0	7454.67	1538.95	886.51	44.80	48.22	9.96	5.75	11.9	
					40.43					
					36.61					
"	15'	5151.80	579.93	334.82	29.24	33.32	3.75	2.16	6.48	
					34.12					
					34.47					
"	30'	6174.26	874.62	504.96	45.77	39.94	5.66	3.27	8.18	
					39.59					
					59.51					
"	45'	8634.47	828.56	478.37	49.75	55.91	5.36	3.09	5.52	
					58.47					
					43.43					
"	60'	6660.82	682.86	394.25	45.77	43.09	4.42	2.55	5.91	
					58.47					
					1.74					
"	24 HORAS	284.57	21.31	12.31	1.99	1.84	0.13	0.08	4.34	
					1.78					
					1.07					
"	48 HORAS	146.59	18.77	10.84	0.32	0.94	0.12	0.07	7.44	
					0.83					
CONTROL					92.97					
	0	15457.16	4325.11	2497.10	76.20	100	27.98	16.15	16.15	
					130.82					