

Tema: *Biología celular*

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

EFFECTO DE LA ADENOSINA EN CELULAS
LINFOIDES DE RATA IN VITRO

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO
DE BIOLOGO

PRESENTA

MARIA GUADALUPE DELGADILLO REYNOSO

MARZO DE 1985



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A

mis padres
Eva y Rodolfo

B

mis hermanos
Eduardo, Rodolfo, Pablo y Patricia

A

Josés Manuel León Cázares por su valiosa dirección y estímulo

A

María Teresa Peña Ransel por su ayuda y sus opiniones

El presente trabajo se realizó bajo la dirección de Jesús Manuel León Cázares, en el laboratorio de Biología Celular del Departamento de Bioenergética del Centro de Investigaciones en Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México.

EFFECTO DE LA ADENOSINA EN CELULAS LINFOIDES DE RATA IN VITRO

INDICE

	Página
I) RESUMEN	1
II) INTRODUCCION	2
A) Células linfoides	2
B) Ciclo Celular	5
C) Adenosina	8
-Metabolismo en células de mamífero	9
-Efectos en el metabolismo de células linfoides	13
D) Propósito de este trabajo	16
III) MATERIALES Y METODOS	18
A) Obtención y siembra de células linfoides de rata	18
B) Parámetros para estudiar el comportamiento de las células en cultivo	19
-Viabilidad	19
-Incorporación de timidina tritiada	19
-Núcleos con condensación cromosómica	19
-Cuantificación de ADN.	19
-Cuantificación de proteínas.	20
C) Análisis estadístico.	20
IV) RESULTADOS	22
A) Dosis respuesta a la Adenosina.	22
-Esplenocitos, timocitos, linfocitos de sangre periférica y células de la médula ósea de rata	22

página

B) Efecto de la Adenosina (5 μ M) a tiempos cortos en esplenocitos y timocitos de rata	22
C) Dosis respuesta a la Adenosina en timocitos de conejo.	40
V) DISCUSION Y CONCLUSIONES	51
VI) BIBLIOGRAFIA	58
VII) ABREVIATURAS	62

I) RESUMEN

La Adenosina es un nucleósido intermediario en la ruta de degradación y síntesis de los nucleótidos púricos. Varios autores reportan que este nucleósido en concentraciones micromolares impide la blastogénesis en células linfoides de varias especies cultivadas in vitro (Fox y Kelley, 1978). Se desconoce el mecanismo que produce este efecto.

En este trabajo se estudia el comportamiento de los esplenocitos, los timocitos y los linfocitos de sangre periférica de rata in vitro bajo el efecto de la Adenosina reflejado en la incorporación de timidina tritiada, la viabilidad, la presencia de núcleos con condensación cromosómica, la cuantificación de ADN y proteínas.

Se observa que la Adenosina con un intervalo de concentraciones que va de 2.5 a 50 μM no modifica el comportamiento de las células linfoides de rata que se encuentran en la fase S del ciclo celular a las 2 horas de incubación. De la misma manera, una concentración de 5 μM de Adenosina no tiene ningún efecto en los esplenocitos y en los timocitos de esta especie a 2, 4 y 24 horas de incubación al estudiarlos con los parámetros anteriormente mencionados.

Se discuten algunos mecanismos para tratar de explicar esta falta de efecto por parte de la Adenosina en las células linfoides de rata in vitro.

II) INTRODUCCION

A) CELULAS LINFOIDES

Las células libres que se encuentran entre las tramas del estroma de la médula ósea, representan todas las etapas de la maduración de eritrocitos y leucocitos. En la figura 1 se observan estas etapas (Modificado de Cline, 1975; y de Metcalf, 1984). Se cree que a partir de una célula original se forman 2 células llamadas unipotente y pluripotente. La primera da origen a las células linfoides con su subsecuente diferenciación. Por otra parte, la célula pluripotente origina a las otras células sanguíneas.

Las células linfoides se localizan dentro de los espacios de la red de fibras reticulares de los tejidos linfáticos como por ejemplo el bazo, el timo y los ganglios linfáticos; en el tejido sanguíneo y en la médula ósea.

Las células linfoides interactúan en los órganos linfoides y en los demás tejidos con los antígenos, que han sido llevados a esas áreas vía la sangre o la linfa. De este manera las células estimuladas pueden proliferar y diferenciarse.

En la figura 2 se pueden observar las vías de migración de las células linfoides (Tomado de Cline, 1975). Esta migración es de suma importancia en el desarrollo y en el mantenimiento del sistema inmune normal.

Para los propósitos de este trabajo únicamente se mencionarán algunas de las principales características de las células linfoides utilizadas.

Linfocitos de sangre periférica.- Actualmente se acepta la existencia de dos tipos de linfocitos en este tejido. A pesar de que los dos probablemente se derivan de un mismo precursor en la médula ósea, las características que presentan no son las mismas.

Los linfocitos B migran a la sangre periférica sin pasar por el timo y tienen la capacidad de diferenciarse en células plasma después de un estímulo antígeno. Estas últimas son la fuente principal de inmunoglobulinas.

Por otra parte, los linfocitos T o timocitos están involucrados en el reconocimiento antígeno y las reacciones celulares inmunes. Estos linfocitos derivan del timo y por lo tanto son dependientes de este órgano para su desarrollo completo (Cline, 1975; Lins y Kay, 1975).

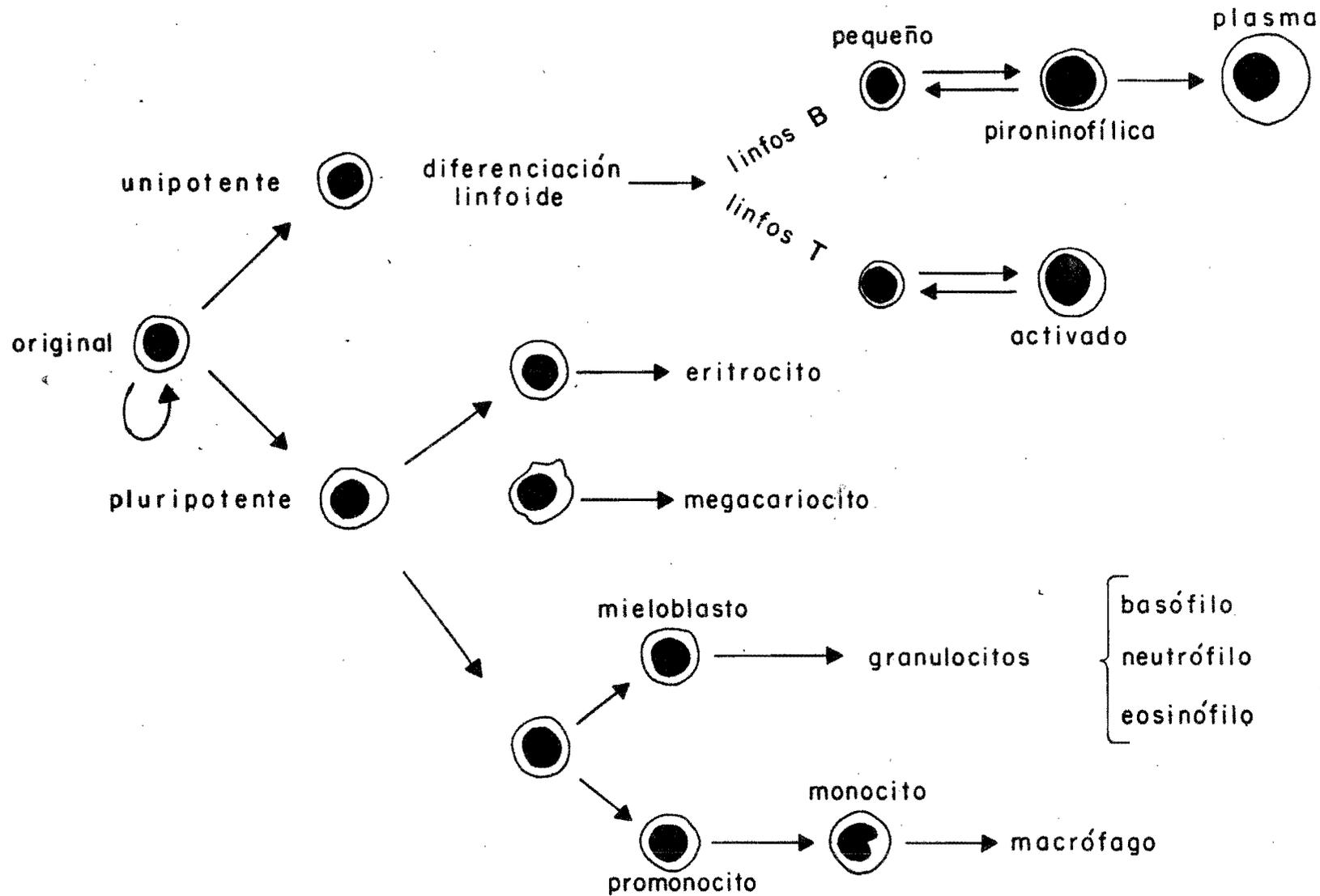
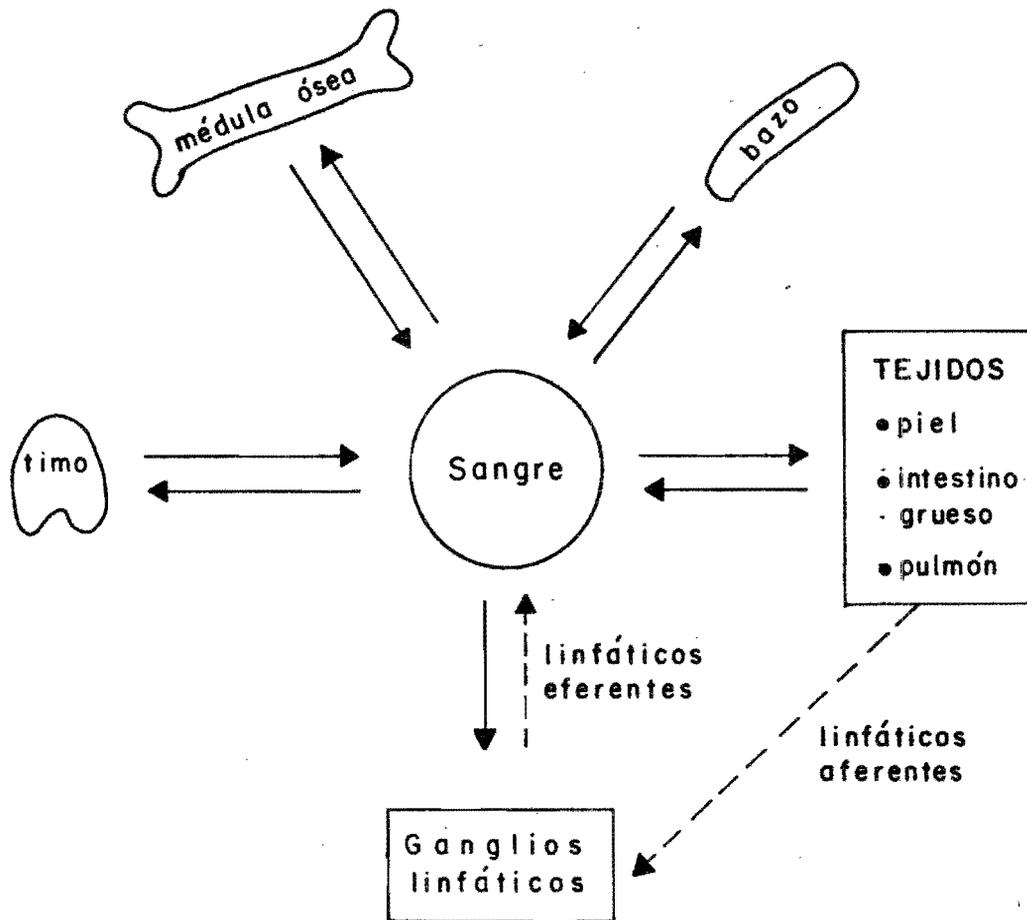


Figura 1 Diagrama del desarrollo de leucocitos y eritrocitos a partir de la célula original (modificado de Cline, 1975 y de Metcalf, 1984).



Las líneas punteadas significan que el mecanismo responsable de esa migración se desconoce; (tomado de Cline, 1975).

Figura 2 Vías de migración de los linfocitos.

Timocitos.- En el timo existe una gran cantidad de linfocitos llamados timocitos, distribuidos en la corteza y en la médula de cada lobulillo.

Los timocitos que se encuentran en la corteza presentan una gran proliferación. La velocidad de división de estas células, también llamadas linfoblastos T, es mayor en el recién nacido y disminuye conforme el animal crece.

Los timocitos localizados en la médula de cada lobulillo son células maduras, ahí se vuelven inmunocompetentes. Cada timocito maduro posee su propia población homóloga con receptores en la superficie de la membrana capaz de unirse a un antígeno determinado.

Normalmente en el timo no hay células plasma, como tampoco células de memoria que son las que responden rápidamente a la reaparición de algún antígeno (Cline, 1975; Kessel y Kardon, 1979).

Esplenocitos.- Los linfocitos que se encuentran en el bazo, principalmente en la pulpa blanca, reciben el nombre de esplenocitos. Estas células pertenecen a un grupo heterogéneo de linfocitos B y T que incluyen linfocitos no estimulados, linfoblastos, células plasma y células de memoria.

Así, en las zonas de transición entre la pulpa roja y la pulpa blanca llamada zona marginal existen esplenocitos que interactúan con antígenos y con macrófagos. Otros esplenocitos que se encuentran en los centros germinales de los nódulos esplénicos presentan una gran proliferación. En el estroma esplénico de la pulpa roja se pueden localizar células plasma (Kessel y Kardon, 1979).

B) CICLO CELULAR

El lapso de tiempo comprendido entre la formación de la célula, mediante la división de una célula madre, y su división para formar dos células hijas recibe el nombre de ciclo celular. Es pues una unidad fundamental de tiempo a nivel celular puesto que define el ciclo de vida de la célula (Mitchison, 1971).

El ciclo celular comprende esencialmente dos períodos: la interfase y el período de división. Este último consiste en dos procesos secuenciales: la división nuclear o mitosis y la división citoplasmática o citocinesis (Mitchison, 1971; Alberts y col., 1983).

Con la ayuda de las técnicas de autorradiografía,

Howard y Pelc en 1953, definieron cuatro fases sucesivas en el ciclo celular (Mazia, 1974). En la figura 3 se muestran estas fases. Después de la fase M, que consiste en la mitosis y en la citocinesis, la célula hija comienza la interfase de un nuevo ciclo. La interfase comienza con la fase G1 en la cual se reanuda la biosíntesis que durante la mitosis presentó una actividad muy lenta. La fase S empieza con la síntesis de ADN y termina cuando se lleva a cabo su duplicación. La siguiente fase es la G2 que termina al comenzar la mitosis. Finalmente, la célula entra en la fase M. Durante esta fase los cromosomas duplicados se condensan y son visibles en el microscopio de luz (Alberts y col., 1983).

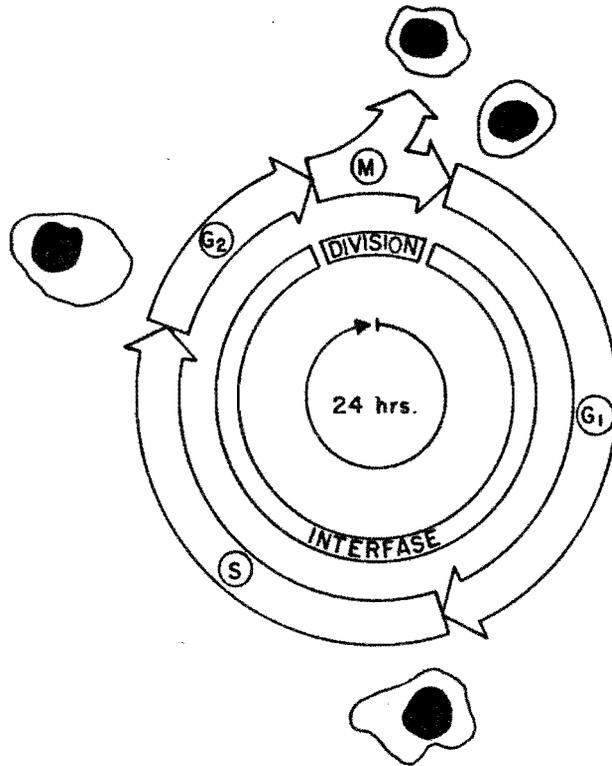
Las células de un organismo eucarionte se dividen a velocidades muy diferentes. El intervalo de los ciclos celulares estudiados varía de 2:30 horas a 100 días o más. Sin embargo, en la mayoría de las células animales y vegetales el ciclo celular se lleva a cabo en un día o menos (Mazia, 1974; Alberts y col., 1983).

Mitchison (1971) menciona que en células típicas de mamífero la fase G1 dura entre 6 y 8 horas, o incluso más tiempo. La duplicación de los cromosomas se lleva a cabo entre 6 y 7 horas. La fase G2 toma de 3 a 5 horas y la M aproximadamente 1 hora.

Betancourt y colaboradores (1978) reportan que el ciclo celular del linfocito de humano in vitro es, en promedio, de 16 horas y la duración de las fases es de 4 horas para G1, 9 horas para S y 3 horas para G2+M.

La diferencia principal entre las células que se dividen rápidamente y las que lo hacen lentamente, estriba en el lapso de tiempo que permanezcan en la fase G1 del ciclo celular. Las células que se dividen lentamente permanecen en la fase G1 por días o por años. Por el contrario, el tiempo que toma a una célula duplicar su genoma y entrar en mitosis es notablemente constante (Mitchison, 1971; Mazia, 1974; Pardee y col., 1978; Alberts y col., 1983).

Existe la evidencia de un punto débil de control en la fase G2. Se ha reportado que bajo ciertas condiciones, por ejemplo la adición de algunas drogas, las células son detenidas en esta fase (Mitchison, 1971; Pardee y col., 1978; Mustafin y Volkov, 1982).



El Período entre la fase M y el inicio de la S se denomina G₁ y el período entre el final de la síntesis de ADN y la siguiente fase M es llamado G₂ (tomado de Alberts y col., 1983).

Figura 3 Fases del ciclo celular.

No se sabe con exactitud lo que determina que una célula empiece otro ciclo celular. Algunos experimentos han demostrado que existe un punto al final de la fase G₁, llamado punto de restricción o R, después del cual la célula continúa hasta la división celular, a su velocidad normal, sin importar las condiciones externas (Pardee y col., 1978; Alberts y col., 1983).

C) ADENOSINA

La Ada fue descubierta a finales del siglo pasado. En 1929, Drury y Szent-György son los primeros en reportar los efectos farmacológicos de los nucleótidos de adenina. En relación a la Ada, mencionan que este nucleósido bloquea la conducción aurículo-ventricular, produce fibrilación auricular, baja la presión arterial, provoca vasodilatación coronaria y sistémica al aumentar el flujo coronario, disminuye la movilidad intestinal, el flujo renal e induce el sueño (Chasova de Sánchez, 1984). Años después, Berne (1963) propone a la Ada como regulador del flujo sanguíneo coronario. En 1972, Giblett y colaboradores encuentran que una deficiencia de la enzima ADA en el hombre se asocia con deficiencias severas del sistema inmune (Fox y Kelley, 1978).

La Ada forma parte de los ribonucleósidos púricos, los cuales poseen D-ribose como componente glucosilado (Fig. 4). Contiene dos anillos que corresponden a la base y a la ribofuranosa. En su conformación más estable estos anillos forman entre sí un ángulo recto, al situar el hidroxilo 2' muy próximo al átomo de nitrógeno 3 (Lehninger, 1982).

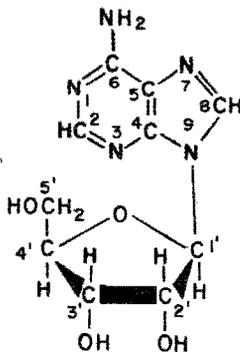


Figura 4. Adenosina (9-β-D-ribofuranosiladenina).
(Tomado de Lehninger, 1982).

Este compuesto es intermediario en la ruta de degradación y síntesis de los nucleótidos púricos. La Ada

libre se encuentra en concentraciones pequeñas en la mayoría de las células (Lehninger, 1982), y ha sido detectada principalmente en el fluido extracelular, en el plasma y por lo tanto en el medio de cultivo o en el medio de perfusión de las células (Fox y Kelley, 1978).

METABOLISMO EN CELULAS DE MAMIFERO

Transporte

Este compuesto puede entrar a la célula mediante uno o varios mecanismos de transporte con características de difusión facilitada. Parece ser que en eritrocitos y leucocitos existe un acarreador simple que resulta el transporte de los nucleósidos púricos y pirimidícos. En células nucleadas la Km del transporte de la Ada varía de 4 a 42 μM (Fox y Kelley, 1978).

Durante las fases de crecimiento de la célula, el transporte de la Ada, al igual que el de varios aminoácidos, no cambia (Pardee y col., 1978).

La figura 5 muestra la serie de reacciones involucradas en el metabolismo de la Ada (Modificado de Fox y Kelley, 1978 y de Fredholm, 1982).

Formación, degradación y utilización

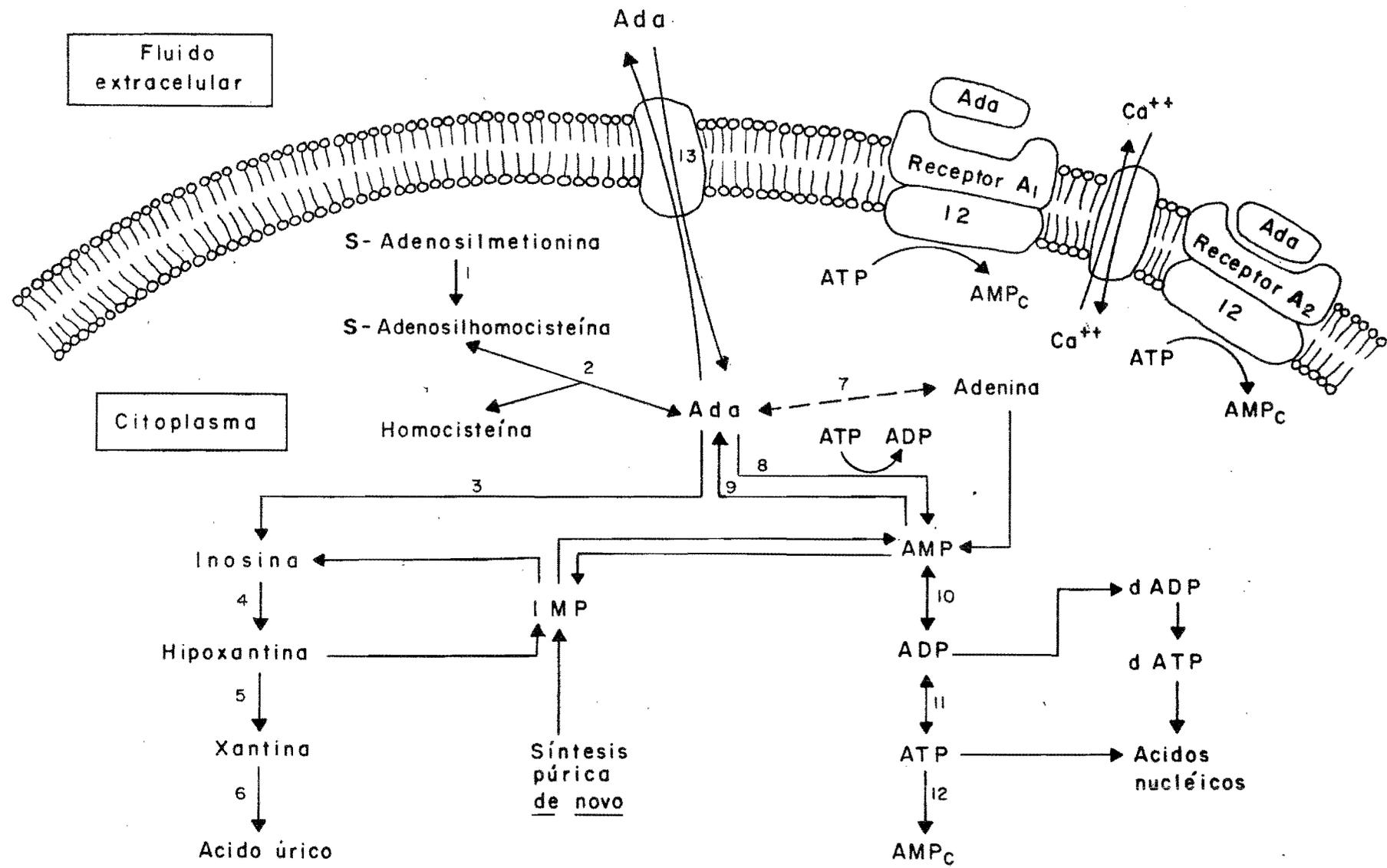
La Ada puede formarse dentro de la célula a partir del AMP o de la S-adenosilhomocisteína. El AMP intracelular es desfosforilado por una 5'-nucleotidasa o por fosfatasas inespecíficas (Reacción 9, Fig. 5). Otra fuente de Ada intracelular la proporciona la degradación de la S-adenosilhomocisteína a Ada y homocisteína. La hidrólisis es catalizada por la S-adenosilhomocisteína hidrolasa (Reacción 2, Fig. 5). Sin embargo, según Fox y Kelley (1978), parece ser que in vivo bajo condiciones normales predomina la vía de degradación. Los mismos autores mencionan que en hígado de rata y ratón la S-adenosilhomocisteína es degradada casi completamente hasta ácido úrico y en cerebro y riñón hasta inosina e hipoxantina.

Parece ser que la Ada es removida de las células por liberación directa al medio extracelular, mediante la síntesis de nucleótidos de adenina, o por la degradación a los productos púricos finales (Snyder y col., 1976; Fox y Kelley, 1978). En el primer caso, se sabe que se libera Ada en el miocardio debido a la falta de oxígeno en el pulmón, en respuesta a la hipoxia alveolar y en el hígado probablemente como fuente de purinas (Fox y Kelley, 1978).

Figura 5. Metabolismo de la Adenosina (Ada). El diagrama muestra las vías de degradación y de formación de la Adenosina dentro de la célula. La Adenosina puede también transportarse hacia adentro o hacia afuera de la célula o ejercer su efecto a través de receptores en la membrana plasmática. Las enzimas en estas vías son: 1, S-adenosilmetionina metiltransferasa; 2, S-adenosilhomocisteína hidrolasa; 3, adenosina desaminasa; 4, Purina nucleósido fosforilasa; 5 y 6, xantina oxidasa; 7, adenosina fosforilasa (no establecida); 8, adenosina cinasa; 9, 5'-nucleotidasa y fosfatasa inespecífica; 10, adenilato cinasa; 11, nucleósido difosfocinasa; 12, adenilato ciclasa.

Mecanismos de transporte, 13.

(Modificado de Fox y Kelley, 1978; y de Fredholm, 1982).



Para la síntesis de nucleótidos, la Adz es fosforilada por la AC a AMP (Reacción 8, Fig. 5). A pesar de que la enzima es ubicua, presenta la actividad más alta en el hígado, bazo y ganglios linfáticos (Fox y Kelley, 1978). Peters y colaboradores (1982a) reportan una actividad mayor de esta enzima en esplenocitos que en timocitos y linfocitos de sangre periférica de rata (Tabla 1).

Tabla 1. Actividades de la adenosina cinasa (AC) y de la adenosina desaminasa (ADA) en linfocitos de rata. Los linfocitos de sangre periférica son de adulto, los timocitos y los esplenocitos de animales de 40 días de edad. (Los resultados muestran el error estándar).

	AC (nmol/hr/ms proteína)	ADA	Proporción ADA/AC%
linfocitos de sangre periférica	367±42	2,938±720	11±1
timocitos	82±49	23,757±3876	600±253
esplenocitos	424±25	3,265±468	13±4

*Resultados de otros experimentos.
(Tomado de Peters y col., 1982a).

La Adz es degradada a inosina por la enzima ADA (Reacción 3, Fig. 5). En humanos se ha visto que para que se lleve a cabo el funcionamiento celular normal, se requiere de una actividad óptima de esta enzima puesto que una deficiencia en ella esta relacionada con un incremento en la concentración intracelular de nucleótidos de adenina. Por otra parte, el incremento en la actividad de esta enzima se relaciona con un decremento en la concentración intracelular de estos nucleótidos (Fox y Kelley, 1978).

En estudios hechos en niños recién nacidos, cerdos, borresos, ratas y ratones, Peters y colaboradores (1982a) encuentran que la actividad de la ADA es mayor en timocitos que en linfocitos de sangre periférica. De estas especies el cerdo y el borreso presentan la mayor actividad de dicha enzima en los esplenocitos. En el caballo por el contrario, la actividad de la ADA en todas las células linfoides es la más baja.

La tabla 1 presenta los resultados obtenidos por estos autores al medir la actividad de la enzima en timocitos, esplenocitos y linfocitos de sangre periférica de rata. Las

actividades de las enzimas en timocitos y esplenocitos se midieron en ratas de 40 días de edad. Sin embargo, los mismos autores (1982c) miden la actividad de ADA en esplenocitos y timocitos de rata de diferentes edades y encuentran que la actividad de esta enzima siempre es mayor en los timocitos.

Para obtener más información del metabolismo de la Ada, los mismos autores calculan las proporciones de las actividades de la ADA y de la AC de timocitos, esplenocitos y linfocitos de sangre periférica de varias especies de mamíferos. En la mayoría de ellas, los timocitos presentan la mayor proporción de ADA/AC. Según los autores lo anterior indica que estas células son más capaces que los esplenocitos o linfocitos de sangre periférica, de desaminar a la Ada; de esta manera se previene la acumulación del nucleósido y no se perturba la proliferación celular. La tabla 1 presenta las proporciones ADA/AC obtenidas en los experimentos con las células mencionadas de rata.

La Ada puede también ser degradada hasta adenina por la adenosina fosforilasa (Reacción 7, Fig. 5). Sin embargo, aunque la reacción se observe en fracciones crudas de preparaciones tisulares, en preparaciones altamente purificadas no se ve tal actividad (Fox y Kelley, 1978).

Regulación

La utilización de la Ada, es decir su conversión a nucleótidos o a inosina, depende de las actividades relativas de la ADA o de la AC (Fox y Kelley, 1978). Estas enzimas presentan diferentes afinidades en el metabolismo del nucleósido. La K_m de la ADA es de 40 μM mientras que la de la AC es de 5 μM (Martínez Valdez y col., 1982).

Snyder y colaboradores (1976), observan que en linfocitos de humano estimulados con PHA, la vía principal en el metabolismo de la Ada con concentraciones menores de 5 μM es la fosforilación a AMP, mientras que a concentraciones mayores predomina la desaminación a inosina. Sin embargo, en linfocitos no estimulados, predomina la desaminación del compuesto en un intervalo de concentraciones de Ada de 0.5 a 250 μM .

En timocitos de rata a concentraciones mayores de 50 μM de Ada, la velocidad de desaminación es 10 veces mayor a la de fosforilación (Snyder y Lukey, 1982).

Varios autores observan que el metabolismo de la Ada cambia durante la proliferación celular. Fischer y colaboradores (1976) reportan un incremento de nueve veces en la actividad específica de la ADA durante la maduración de monocitos a macrófagos de sangre periférica en humanos.

En linfocitos de humano estimulados con mitógeno la actividad de la ADA aumenta cuatro veces entre las 24 y las 60 horas de incubación (Fox y Kelley, 1978). Snyder y colaboradores (1976) observan que la actividad de la misma enzima disminuye aproximadamente en 55% a las 72 horas de incubación, mientras que el valor de la actividad de la AC no cambia.

En sangre periférica de rata in vivo, Martínez Valdez y colaboradores (1982) observan un aumento en los nucleótidos de adenina al administrar a los animales una dosis de Ada de 100 mg/kg. Según ellos este incremento se debe principalmente a la acción de la AC más que a la desaminación del compuesto.

Probablemente otro tipo de regulación de este nucleósido consista en su almacenamiento mediante su unión a proteínas en el citoplasma de la célula.

Ueland y Saebø (1979) reportan el atrape de la Ada por la S-adenosilhomocisteinasa en el hígado, el riñón, la corteza adrenal, el útero, el músculo esquelético y cardíaco de la rata y de otros mamíferos. De estos órganos, el hígado presentó un atrape mayor. Según Ueland (1983) esta unión es importante en la regulación de la actividad de esta enzima in vivo.

Belloni y colaboradores (1984) reportan en células aisladas de hígado de rata, la existencia de una poza intracelular de Ada unida a una proteína. Estos autores mencionan que probablemente la proteína a la cual se une el nucleósido sea la enzima S-adenosilhomocisteina hidrolasa. Esta poza representa aproximadamente el 75% de la Ada total medida en el hígado intacto. Lo anterior es de gran importancia pues dada la ubicuidad de esta enzima probablemente esta situación existe también en otros tejidos.

EFFECTOS EN EL METABOLISMO DE CELULAS LINFOIDES

Varios autores reportan que la Ada impide la blastogénesis en células linfoides estimuladas con PHA. El mecanismo por medio del cual el nucleósido produce este efecto se desconoce. Sin embargo, se proponen varias posibilidades entre las cuales se encuentran: una inhibición en la biosíntesis de pirimidinas, una disminución en los niveles de fosforribosil pirofosfato, un aumento en los niveles de AMPc y una inhibición de las metilaciones dependientes de la S-adenosilmetionina metiltransferasa (Fox y Kelley, 1978).

A continuación se presentan algunos reportes sobre los

efectos de la Ada en células linfoides de varias especies y su posible mecanismo de acción.

Uno de los efectos más notables de la Ada es su toxicidad en las células de mamífero en cultivo en concentraciones que van de 1 a 1,000 μM , y que se incrementa con inhibidores de la ADA (Fox y Kelley, 1978). Green y Chan (Wolbers y col., 1975) reportan la muerte de células linfoides in vitro en presencia de 1 a 10mM de Ada.

Snyder y colaboradores (1976) también reportan que los linfocitos de sangre periférica de humano estimulados con mitógeno e incubados con 50 μM de Ada, presentan un 65% de muerte celular cuando se añade cofornicina, un inhibidor de la ADA. Además, observan un decremento en el porcentaje de transformación blastoide junto con un 95% de inhibición en la incorporación de timidina tritiada. Esta baja incorporación es un reflejo de una disminución en la síntesis de ácidos nucleicos (Fox y Kelley, 1978). Bajo las mismas condiciones, pero en linfocitos no estimulados, los autores encuentran inhibición en la incorporación del precursor radiactivo, aunque no se observa muerte celular.

Frecuentemente la toxicidad de la Ada se acompaña de una inhibición en la síntesis de novo de pirimidinas. Las altas concentraciones de Ada bloquean la síntesis de novo de purinas y pirimidinas, mediante un decremento en la formación de fosforribosil pirofosfato (Carson y Seesmillery, 1976). Esta disminución ocurre cuando el fósforo inorgánico es un factor limitante. Puesto que el fosforribosil pirofosfato es un sustrato esencial para la síntesis de novo de purinas y pirimidinas, interviene en las vías de rescate de las purinas y en la síntesis de nucleótidos, un decremento en la concentración celular de este compuesto puede tener efectos metabólicos profundos (Fox y Kelley, 1978).

Peters y colaboradores (1982b) encuentran in vitro una inhibición en la incorporación de timidina tritiada en concentraciones mayores de Ada de 50 y 10 μM en linfocitos estimulados de sangre periférica de humano y de caballo respectivamente. Además, el efecto del nucleósido es más marcado a tiempos cortos de incubación. Por ejemplo, en linfocitos de caballo con o sin mitógeno, 50 μM de Ada disminuye más la concentración relativa de fosforribosil pirofosfato, a 3 horas de incubación que a 24, 48 o 72 horas.

El incremento de la actividad de la ADA durante la transformación celular inmune proporciona una evidencia indirecta de la importancia de la degradación de la Ada. Cada vez es más evidente que los efectos tóxicos de este nucleósido puedan estar relacionados con la inhibición de la

respuesta del sistema inmune (Fox y Kelley, 1978).

Wolberg y colaboradores (1975) observan que la Ada en concentraciones micromolares, causa un incremento del AMPc en linfocitos del exudado peritoneal de ratón y en linfocitos de humano, al mismo tiempo que hay una inhibición en la citotoxicidad mediada por los linfocitos. Esta inhibición desaparece cuando las concentraciones de AMPc alcanzan cierto valor crítico. Con estas observaciones los autores concluyen que probablemente el efecto inhibitor de la Ada sobre la citotoxicidad mediada por los linfocitos, es regulada vía un aumento en la concentración de AMPc en los linfocitos efectores. Además, mencionan que este efecto de la Ada puede contribuir a la falta de respuesta del sistema inmune asociada con la deficiencia de la ADA.

Zenser (1975) también observa un incremento en el AMPc de timocitos intactos de ratón a concentraciones de Ada de 2 a 100 μ M. Este incremento es significativo desde un minuto y máximo entre diez y veinte minutos. Como este efecto también ocurre en membranas plasmáticas aisladas de timocitos, concluye que el incremento del AMPc se debe principalmente a la estimulación de la adenilato ciclasa y solo parcialmente a la conversión de la Ada en AMPc.

Cada vez es más evidente el papel de la Ada como mediador intracelular involucrada en los procesos de comunicación celular.

Recientemente se ha observado que la Ada es capaz de influir a la adenilato ciclasa al causar su estimulación o su inhibición. La existencia de receptores en la membrana celular (Fig. 5) se apoya principalmente en dos hechos. La mayoría de los efectos de este nucleósido no son inhibidos por drogas que bloquean su incorporación celular, y muchas veces el efecto de la Ada puede ser mimetizado cuando se une a polímeros impermeables (Fredholm, 1982).

Casi todos los tipos celulares poseen receptores a la Ada. Estos han sido clasificados con base en intervalos por orden de potencia de ciertos agonistas. Así, los receptores A1 o R1 son inhibidores y se caracterizan por tener a los agonistas L-Nó-fenilisopropiladenosina y Nó-ciclohexiladenosina más potentes que la adenosina 5'-etilcarboxamida. Estos receptores requieren para su funcionamiento una molécula con la base púrica intacta. Mientras que, por el contrario los receptores A2 o R2 son sitios activadores que presentan a la adenosina 5'-etilcarboxamida como un agonista más potente que los dos primeros. Estos receptores generalmente requieren la presencia de una molécula con la ribosa intacta para ser activados. Se cree que estos receptores pueden también influir en la membrana celular al abrir canales de calcio.

(Fredholm, 1982; Paton, 1984).

Fredholm y Sandberg reportan que en la acumulación de AMPc en timocitos de rata y de cobayo, el tipo de receptor involucrado es el A2 (Fredholm, 1982).

Sandberg (1983) observa un incremento en la proliferación de timocitos de cobayo incubados entre 20 y 25 horas en presencia de ADA. Por otra parte, cuando solamente se agrega EHNA al medio de cultivo, hay inhibición en la proliferación celular. Este efecto no se modifica aún al añadir inhibidores del transporte celular de nucleósidos.

Este autor sostiene que la Ada endógena y la ADA, regulan la proliferación de células en cultivo. Según su hipótesis este balance entre los dos compuestos controla el nivel de AMPc intracelular mediante un receptor de Ada en la superficie de los timocitos. La enzima estimula la proliferación al disminuir los niveles de Ada extracelular; por el contrario, la EHNA inhibe la proliferación al aumentar los niveles extracelulares del nucleósido.

Todos los efectos mencionados anteriormente representan sólo algunas de las acciones de la Ada. Este compuesto es capaz de causar efectos profundos en diferentes tipos celulares.

Fox y Kelley (1978) hacen una excelente revisión de los efectos que causa este nucleósido en células linfoides y no linfoides. En ésta, además de los efectos ya mencionados, también se incluyen: el aumento de la S-adenosilhomocisteína, la inhibición de la proteína cinasa, la reducción de la síntesis de urea, el incremento en los niveles de ATP y dATP, la alteración de la morfología celular, la estimulación de la secreción hormonal, la inhibición de la lipólisis, la potenciación de la liberación de histamina, el incremento de glucógeno en el hígado, y su efecto como vasodilatador.

D) PROPOSITO DE ESTE TRABAJO

Con base en los antecedentes mencionados, se decidió realizar el siguiente trabajo para tratar de establecer como es el comportamiento de las células linfoides de rata in vitro bajo el efecto de la Ada. Además de que no existen trabajos publicados al respecto.

Las condiciones para el cultivo de estas células se basan en los datos obtenidos de los experimentos realizados en el laboratorio. Al tratar de establecer como es el comportamiento de los esplenocitos de rata en cultivo, lo primero que se hizo fue emplear las mismas condiciones que

se habían utilizado al investigar el comportamiento de los linfocitos de sangre periférica de humano y lo reportado en la literatura, en relación al cultivo de linfocitos de este roedor (Mishell y Shiigi, 1980). Así, lo primero que se observó fue una falta de estimulación en la proliferación de estas células al incubarlas durante 72 horas con el mitógeno inespecífico PHA.

Se realizaron otros experimentos con esplenocitos, timocitos y linfocitos de sangre periférica de rata. Se usaron diferentes medios, unos con suero de bovino y otros con suero de rata. Se incubaron de 1 a 15 días y los resultados, en cuanto a la estimulación con PHA, siguieron siendo negativos.

Por otra parte, paralelamente a estos experimentos se encontró que al cultivar esplenocitos y timocitos de ratón sin mitógeno, puesto que tampoco había estimulación con la PHA, durante tiempos cortos de 2, 4, 6 y 24 horas de incubación, había un máximo de incorporación de timidina tritiada a las 2 horas, la cual disminuía con el transcurso del tiempo (datos no mostrados).

Se decidió entonces hacer un experimento con esplenocitos de rata bajo las mismas condiciones, y se observó el mismo patrón que se presentaba en el ratón.

También a tiempos cortos y bajo las mismas condiciones, se realizaron experimentos con esplenocitos y timocitos de rata a los que se agregó diferentes concentraciones de Ada. Se comprobó que con concentraciones que variaban de 187 a $1,500\mu\text{M}$ del nucleósido había inhibición en la incorporación del precursor radiactivo hasta de un 90% (datos no mostrados).

Puesto que estas concentraciones de Ada resultaron ser demasiado altas, se decidió utilizar dosis más pequeñas. Se recurrió a la literatura para establecer el intervalo de concentraciones más adecuado. Fox y Kelley (1978) reportan que la K_m del transporte de la Ada en células nucleadas varía de 4 a $42\mu\text{M}$. Las enzimas implicadas directamente en la degradación del nucleósido tienen una K_m de $40\mu\text{M}$ en el caso de la ADA y de $5\mu\text{M}$ para la AC (Martínez Valdez y col., 1982). De esta manera se decidió utilizar 2.5, 5, 10, 25 y $50\mu\text{M}$ de Ada para estudiar el comportamiento de las células linfoides de rata sin mitógeno a tiempos cortos de incubación.

III) MATERIALES Y METODOS

A) OBTENCION Y SIEMBRA DE CELULAS LINFOIDES DE RATA

Se utilizaron ratas Wistar machos (Rattus norvegicus) de 200 gr aproximadamente, las cuales se sacrificaron por decapitación. La sangre periférica se recolectó en tubos de centrifuga con embudo heparinizado en una atmósfera estéril e inmediatamente se pasó a una Jeringa heparinizada.

Las células de la médula ósea se obtuvieron de la tibia y del femur. Se inyectó medio TC-199 (Difco) en la porción terminal de cada hueso para extraer la médula. Las células se dispersaron al pasarlas varias veces por la aguja con ayuda de la Jeringa (Mishell y Shiisi, 1980).

El bazo y el timo se colocaron en una caja de Petri con medio TC-199 sobre una laminilla de acero inoxidable. Con la ayuda de una espátula se maceró el tejido para dispersar los esplenocitos y los timocitos (Colowick y Kaplan, 1979).

Las suspensiones de esplenocitos, timocitos o células de médula ósea se centrifugaron a 1,000 rpm por 10 min. Se desechó el sobrenadante y las células se resuspendieron en solución lizadora de eritrocitos (Peña Rangel, 1983), se incubaron 5 min a 37° C. Después de centrifugarlas se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió en medio TC-199 a 37° C. Se tomó una alícuota para contar las células en una cámara de Neubauer. La viabilidad siempre fue mayor al 90 % al hacer la prueba de exclusión con azul tripano (Sisma) 0.5 % en solución salina al 0.85 % (Phillips, 1973).

El cultivo de las células linfoides se realizó según una modificación a la técnica de Arakaki y Sparkes (1963). Se sembraron aproximadamente 3×10^6 células linfoides y 0.5×10^6 linfocitos de sangre completa en frascos ampula de 10 ml, en 1 ml de medio compuesto por 80% de medio TC-199, 20% de suero fetal de ternera (Gibco) previamente inactivado a 60° C durante 30 min, 680 μ M de glutamina (Difco), 100 U de TC penicilina y 100 μ g de estreptomycin (Difco), junto con 300 U de heparina (Abbott). En algunos cultivos se agregó PHA M (Difco), mitógeno inespecífico, en una concentración de 0.4 mg/ml. Las diferentes concentraciones de Ada (Sisma) se prepararon en medio TC-199 y se agregaron en el momento de la siembra.

Todas las determinaciones se hicieron por triplicado,

menos en el caso de la viabilidad, en donde el error estándar se obtuvo de la suma de cinco cuadros en un hemocitómetro convencional.

B) PARAMETROS PARA ESTUDIAR EL COMPORTAMIENTO DE LAS CELULAS EN CULTIVO

Para determinar el comportamiento de las células linfoides bajo el efecto de la Ada se utilizaron cinco parámetros.

1) Viabilidad. Se utilizó la prueba del azul tripano anteriormente mencionada y las células se contaron en un hemocitómetro.

2) Incorporación de timidina tritiada. Se tomó como criterio de síntesis de ADN. Se agregó 1 μ Ci de timidina tritiada (New England Nuclear, Net 027A, actividad específica de 2 Ci/mM) a cada frasco 2 horas antes de la cosecha. Después del periodo de incubación, las células se sedimentaron por centrifugación, se fijaron en ácido acético-metanol (Baker) en proporción 1:3 v/v y se precipitaron las nucleoproteínas con ácido tricloroacético (Merck) al 7 % frío. La fracción insoluble se recolectó en filtros (Millipore) de 0.65 μ m de poro. Se añadió 0.4 ml de una solución de dodecilsulfato de sodio (Sigma) al 2% y se incubó 30 minutos a 60°C. A cada vial se añadieron 5 ml de Bray como líquido de centelleo. Se determinó la radioactividad de cada muestra en cpm en un contador de centelleo líquido (Packard).

3) Núcleos con condensación cromosómica. Con este criterio se puede observar a las células que están en la fase M del ciclo celular. A cada frasco se añadió 0.05 ml de una solución de Colcemid (Ciba) de 2 μ s/ml, 2 horas antes de la cosecha. Las células se fijaron en ácido acético-metanol 1:3 v/v. Las preparaciones se hicieron con la técnica de secado al aire (Humason, 1979) y tinción con una solución Giemsa-Leishman-agua (Sigma) en proporción 3:1:34 v/v y se observaron al microscopio de luz para contar los núcleos con condensaciones cromosómicas.

4) Cuantificación de ADN. Se utilizó una modificación de la técnica colorimétrica de Burton (1956). Las células contenidas en 500 μ l se congelaron a -70°C y se descongelaron a temperatura ambiente 2 veces. Se centrifugó el contenido a 10,000 g, el botón se resuspendió en ácido perclórico (Baker) 0.5 N y se incubó a 4°C por 30 minutos. El material se volvió a centrifugar y el botón se hidrolizó a 90°C en ácido perclórico 0.5 N durante 15 minutos. Se agregó el reactivo de Burton que contiene 20 ml de solución de difenilamina -1.5 g de difenilamina (Baker) llevados a

100 ml con ácido acético glacial y 1.5 ml de ácido sulfúrico concentrado (Baker)[△] y 0.1 ml de una solución de acetaldehído (Merck) al 2% en agua destilada.

Los tubos se incubaron de 17 a 20 horas a temperatura ambiente en la obscuridad. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro (Beckman, modelo 35) a 600 nm. Los valores obtenidos se compararon con los de la curva estándar la cual se obtuvo con 2.5, 10, 12.5 y 25 $\mu\text{s/ml}$ de ADN en ácido perclórico 0.5 N a partir de una solución de ADN (Sisma) de 200 $\mu\text{s/ml}$.

5) Cuantificación de proteínas. Se determinó el contenido de proteínas según una modificación a la técnica de Lowry y colaboradores (1951). Las células contenidas en 500 μl se lavaron 3 veces con solución salina al 0.85%. Se añadieron 4 ml de la solución "C" de Lowry por cada mililitro de la suspensión de células en solución salina - la solución "C" se obtiene con la solución "A" (2g Na_2CO_3 y 0.4g NaOH en 100 ml de H_2O) y 2 ml de la solución "B" (partes iguales de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1% y tartrato de sodio y potasio al 2.7%). Las células se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente, se agregó 0.5 ml del reactivo de Fenol (Folin-Cicalteu, Sisma) 1 N y se incubó 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se leyeron en el espectrofotómetro a 660 nm.

La absorbancia obtenida se comparó con los valores de la curva estándar. Esta curva se obtuvo a partir de una solución que contiene 1 mg/ml de albúmina de huevo (Sisma). Se hicieron diluciones con esta solución para tener 25, 50, 75 y 100 $\mu\text{s/ml}$ de proteína. Los tubos se procesaron con la solución "C" de Lowry y el reactivo de Fenol de la misma manera que los experimentales.

C) ANALISIS ESTADISTICO

La prueba estadística utilizada en este trabajo es la de "t" dada a conocer por Gosset con el seudónimo de Student. Con esta prueba se comparan las medias y las desviaciones normales de grupos de datos y se determina si entre estos parámetros las diferencias son estadísticamente significativas (Sokal y Rohlf, 1981). El caso en el que se aplica esta prueba es la comparación entre las medias de dos muestras para saber si ambas provienen de la misma población.

Para muestras iguales, la fórmula utilizada es la siguiente:

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{S_1^2 + S_2^2}{N}}}$$

donde

- \bar{X}_1 = media de la muestra 1
- \bar{X}_2 = media de la muestra 2
- N = tamaño de la muestra
- S_1^2 = varianza de la muestra 1
- S_2^2 = varianza de la muestra 2

El valor que se obtiene de "t" junto con los grados de libertad se busca en la tabla de distribución (Rohlf y Sokal, 1981). La "P" así obtenida representa la probabilidad de que la diferencia entre las muestras consideradas sea debida al azar.

Uno de los requisitos para aplicar esta prueba es que la varianza de las dos muestras no difiera significativamente. Esto se puede saber mediante la prueba de "F". Este valor se obtiene con la siguiente fórmula:

$$F = \frac{S_1^2}{S_2^2}$$

con la condición de que

$$S_1^2 > S_2^2$$

con esto

$$F > 1$$

Si el valor obtenido excede al de la tabla entonces la diferencia es significativa.

IV) RESULTADOS

A) DOSIS RESPUESTA A LA ADENOSINA

ESPLENOCITOS, TIMOCITOS, LINFOCITOS DE SANGRE PERIFERICA
Y CELULAS DE LA MEDULA OSEA DE RATA

En los experimentos de dosis respuesta, se decidió utilizar solamente la incorporación de timidina tritiada como parámetro para estudiar el comportamiento de las células linfoides de rata incubadas por 2 horas.

En la tabla 2 y en la figura 6 se observan los resultados del efecto de varias dosis de Ada (2.5, 5, 10, 25 y 50 μM) sobre la incorporación del radioisótopo en esplenocitos. Al hacer la prueba de "t" se encuentra que las diferencias de cada dosis con respecto al control no son significativas.

Las dosis de Ada anteriormente mencionadas también se probaron en timocitos bajo las mismas condiciones. La tabla 2 y la figura 7 muestran estos resultados. De la misma manera, no hubo diferencias significativas entre las dosis con respecto al control.

En el caso de los linfocitos de sangre periférica se utilizó una dosis más baja de Ada 1.25 μM y no se probó la de 50 μM . La tabla 2 y la figura 8 muestran los resultados. El análisis estadístico no muestra diferencias significativas de las diversas dosis con respecto al control.

Las dosis que se probaron en esplenocitos y en timocitos también se utilizaron en células de la médula ósea. La tabla 3 y la figura 9 muestran los resultados. Con las dosis de 2.5, 10 y 25 μM de Ada, las diferencias no son significativas con respecto al control. Sin embargo, con 5 μM ($P > 0.02$) y 50 μM ($P < 0.02$) del nucleósido, las diferencias sí son significativas con respecto al control.

B) EFECTO DE LA ADENOSINA (5.0 μM) A TIEMPOS CORTOS EN
ESPLENOCITOS Y TIMOCITOS DE RATA

Con los datos obtenidos con 5 μM de Ada en las células de la médula ósea de rata, se decidió entonces trabajar con esta dosis en las células linfoides de rata y utilizar, además de la incorporación de timidina tritiada, otros parámetros para estudiar el comportamiento de estas células a diferentes tiempos de incubación.

Tabla 2. Efecto de varias dosis de Adenosina sobre la incorporación de timidina tritiada en esplenocitos, timocitos y linfocitos de sangre periférica de rata incubados por 2 horas.

(Los porcentajes son promedios de dos a cuatro experimentos cada uno por triplicado; se muestra el error estándar. Entre paréntesis aparece el número de experimentos).

Adenosina (μ M)	% del control		
	esplenocitos	timocitos	linfocitos de sangre periférica
0.00	100.0 \pm 12.2(3)	100.0 \pm 11.0(3)	100.0 \pm 12.2(4)
1.25	---	---	108.0 \pm 13.6(2)
2.50	86.5 \pm 11.3(3)	89.7 \pm 2.0(3)	135.4 \pm 1.9(2)
5.00	80.7 \pm 29.1(3)	78.5 \pm 6.4(3)	103.8 \pm 9.1(3)
10.00	82.1 \pm 22.2(3)	89.8 \pm 4.6(3)	113.9 \pm 6.4(3)
25.00	92.1 \pm 20.8(3)	89.0 \pm 6.4(3)	98.5 \pm 20.7(2)
50.00	107.7 \pm 9.6(3)	93.2 \pm 10.9(3)	---

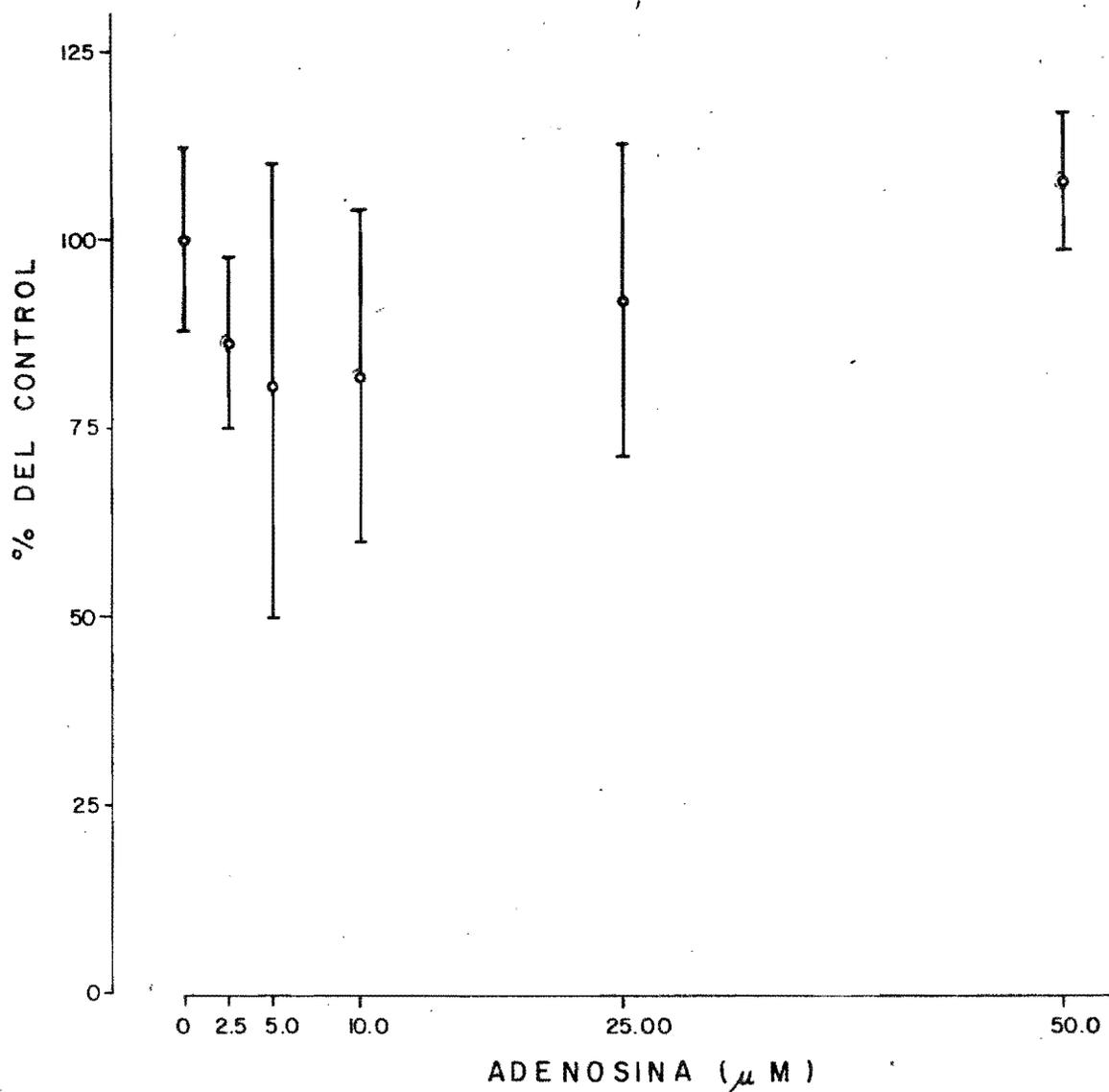


Figura 6 Efecto de varias dosis de Adenosina sobre la incorporación de timidina tritiada en esplenocitos de rata incubados por 2 horas.

(Los porcentajes son promedios de tres experimentos, cada uno por triplicado, se muestra el error estándar).

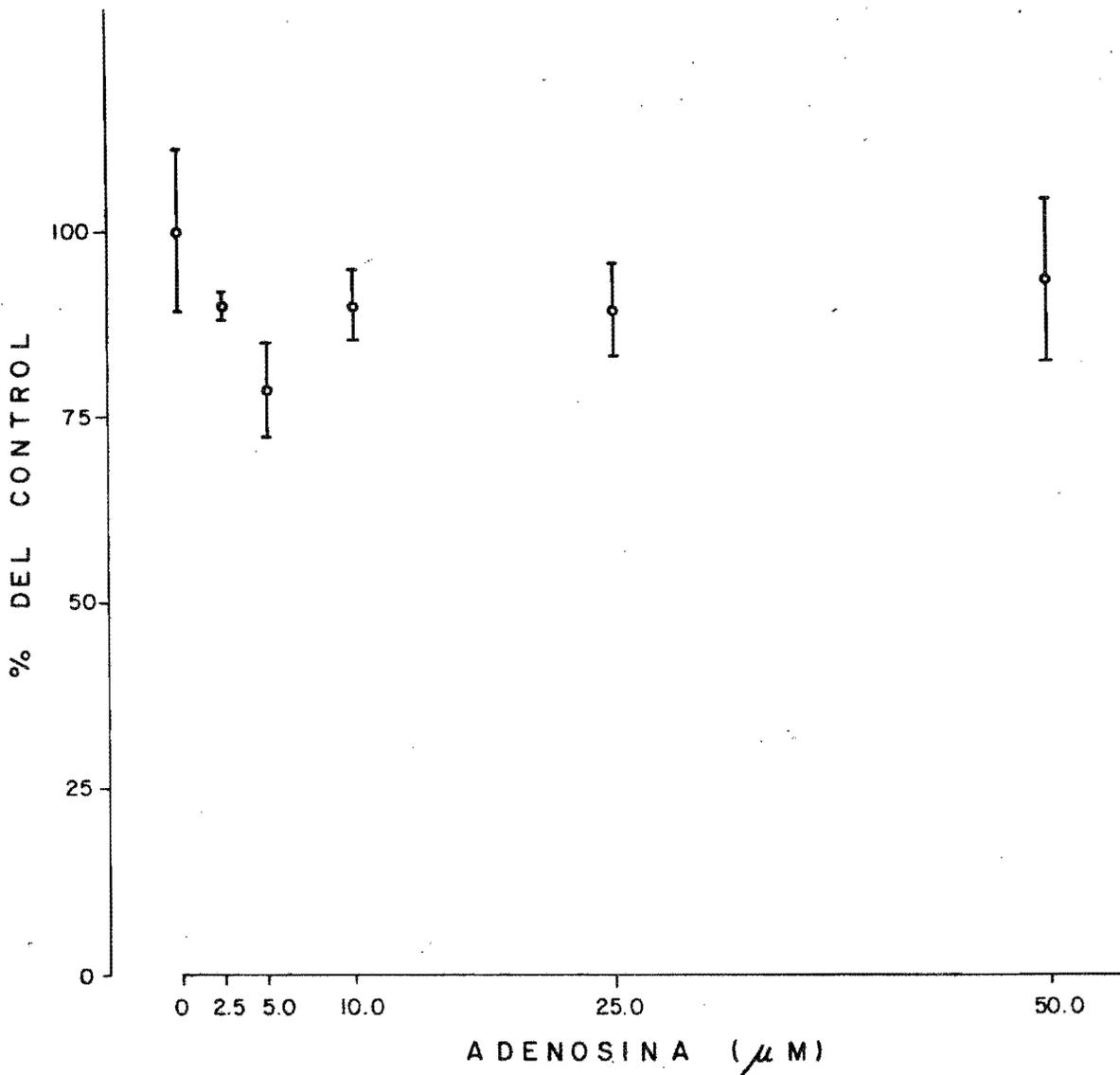


Figura 7 Efecto de varias dosis de Adenosina sobre la incorporación de timidina tritiada en timocitos de rata incubados por 2 horas.

(Los porcentajes son promedios de tres experimentos cada uno por triplicado; se muestra el error estándar).

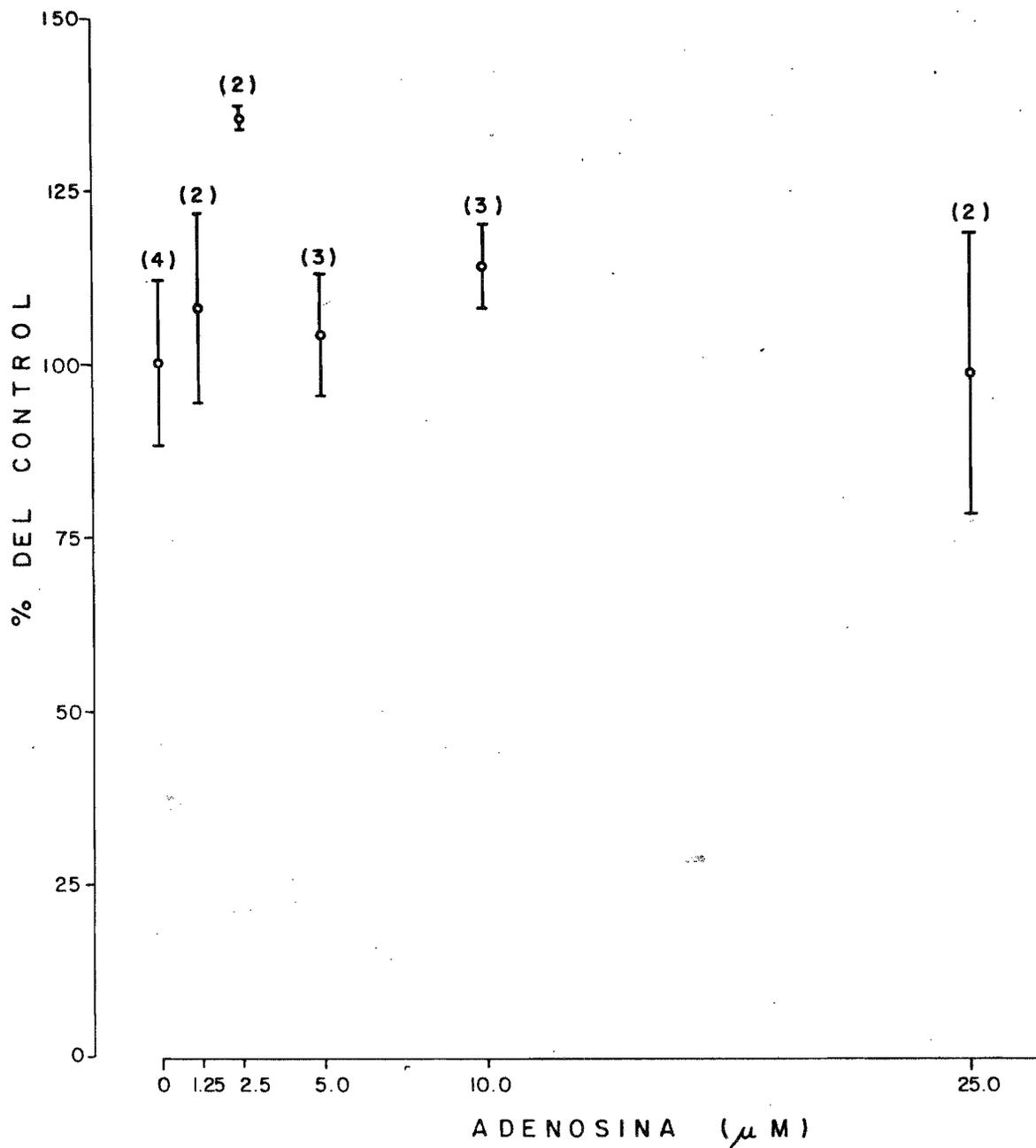


Figura 8 Efecto de varias dosis de Adenosina sobre la incorporación de timidina tritiada en linfocitos de sangre periférica de rata incubados por 2 horas.

(Los porcentajes son promedios de dos a cuatro experimentos, cada uno por triplicado; se muestra el error estándar. El número de experimentos aparece entre paréntesis).

Tabla 3. Efecto de varias dosis de Adenosina sobre la incorporación de timidina tritiada en células de la médula ósea de rata incubadas por 2 horas. (Promedios de un experimento por triplicado; se muestra el error estándar).

Adenosina (μM)	% del control
0.0	100.0 \pm 4.6
2.5	89.5 \pm 2.1
5.0	83.0 \pm 2.0
10.0	101.0 \pm 10.1
25.0	88.5 \pm 6.0
50.0	78.3 \pm 3.4

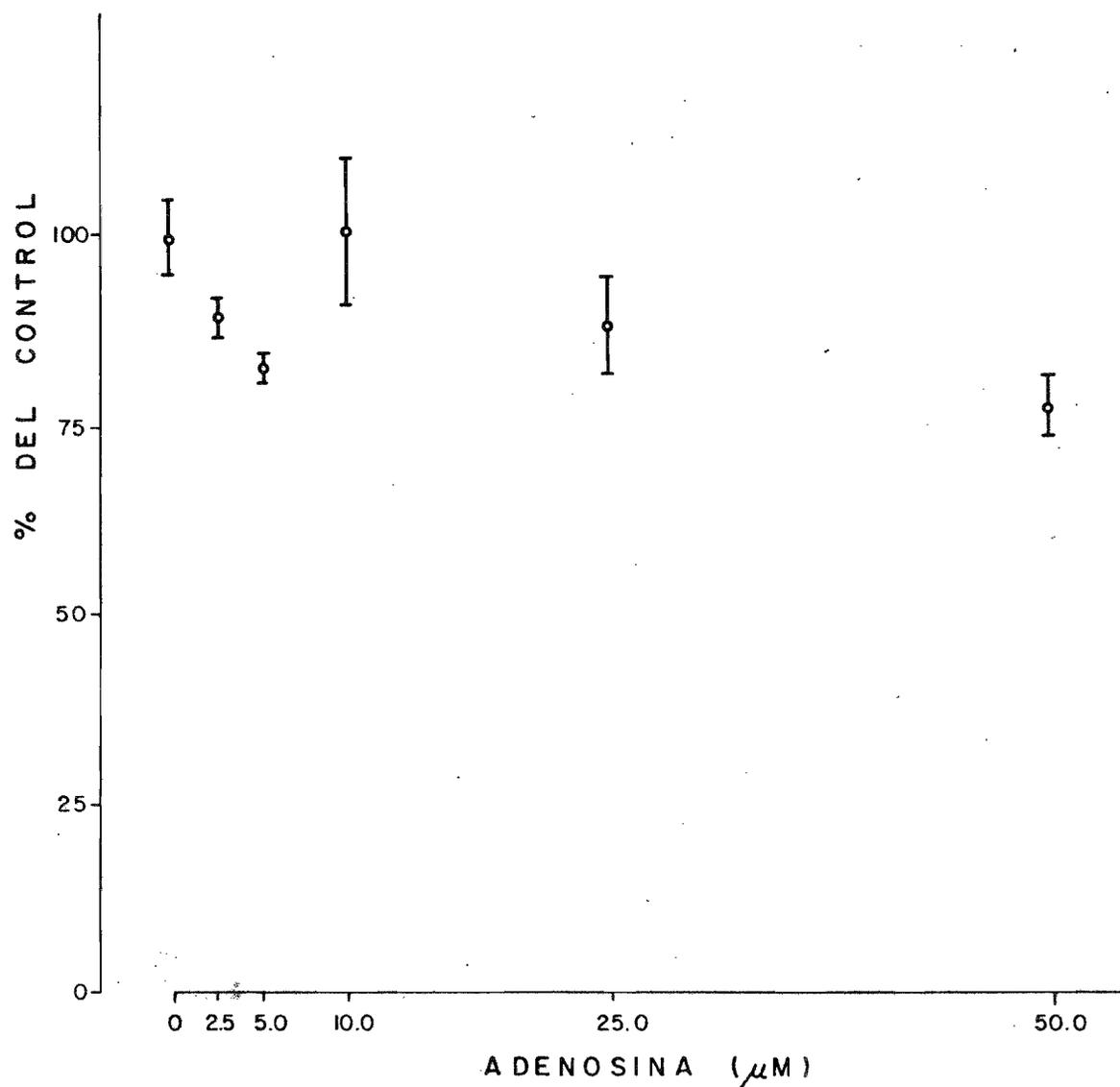


Figura 9 Efecto de varias dosis de Adenosina sobre la incorporación de timidina tritiada en células de la médula ósea de rata incubadas por 2 horas.

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

La tabla 4 muestra el efecto de esta dosis de Ada en la incorporación de timidina tritiada de esplenocitos. Los resultados se muestran como cpm totales y como cpm por célula. La figura 10 presenta solamente las cpm totales. La prueba de "t" no mostró diferencias significativas entre el control y las células tratadas. Sin embargo, existen diferencias significativas ($P > 0.001$) entre las horas de incubación de los controles, por una parte y las de los tratados, por otra parte. Además, se observa como se esperaba, un máximo de incorporación de timidina tritiada a las 2 horas de incubación, la cual disminuye con el transcurso del tiempo.

La tabla 5 y la figura 11 muestran la viabilidad de los esplenocitos a diferentes horas de incubación, en presencia de $5 \mu\text{M}$ de Ada. Se puede observar a las 4 y a las 24 horas de incubación una disminución gradual de las células vivas. Las diferencias no son significativas entre el control y las tratadas, excepto a las 4 horas donde se observa, en las células vivas, una diferencia muy significativa ($P < 0.001$).

La tabla 6 presenta los resultados de la cuantificación de ADN en μs totales y en μs por célula. Únicamente se graficaron los primeros datos de ADN totales en la figura 12. Sólo hay diferencias significativas a las 2 horas de incubación entre el control y el tratado ($P < 0.20$). Así mismo se observa un máximo de ADN en el control a las 2 horas, mientras que en el tratado este pico es a las 0 horas.

La tabla 7 y la figura 13 muestran los resultados de la cuantificación de proteínas en μs totales y en μs por célula. No se observa efecto alguno en los tratados con Ada con respecto al control. En la gráfica que presenta los μs de proteína por célula se observa un máximo a las 4 horas; sin embargo, en la gráfica de μs de proteína totales este máximo no es tan evidente.

Los porcentajes de núcleos con y sin condensación cromosómica se presentan en la tabla 8 y en la figura 14. En relación a los núcleos con condensación cromosómica solamente hay diferencias significativas ($P > 0.02$) a las 0 y a las 2 horas entre los controles y los tratados. En los núcleos que no presentan condensación cromosómica también hay diferencias significativas a las 2, 4 y 24 horas ($P > 0.02$, $P > 0.02$ y $P > 0.01$) entre los controles y los tratados con Ada. Parece ser que hay un ligero aumento en el número de los núcleos sin condensación cromosómica de los tratados con Ada en relación a los controles a partir de las 4 horas de incubación. Al mismo tiempo, el porcentaje de núcleos con condensación cromosómica tiende a disminuir en los 2 grupos.

Tabla 4. Efecto de la Adenosina (5 μ M) sobre la incorporación de timidina tritiada en esplenocitos de rata incubados por diferentes horas. (Promedios de un experimento por triplicado; se muestra el error estándar).

Hrs de incubación	control	tratadas
	C P M	
0	289.9 \pm 54.5	166.6 \pm 22.4
2	2,816.6 \pm 426.7	2,574.4 \pm 117.5
4	1,605.6 \pm 103.9	1,479.1 \pm 123.3
24	34.4 \pm 0.6	31.3 \pm 0.4
	cpm/cel X 10 ⁻⁴	
0	1.16 \pm 0.22	0.72 \pm 0.10
2	12.57 \pm 1.90	11.91 \pm 0.54
4	8.73 \pm 0.56	7.18 \pm 0.60
24	0.20 \pm 0.0	0.17 \pm 0.0

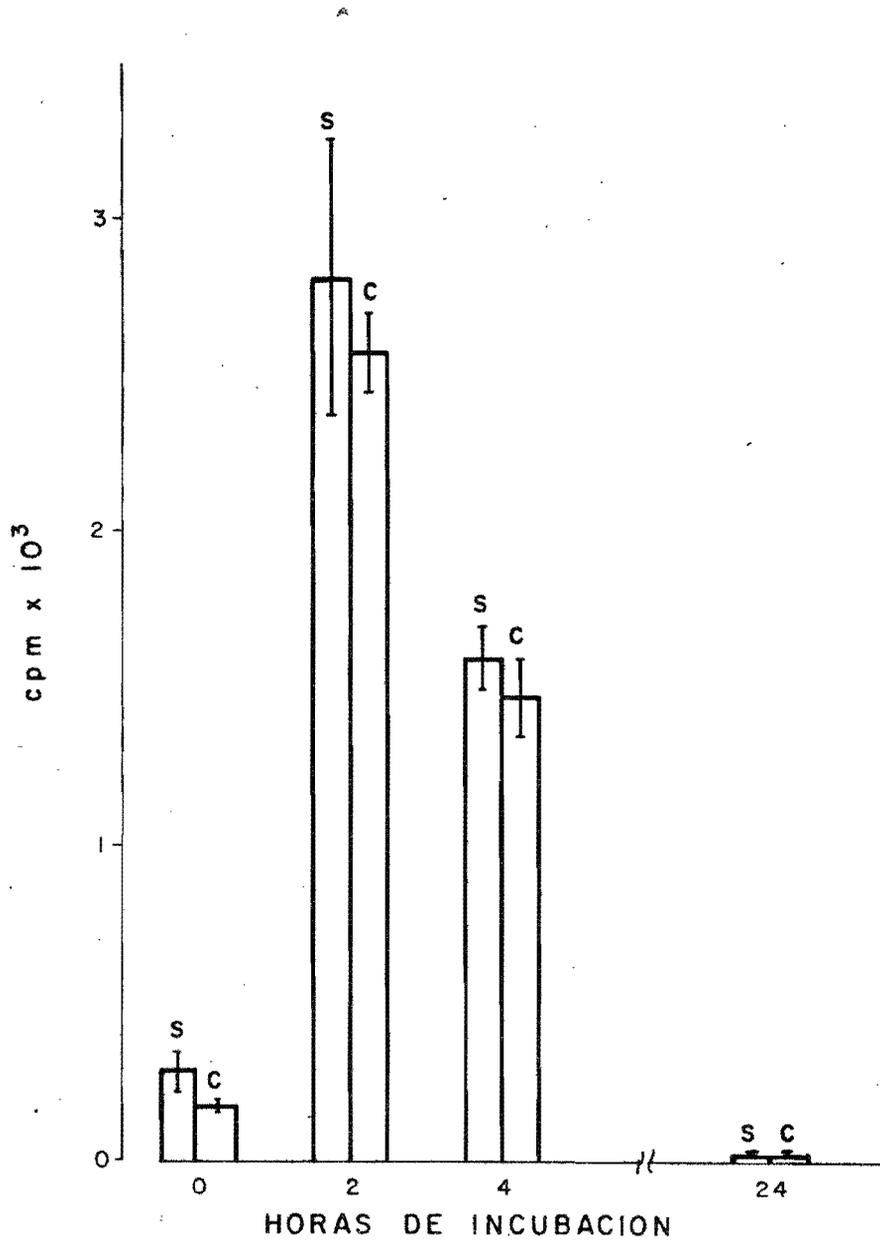


Figura 10 Efecto de la Adenosina ($5\mu\text{M}$) sobre la incorporación de timidina tritiada en esplenocitos de rata incubados por diferentes horas.

S = sin Adenosina C = con Adenosina
 (Promedios de un experimento por triplicado; se muestra el error estándar).

Tabla 5. Efecto de la Adenosina (5 μ M) sobre la viabilidad de esplenocitos de rata incubados por diferentes horas. (Datos de un experimento. El error estándar se obtuvo de la suma de cinco cuadros en un hemocitómetro convencional).

Hrs de incubación	vivas	No. de células X 10 ⁶ muertas	total
c o n t r o l			
0	2.198 \pm 0.116	0.304 \pm 0.019	2.502
2	2.106 \pm 0.108	0.134 \pm 0.025	2.240
4	1.606 \pm 0.043	0.232 \pm 0.010	1.838
24	1.166 \pm 0.053	0.522 \pm 0.044	1.688
t r a t a d o s			
0	2.060 \pm 0.108	0.262 \pm 0.035	2.322
2	2.000 \pm 0.091	0.162 \pm 0.030	2.162
4	1.900 \pm 0.076	0.160 \pm 0.025	2.060
24	1.272 \pm 0.115	0.532 \pm 0.049	1.804

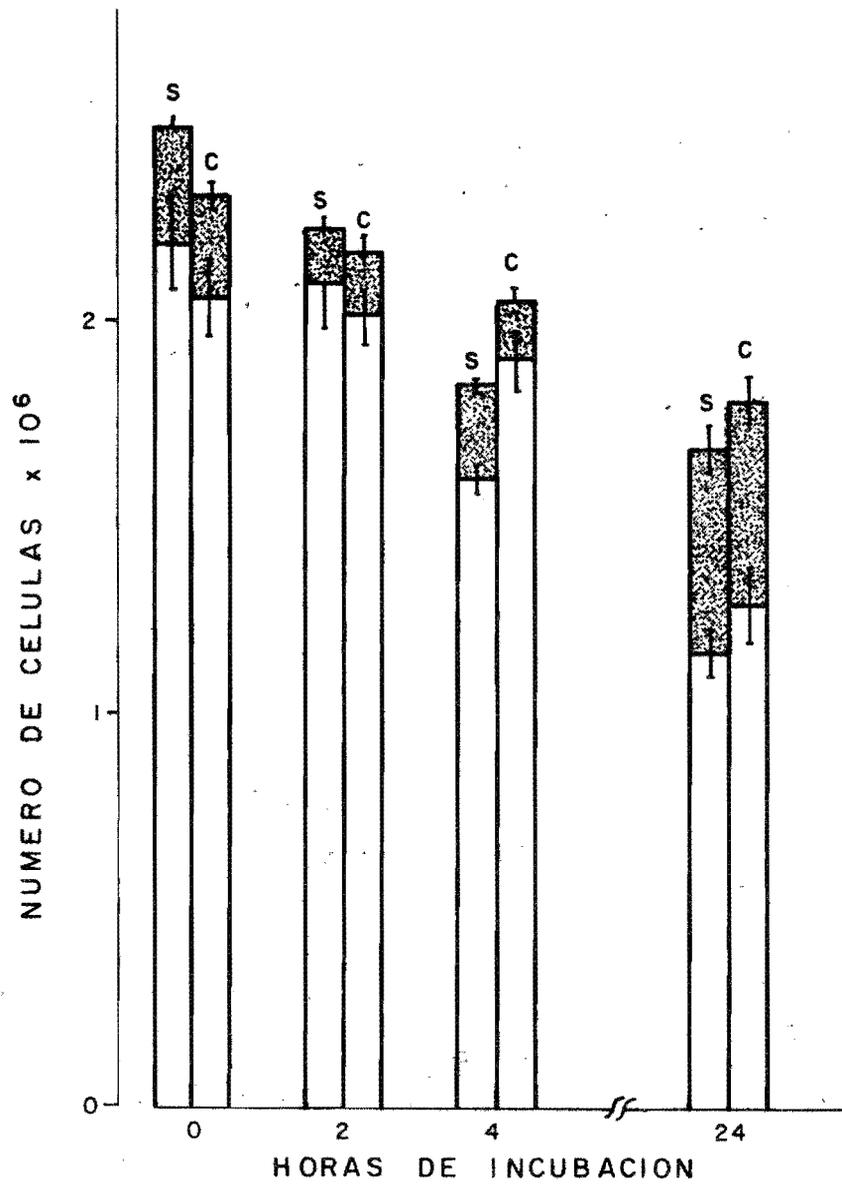


Figura II Efecto de la Adenosina ($5\mu\text{M}$) sobre la viabilidad de esplenocitos de rata incubados por diferentes horas.

S = sin Adenosina , C = con Adenosina
 □ Células vivas , ■ Células muertas

(Se muestra el error estándar de la suma de cinco cuadros en un hemocitómetro convencional).

Tabla 6. Efecto de la Adenosina (5 μ M) en el contenido de ADN en esplenocitos de rata incubados por diferentes hrs. (Promedios de un experimento por triplicado; se muestra el error estándar).

Hrs de incubación	ADN			
	control	μ s tratados	control	ps/cel tratados
0	34.3 \pm 4.4	40.4 \pm 8.6	13.7 \pm 1.8	17.4 \pm 3.7
2	47.8 \pm 9.1	21.1 \pm 3.1	21.3 \pm 4.1	9.7 \pm 1.4
4	32.1 \pm 9.5	21.6 \pm 5.9	17.5 \pm 5.2	10.5 \pm 2.9
24	23.3 \pm 10.7	24.9 \pm 2.8	13.8 \pm 6.3	13.8 \pm 1.5

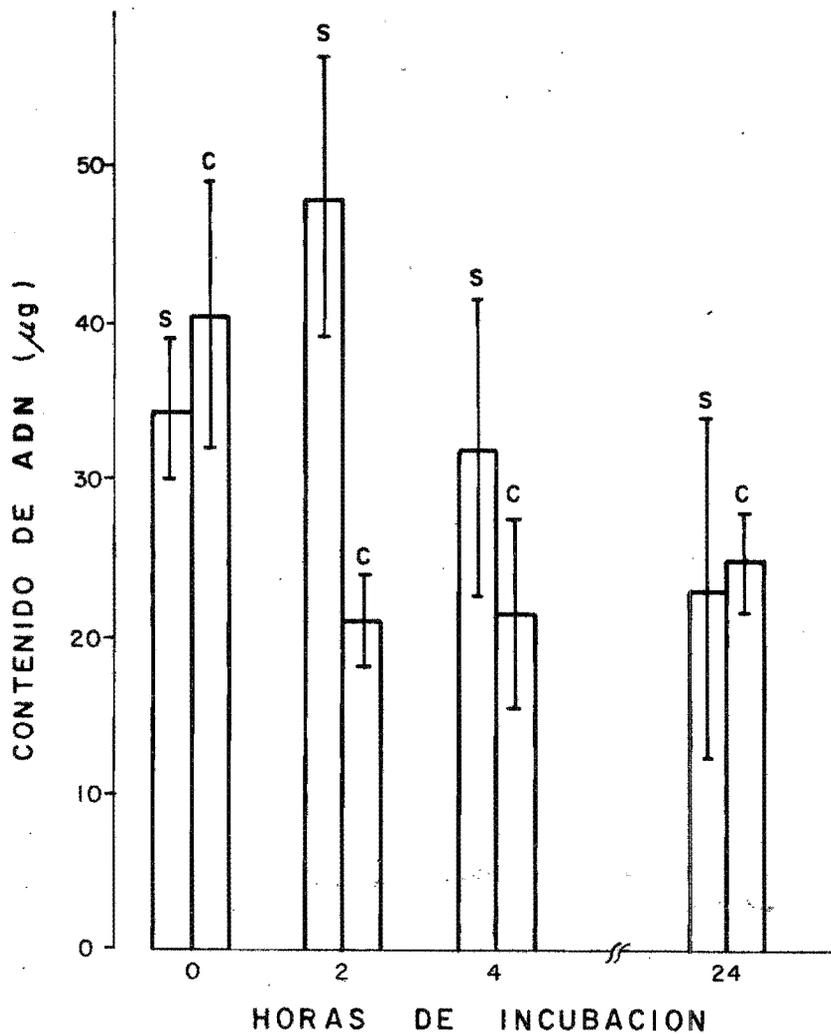


Figura 12 Efecto de la Adenosina ($5\mu\text{M}$) en el contenido de ADN en esplenocitos de rata incubados por diferentes horas.

S = sin Adenosina, C = con Adenosina

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

Tabla 7. Efecto de la Adenosina (5 μ M) en las proteínas de esplenocitos de rata incubados por diferentes horas.

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

Hrs de incubación	Proteínas	
	control	tratados
	μ S	
0	141.9 \pm 11.6	121.7 \pm 14.8
2	107.5 \pm 12.1	119.1 \pm 4.7
4	140.9 \pm 9.5	146.2 \pm 11.5
24	97.1 \pm 4.2	96.7 \pm 11.0
	ps/cel	
0	56.7 \pm 4.6	52.4 \pm 6.4
2	48.0 \pm 5.4	55.1 \pm 2.1
4	76.7 \pm 5.2	71.0 \pm 5.6
24	57.5 \pm 2.5	53.6 \pm 6.1

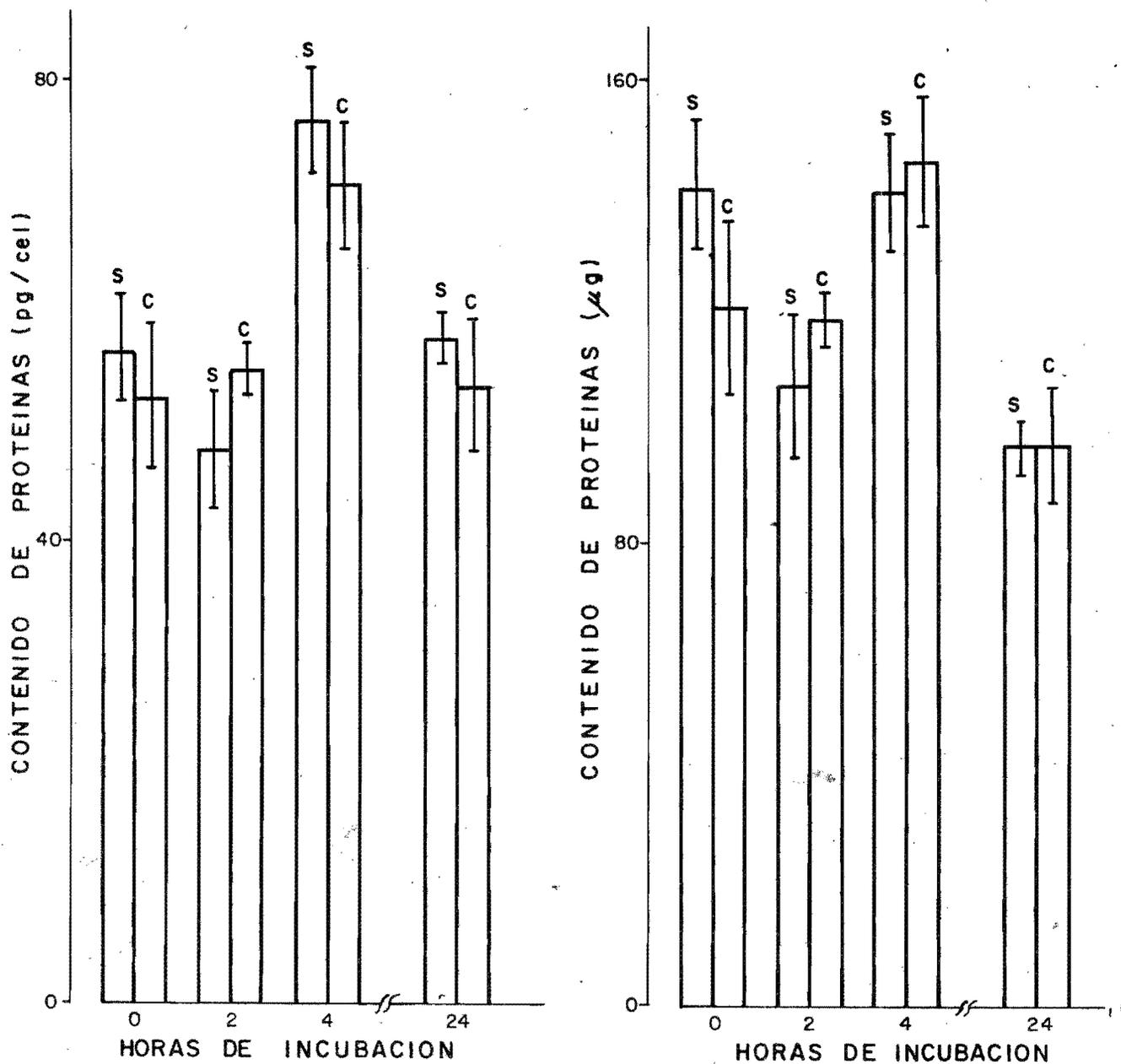


Figura 13 Efecto de la Adenosina ($5\mu\text{M}$) en el contenido de las proteínas en esplenocitos de rata incubados a diferentes horas.

S= sin Adenosina , C= con Adenosina

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

Tabla 8. Efecto de la Adenosina (5 μ M) en la condensación cromosómica en los núcleos de esplenocitos de rata incubados por diferentes horas. (Datos de un experimento por triplicado; se muestra el error estándar).

Hrs de incubación	% de Núcleos		
	con condensación cromosómica	sin condensación cromosómica	dudosos
c o n t r o l			
0	4.1 \pm 3.1	88.0 \pm 5.1	7.9 \pm 4.7
2	8.5 \pm 1.6	70.4 \pm 10.3	21.1 \pm 3.8
4	4.9 \pm 2.0	83.8 \pm 10.2	11.2 \pm 1.9
24	0.5 \pm 0.5	85.2 \pm 14.3	14.3 \pm 3.0
t r a t a d o s			
0	12.2 \pm 7.8	82.8 \pm 14.7	5.0 \pm 2.8
2	2.3 \pm 0.9	81.9 \pm 12.4	15.7 \pm 4.7
4	1.7 \pm 0.9	93.8 \pm 8.7	4.5 \pm 0.6
24	0.4 \pm 0.4	97.0 \pm 5.5	2.6 \pm 1.4

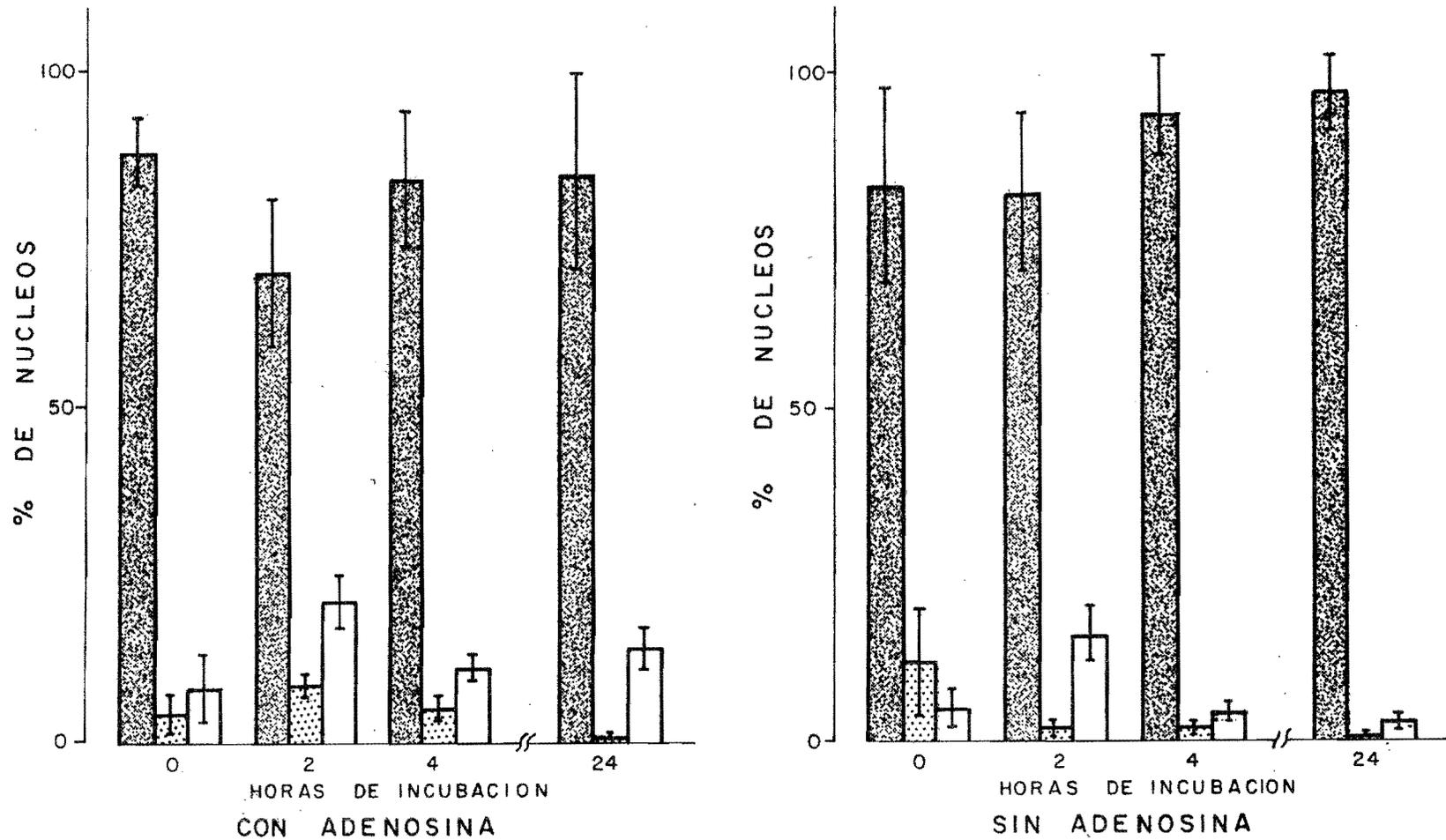


Figura 14 Efecto de la Adenosina ($5\mu\text{M}$) en la condensación cromosómica en los núcleos de esplenocitos de rata incubados por diferentes horas.

no condensados
 condensados
 y dudosos

(Promedio de un experimento por triplicado. Se muestra el error estándar).

La misma dosis de Ada (5 μ M) se aplicó también en timocitos bajo las mismas condiciones. Sin embargo, únicamente se cuantificó la incorporación de timidina tritiada, la viabilidad y el contenido de proteínas.

Los resultados de la incorporación de timidina tritiada se muestran en la tabla 9 como cpm totales y cpm por célula; en la figura 15 solo aparecen las cpm totales pues al graficar cpm por célula se observa el mismo comportamiento.

Sólo hay diferencias significativas para la hora 0 entre el control y el tratado ($P > 0.001$). Por otra parte, se observa el mismo comportamiento que presentaron los esplenocitos con un máximo de incorporación de timidina tritiada a las 2 horas.

La viabilidad de los timocitos expuestos a la Ada se muestra en la tabla 10 y en la figura 16. A las 0 y a las 24 horas hay diferencias significativas en las células vivas, entre el control y el tratado ($P > 0.001$, $P > 0.01$).

Durante las primeras 4 horas de incubación se mantiene la población de timocitos vivos, a las 24 horas disminuye significativamente.

En la tabla 11 se presenta el efecto de la Ada sobre las proteínas de los timocitos. Los datos se expresan en μ g totales y en μ g por célula y en la figura 17 como μ g totales. A las 0 horas hay diferencias significativas entre el control y el tratado ($P > 0.001$); en las demás horas no se observa ningún efecto.

Se observa, por otra parte, una tendencia a mantener la misma cantidad de proteínas durante las primeras 4 horas de incubación, como en el caso de los esplenocitos, después esta cantidad disminuye. El contenido de proteínas en μ g por célula en los timocitos es mucho menor que en los esplenocitos (Fig. 13), en algunos casos más del 50%.

C) DOSIS RESPUESTA A LA ADENOSINA EN TIMOCITOS DE CONEJO

Debido a que los resultados obtenidos con las células linfoides de rata eran prácticamente negativos, se decidió utilizar timocitos de conejo para saber si las condiciones del medio de cultivo eran las adecuadas para que el nucleósido modificara la proliferación celular. Puesto que éste era el primer experimento con células linfoides de conejo en el laboratorio, se agregó PHA al medio de cultivo para saber si en este sistema el mitógeno estimulaba la proliferación celular. Las células se incubaron por 2, 24 y 72 horas y las concentraciones de Ada fueron las mismas que se utilizaron con las células linfoides de rata.

Tabla 9. Efecto de la Adenosina (5 μ M) sobre la incorporación de timidina tritiada en timocitos de rata incubados por diferentes horas. (Promedios de un experimento por triplicado; se muestra el error estándar).

Hrs de incubación	control		tratados	
	C P M			
0	262.1 \pm 8.3		148.2 \pm 29.5	
2	4,178.3 \pm 213.3		4,968.0 \pm 804.8	
4	2,139.6 \pm 475.3		1,575.7 \pm 489.4	
24	36.3 \pm 2.9		38.0 \pm 1.5	
	cpm/cel X 10 ⁻⁴			
0	1.49 \pm 0.05		0.88 \pm 0.17	
2	24.18 \pm 1.23		27.39 \pm 4.44	
4	11.17 \pm 2.48		8.73 \pm 2.71	
24	0.46 \pm 0.04		0.39 \pm 0.01	

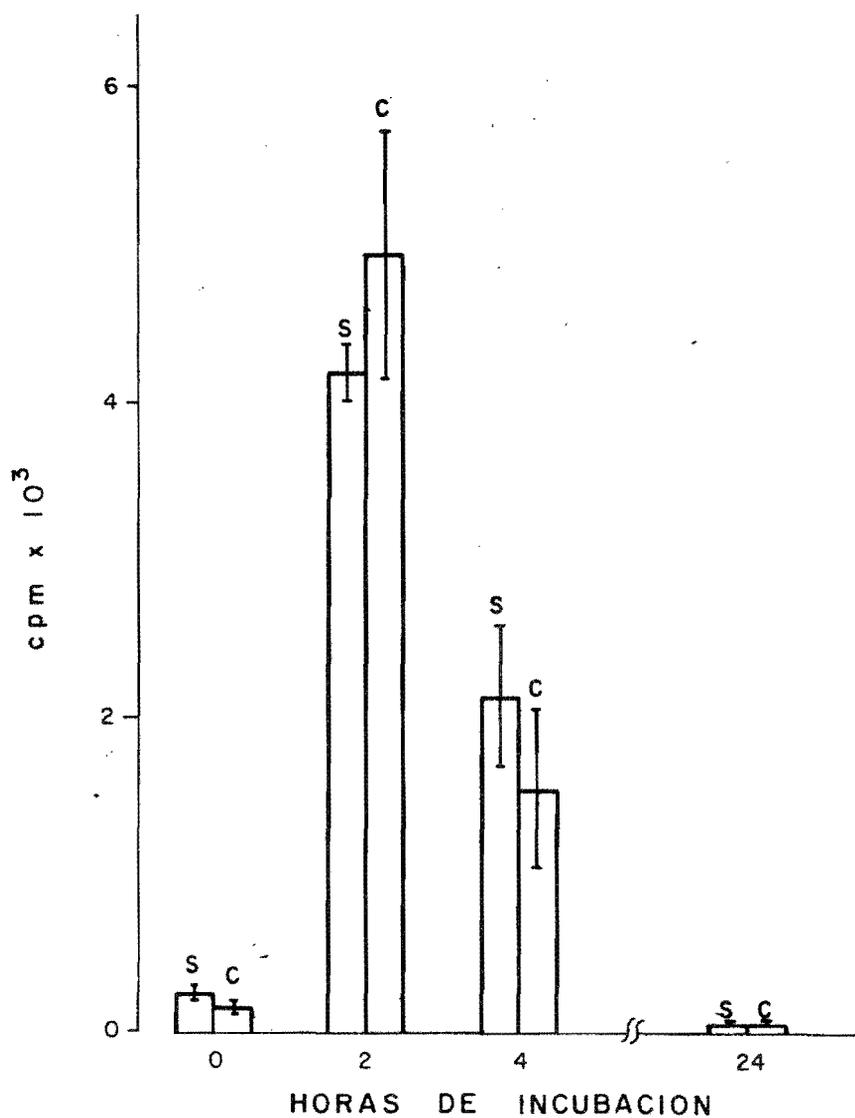


Figura 15 Efecto de la Adenosina ($5\mu\text{M}$) sobre la incorporación de timidina tritiada en timocitos de rata incubados a diferentes horas.

S = sin Adenosina , C = con Adenosina

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

Tabla 10. Efecto de la Adenosina (5 μ M) en la viabilidad de timocitos de rats incubados por diferentes horas.

(Datos de un experimento. El error estándar se obtuvo de la suma de cinco cuadros en un hemocitómetro convencional).

Hrs de incubación	No. de células X 10 ⁶		total
	vivas	muertas	
	c o n t r o l		
0	1.694 \pm 0.044	0.060 \pm 0.007	1.754
2	1.666 \pm 0.045	0.062 \pm 0.014	1.728
4	1.824 \pm 0.062	0.092 \pm 0.020	1.916
24	0.508 \pm 0.044	0.276 \pm 0.014	0.784
	t r a t a d o s		
0	1.518 \pm 0.034	0.174 \pm 0.030	1.692
2	1.718 \pm 0.089	0.096 \pm 0.014	1.814
4	1.664 \pm 0.133	0.140 \pm 0.014	1.804
24	0.692 \pm 0.044	0.270 \pm 0.033	0.962

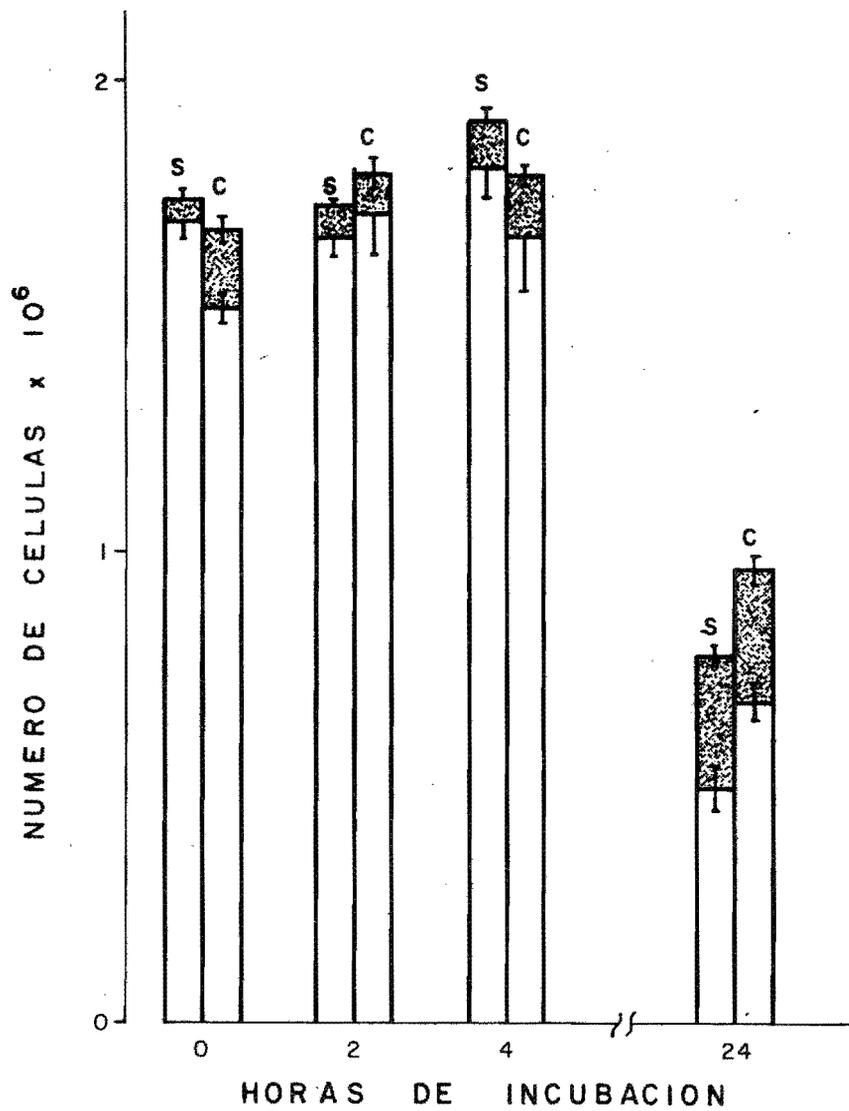


Figura 16 Efecto de la adenosina ($5 \mu M$) en la viabilidad de timocitos de rata incubados por diferentes horas.

S = sin Adenosina , C = con Adenosina

□ Células vivas , ■ Células muertas

(Se muestra el error estándar de la suma de cinco cuadros en un hemocitómetro convencional)

Tabla 11. Efecto de la Adenosina (5 μ M) en el contenido de las proteínas de timocitos de rata incubados por diferentes horas. (Promedios de un experimento por triplicado, se muestra el error estándar).

Hrs de incubación	Proteínas			
	control	μ s tratados	control	ps/cel tratados
0	65.7 \pm 5.7	33.4 \pm 3.8	37.5 \pm 3.3	19.7 \pm 2.2
2	41.4 \pm 3.3	45.7 \pm 5.5	23.9 \pm 1.9	25.2 \pm 3.0
4	52.7 \pm 10.2	58.7 \pm 4.9	27.5 \pm 5.3	32.5 \pm 2.7
24	7.7 \pm 2.7	12.4 \pm 2.9	9.8 \pm 3.4	12.8 \pm 3.0

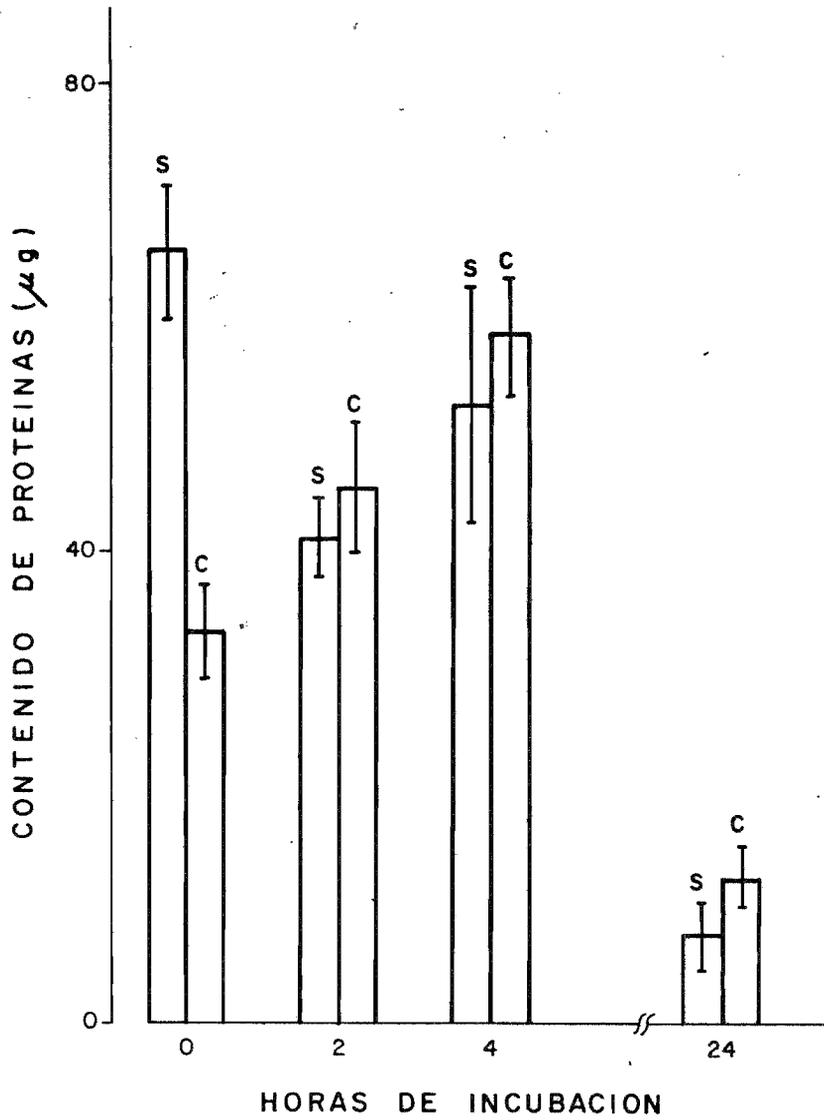


Figura 17 Efecto de la Adenosina ($5 \mu M$) en el contenido de las proteínas en timocitos de rata incubados a diferentes horas.

S= sin Adenosina, C= con Adenosina

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

Se observa en la tabla 12 y en la figura 18 a las 2 horas de incubación, que en la dosis de 2.5 μ M de Ada, las diferencias son significativas con respecto al control ($P < 0.05$) y lo son aún más en las demás dosis ($P < 0.001$). A las 24 horas de incubación, también se encontraron diferencias significativas en todas las dosis utilizadas ($P > 0.001$); aunque en la tabla 12 se observa que los promedios de las cpm son demasiado bajos, casi se puede asegurar que es la radioactividad de fondo. Por otra parte, a las 72 horas de incubación no se observaron diferencias significativas con respecto al control, salvo en la dosis de 50 μ M ($P < 0.05$). Sin embargo, también en este caso es la radioactividad de fondo.

La inhibición en la incorporación del radioisótopo a las 2 horas es típica de una dosis respuesta de relación directamente proporcional, es decir al aumentar la dosis de Ada, mayor es el efecto inhibitorio. A las 24 horas por otra parte, todas las dosis utilizadas del nucleósido inhiben con la misma intensidad.

Con el objeto de comparar más fácilmente los resultados, se hizo una gráfica que resume los datos obtenidos en todos los experimentos de dosis respuesta. En la figura 19 se muestra el efecto de las diversas dosis de Ada sobre la incorporación de timidina tritiada en esplenocitos, timocitos, linfocitos de sangre periférica, células de la médula ósea de rata y timocitos de conejo incubados por 2 horas. Los valores de las células linfoides de rata se encuentran alrededor del 100%, mientras que, los datos de los timocitos de conejo muestran una clara inhibición sobre la incorporación de timidina tritiada.

Tabla 12. Efecto de varias dosis de Adenosina sobre la incorporación de timidina tritiada en timocitos de conejo estimulados con PHA incubados a diferentes tiempos.

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

Adenosina (μ M)	CPM hrs de incubación		
	2	24	72
0.0	2,093.8 \pm 503.3	361.9 \pm 39.6	91.8 \pm 8.8
2.5	626.0 \pm 72.7	--	78.8 \pm 16.1
5.0	289.0 \pm 10.9	80.8 \pm 15.0	66.2 \pm 4.8
10.0	356.8 \pm 38.6	78.9 \pm 15.5	66.4 \pm 6.5
25.0	163.6 \pm 12.0	69.7 \pm 1.8	78.7 \pm 8.4
50.0	79.1 \pm 12.3	83.9 \pm 8.4	66.0 \pm 2.8

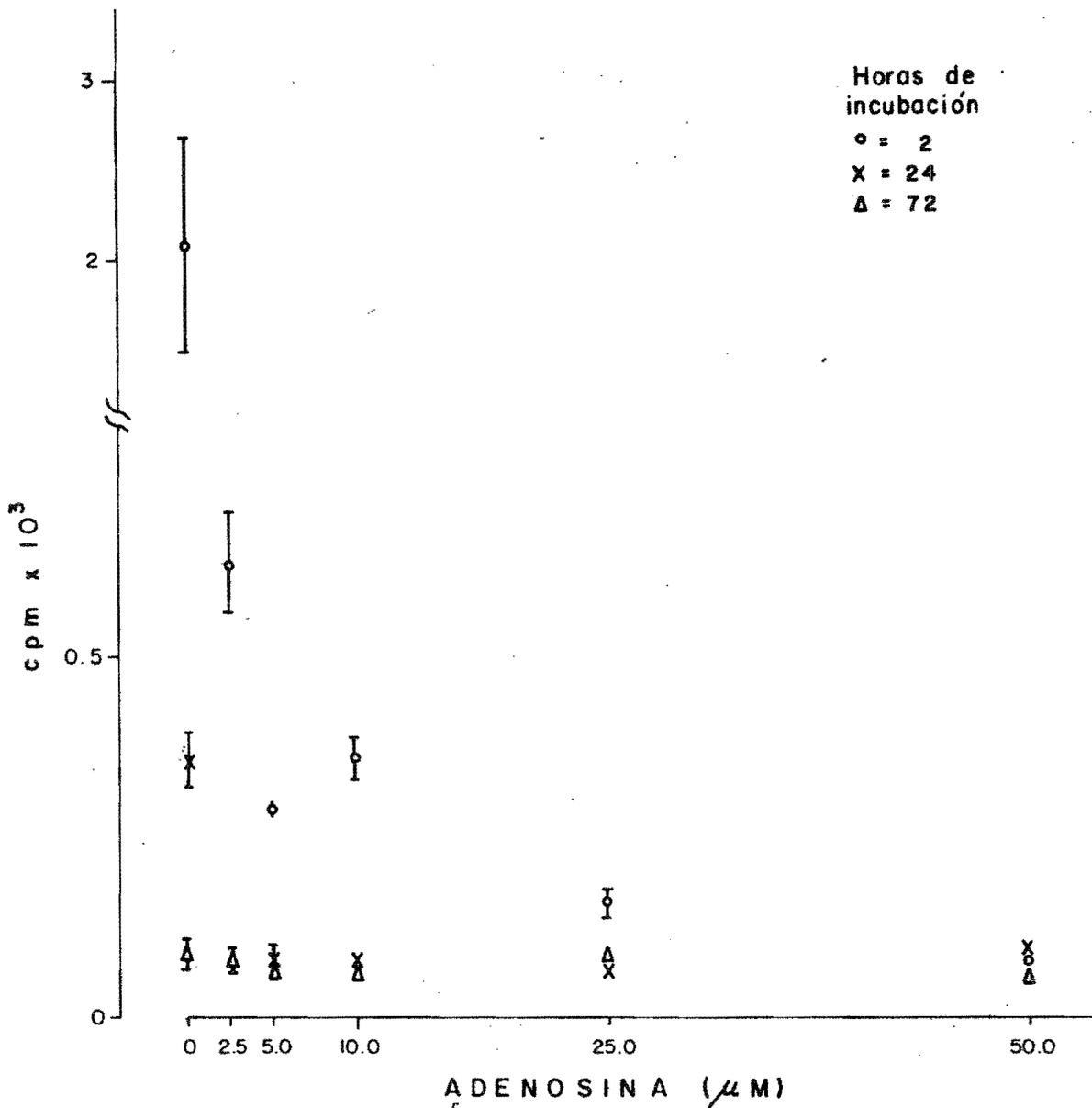


Figura 18 Efecto de varias dosis de Adenosina sobre la incorporación de timidina tritiada en timocitos de conejo estimulados con PHA e incubados a diferentes tiempos.

(Promedios de un experimento por triplicado; se muestra el error estándar. En los puntos donde no se muestra el error es que éste es despreciable).

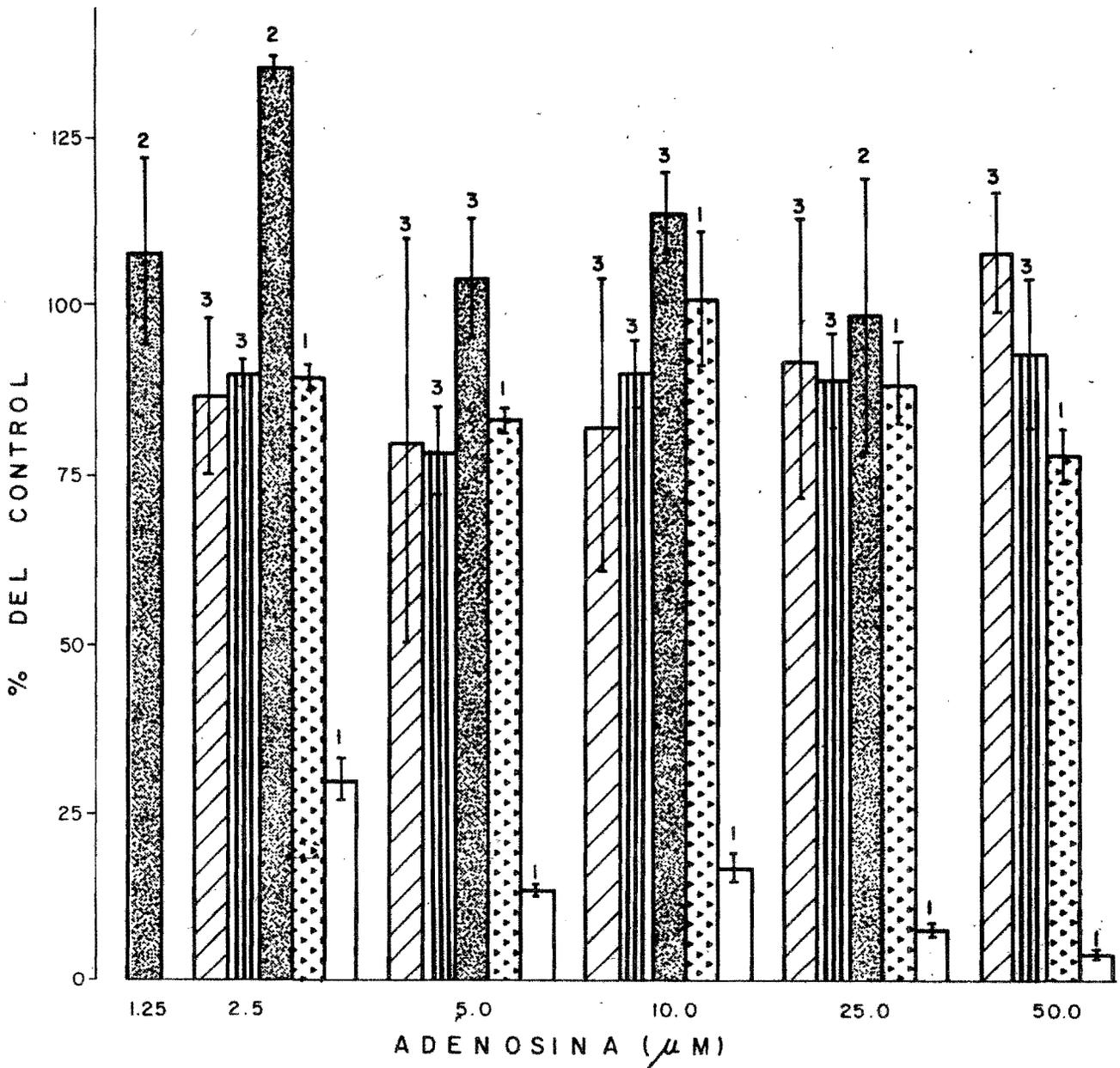


Figura 19 Efecto de varias dosis de Adenosina sobre la incorporación de timidina tritiada en:

- ▨ esplenocitos, ▤ timocitos,
- ▩ linfocitos de sangre periférica,
- ▤ células de la médula ósea de rata
- y timocitos de conejo incubados por 2 horas.

(El número de experimentos aparece arriba de las barras. Cada experimento se hizo por triplicado y los errores estándar de los controles fueron de 4.6% en el menor y de 24.1% en el mayor).

V) DISCUSION Y CONCLUSIONES

Es necesario hacer notar que las poblaciones celulares estudiadas a través del criterio de incorporación de timidina tritiada corresponden a aquellas células que están en la fase S del ciclo celular (Fig. 3). Es decir, con este parámetro no se puede observar el efecto del nucleósido sobre las células que estén en las fases G₁, G₂ o M, sobre todo cuando se trabaja a tiempos cortos de incubación.

Además, es muy probable que estas células en fase S ya estaban sintetizando ADN in vivo, pues como se recordará esta fase dura de 6 a 8 horas (Mitchison, 1971) y el efecto del nucleósido se midió a las 2 horas de incubación. Lo anterior puede ser posible puesto que algunos autores han demostrado que al final de la fase G₁ existe el llamado punto de restricción, después del cual la célula entra a la fase S y continúa la división celular sin importar las condiciones externas (Pardee y col., 1978; Alberts y col., 1983).

Es interesante observar que las dosis de Ada utilizadas no tienen ningún efecto sobre la incorporación de timidina tritiada en esplenocitos, timocitos y linfocitos de sangre periférica de rata (Tabla 2, Figs. 6, 7 y 8). De hecho se esperarían obtener resultados diferentes puesto que si tomamos en cuenta las actividades de las enzimas directamente relacionadas con la degradación del nucleósido, según Peters y colaboradores (1982a), encontramos en timocitos una actividad menor de la AC y una actividad mayor de la ADA en relación a las actividades en linfocitos de sangre periférica y en esplenocitos de rata (Tabla 1 y Fig. 5). Por lo tanto la proporción ADA/AC es mucho mayor en los timocitos que en las otras células.

Por otra parte, se descarta la posibilidad de que la Ada hubiese sido degradada por las enzimas que se encuentran en el medio de cultivo, provenientes del suero fetal de ternera. Pues, además de que el suero se inactiva previamente, en otros experimentos que se realizaron con células de la médula ósea de rata (Tabla 3, Fig. 9) y con timocitos de conejo (Tabla 12, Fig. 18) bajo las mismas condiciones, se obtiene un efecto inhibitor del nucleósido sobre la incorporación de timidina tritiada.

Se sabe que la Ada puede influir en la actividad de la adenilato ciclasa al causar un efecto inhibitor o estimulador a través de receptores específicos en la membrana celular (Fig. 5). En concentraciones micromolares se ha visto que el nucleósido produce un efecto inhibitor sobre la citotoxicidad mediada por los linfocitos, al aumentar los niveles de AMPc (Wolbers y col., 1975).

Como no se midieron los niveles de AMPc en estas células, no se puede saber si la Ada tiene alguna influencia sobre la adenilato ciclasa. Si de alguna manera el nucleósido modifica los niveles de AMPc, éstos no son suficientes para inhibir o estimular la incorporación de timidina tritiada en estas células.

Al no observar ningún efecto en estas células linfoides, se decidió probar las mismas dosis de Ada en células de la médula ósea de rata. En este caso si hay un efecto inhibitorio en la incorporación del radioisótopo con 5 y 50 μ M del nucleósido (Tabla 3, Fig. 9). Este efecto no se observa en las dosis 2.5, 10 y 25 μ M. Sin embargo, las células que presentan tal efecto se encuentran en una población muy heterogénea, puesto que esta compuesta por eritrocitos y leucocitos en diferentes etapas de maduración (Fig. 1). Por esta razón es más probable que el efecto de inhibición sea sobre diferentes tipos celulares. A pesar de esto, es interesante suponer que el efecto de la Ada sea probablemente sobre las células blasto que están en la fase S del ciclo celular. Este es un dato interesante pues son las únicas células linfoides de esta especie en donde hay un efecto; sin embargo, sería necesario hacer más repeticiones para obtener más datos que permitan confirmar el efecto.

Resulta también interesante que las dosis 10 y 25 μ M no presentan ningún efecto significativo, mientras que una dosis más pequeña (5 μ M) sí lo presenta. Se podría suponer que esta dosis sea la más adecuada para que la Ada ejerza su influencia sobre los receptores de la membrana en estas células. Por el contrario, las dosis 10 y 25 μ M podrían saturar a los receptores e impedir cualquier efecto posible. El efecto de la dosis 50 μ M es más fácil de entender, pues si observamos en la figura 9 los promedios de las dos dosis que la preceden (10 y 25 μ M), encontramos una disminución gradual de la incorporación del radioisótopo; a pesar de que estas dosis no presentan diferencias significativas con respecto al control.

El nucleósido no tiene efecto sobre la viabilidad de los esplenocitos a diferentes tiempos (Tabla 5, Fig. 11). A las 4 horas de incubación se observa un aumento en los esplenocitos vivos tratados con Ada en relación al control. También se observa en estos últimos un número mayor de esplenocitos muertos que en los tratados. Sin embargo, como son sólo resultados de un experimento y únicamente representan un aumento en las células de un 18%, sería necesario repetir el experimento con el objeto de tener más elementos de juicio. También, se puede observar una disminución de las células tratadas y no a través del tiempo que concuerda con la disminución de la incorporación de timidina tritiada (Tabla 4, Fig. 10).

Las diferencias obtenidas en la cuantificación de ADN entre el control y los tratados en los esplenocitos no son significativas, salvo a las 2 horas de incubación (Tabla 6, Fig. 12); la inhibición es muy significativa pues representa un 56% respecto al control. Sin embargo; sería conveniente repetir la cuantificación de ADN por lo menos dos veces para tener la seguridad de que realmente se trata de un efecto de inhibición.

Mientras que el contenido de las proteínas en ps por célula de los esplenocitos aumenta a las 4 horas de incubación (Tabla 7, Fig. 13), hay una disminución en la incorporación de timidina tritiada (Fig. 10). Parece ser que por alguna razón, tal vez por las nuevas condiciones del medio, el contenido de proteínas aumenta, al menos en los tiempos en que se cuantificó, a las 4 horas de cultivo. Pero, para poder estar seguros de este aumento, de nuevo se tendrían que hacer más repeticiones del experimento.

En la tabla 8 y en la figura 14 se observa; por una parte, un ligero aumento en los núcleos sin condensación cromosómica de los esplenocitos tratados con Ada en relación a los controles a partir de las 4 horas de incubación; y por otra, una disminución en el porcentaje de núcleos condensados a través del tiempo. Sin embargo, sería arriesgado suponer que la Ada modifica la mitosis en las células que comienzan esta fase, a pesar de que estadísticamente existan diferencias significativas; además de que el porcentaje de núcleos dudosos excede en muchos casos al de los núcleos con condensación cromosómica.

Como la Ada en concentración $5\mu\text{M}$ no provocó ningún efecto a tiempos cortos de incubación en esplenocitos de rata, salvo el efecto de inhibición en la concentración de ADN a las 2 horas de incubación, se decidió que no era necesario hacer más repeticiones de los parámetros aplicados en estas células.

El siguiente paso consistió en utilizar las mismas condiciones pero con timocitos de rata. Solamente se estudió el comportamiento de estas células a través de la incorporación de timidina tritiada, la viabilidad y la cuantificación de proteínas.

Los resultados de la incorporación de timidina tritiada (Tabla 9, Fig. 15) en el comportamiento de los timocitos en fase S mediante la incorporación del radioisótopo a diferentes horas de incubación, nos recuerda exactamente lo ocurrido con los esplenocitos (Fig. 10). En los timocitos la incorporación es mayor que en los esplenocitos pues, como se recordará, en la corteza del timo existe una gran proliferación. A pesar de que estadísticamente existe una diferencia significativa a las 0 horas, si se observa la

figura 15, la incorporación es muy baja como para tomar en cuenta esta diferencia. Una vez más se reafirma lo encontrado en los experimentos de dosis respuesta (Fig. 7) con $5\mu\text{M}$ del nucleósido a las 2 horas de incubación, en el sentido de que la Ada no modifica el comportamiento de los timocitos en la fase S.

En cuanto a la viabilidad (Tabla 10, Fig. 16), las diferencias encontradas en los timocitos no representan un porcentaje considerable, al igual que en el caso de los esplenocitos. Además, al tomar en cuenta que se trata de un solo experimento sería necesario hacer más repeticiones para obtener datos concluyentes.

Contrario a lo sucedido en los esplenocitos, el contenido de las proteínas en los timocitos (Tabla 11, Fig. 17) presenta diferencias significativas a las 0 horas de incubación. La Ada al parecer afecta el contenido de las proteínas en un 51% con respecto al control. Sin embargo, desde las 2 horas hay una recuperación de los timocitos tratados con el nucleósido. En realidad 0 horas representa aproximadamente 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, desde el momento en que se siembran y hasta que se cosechan. La razón estriba en que en el mismo cultivo, a algunos frascos se les agrega la timidina tritiada y después se procede a realizar la cosecha. Se ignora la manera en la cual la Ada causa esta inhibición, si realmente lo es, pues son datos de un solo experimento. Sin embargo, como fue el único efecto observado con los 3 parámetros utilizados en esta células, se decidió no repetir más experimentos.

En el caso de los timocitos de conejo (Tabla 12, Fig. 18), el efecto provocado por la Ada asegura que las condiciones utilizadas en el cultivo de las células linfoides de rata son las adecuadas, pues se observa claramente una inhibición en la proliferación celular. Sin embargo, no se descarta la idea de que probablemente la PHA haya influido sobre estos resultados, pues aunque el mitógeno no haya modificado la proliferación celular no significa que no haya provocado otros cambios en los timocitos.

Probablemente el efecto de la Ada sobre los timocitos del conejo se debe a una disminución en la formación de fosforribosil pirofosfato, con lo cual se inhibe la síntesis de novo de pirimidinas. Lo anterior se apoya con lo reportado por Peters y col. (1982b) en linfocitos estimulados de humano y de caballo. Estos autores encuentran que el efecto inhibitor del nucleósido, sobre la concentración relativa de fosforribosil pirofosfato, es muy marcado a tiempos cortos de cultivo. Sería muy interesante proseguir con los experimentos de Ada en linfocitos de conejo para tratar de determinar el mecanismo de esta

inhibición.

Es interesante también el hecho de que la PHA no estimule la proliferación de las células linfoides de rata y de ratón in vitro, puesto que se trata de un potente mitógeno inespecífico. En otros experimentos llevados a cabo en el laboratorio con timocitos de conejo estimulados con PHA (datos no mostrados), se encuentra que sí hay una estimulación en la proliferación celular a las 24 y a las 48 horas de cultivo.

Cabría suponer que la proximidad filogenética de las células linfoides entre la rata y el ratón dé como resultado un comportamiento similar bajo las mismas condiciones del cultivo. Por el contrario, en especies más alejadas filosenéticamente que el ratón y la rata, por ejemplo el caballo y el cerdo, el comportamiento de las células linfoides in vitro puede ser muy diferente bajo las mismas condiciones. Aunque los linfocitos de estas especies presentan una actividad muy baja de la ADA, incluso comparable a la que presentan pacientes con deficiencias en esta enzima, al cultivar linfocitos de sangre periférica de estos animales con concentraciones micromolares de ADA, Peters y col. (1983) encuentran una marcada inhibición en la incorporación de timidina tritiada en el caso de los linfocitos de caballo; mientras que, en los linfocitos del cerdo hay una marcada estimulación. De hecho, si nos basamos en el diagrama de la evolución en los mamíferos propuesto por Valentine (1978), probablemente el cerdo y el caballo tienen tanta proximidad filosenética como la rata y el conejo.

Resulta pues evidente que la ADA en concentraciones que van de 2.5 a 50 μ M no presenta ningún efecto sobre los esplenocitos, los timocitos y los linfocitos de sangre periférica de rata en fase S a las 2 horas de incubación (Fig. 19), como tampoco, 5 μ M de ADA no modifica el comportamiento de los esplenocitos y de los timocitos de esta especie a diferentes horas de incubación, con la excepción del contenido de ADN en los esplenocitos a las 2 horas de incubación y el contenido de proteínas en timocitos a las 0 horas. Con la salvedad de que estos datos provienen de un solo experimento.

A pesar de que probablemente las células linfoides se forman a partir de una misma célula original (Fig. 1), las características que presentan son muy diferentes. Sin embargo, al menos en este trabajo queda claro que el comportamiento de estas células, a través de los parámetros utilizados, frente a la ADA es el mismo.

Los datos obtenidos permiten reflexionar acerca de los mecanismos involucrados en el destino de la ADA, así como de

las características de la membrana celular en las células linfoides de rata que puedan condicionar estos efectos.

Se tratará de analizar lo que probablemente le habría sucedido al nucleósido de haber entrado al interior celular mediante algún mecanismo de difusión facilitada. Si se observa la figura 5, el metabolismo de la Ada puede seguir 4 vías. Puede ser degradada a adenina por la adenosina fosforilasa (Reacción 7); sin embargo, no se cuenta con datos de la literatura que apoyen dicha vía, además de que esta enzima no ha sido establecida (Fox y Kellew, 1978). El nucleósido pudo ser degradado a inosina por la ADA (Reacción 3) o fosforilado a AMP por la AC (Reacción 8), pero se supone, de acuerdo a lo reportado en la literatura (Peters y col., 1982a), que las actividades de estas enzimas en las diversas células linfoides de rata son muy diferentes, con lo cual probablemente se habría producido un efecto distinto reflejado en los diversos parámetros utilizados. Finalmente no se sabe si la Ada fue transformada a S-adenosilhomocisteína con la S-adenosilhomocisteína hidrolasa (Reacción 2) por la vía de síntesis, de ser esto cierto se hubiese acumulado la S-adenosilhomocisteína, la cual es un potente inhibidor de las reacciones de la metiltransferasa (Fox y Kellew, 1978). Se excluye la posibilidad de que la S-adenosilhomocisteína hidrolasa haya atrapado a la Ada, pues se sabe que el bazo presenta una cantidad mínima de la enzima, comparada con los altos niveles encontrados en otros tejidos; por ejemplo, en el hígado de ratón se calcula que es de $10\mu\text{M}$. De hecho la habilidad que presentan los tejidos para atrapar a la Ada coincide con los niveles de la S-adenosilhomocisteína hidrolasa (Ueland, 1983).

Con los parámetros estudiados resulta muy probable que no hubo una inhibición en la biosíntesis de pirimidinas ni una disminución en los niveles de fosforribosil pirofosfato, pues la síntesis de ADN y el contenido del mismo no se vió afectado.

Otro mecanismo de acción del nucleósido que se presenta a discusión es su influencia a través de receptores en la membrana celular sobre los niveles de AMPc. Con los datos obtenidos no se sabe si la Ada modificó los niveles de AMPc; sin embargo, nos inclinamos a suponer que probablemente no hay una población de receptores suficientemente adecuada para que, con esas concentraciones de Ada, se produzca algún efecto.

De ninguna manera se puede decir que este trabajo se ha concluido. Falta aún por demostrar los mecanismos que intervienen en la falta de efecto por parte de la Ada sobre las células linfoides de rata. Para lo cual, sería de gran utilidad saber que efecto ejerce la Ada en los niveles de

AMPC en estas células. Medir la actividad de las enzimas directamente relacionadas con la degradación del nucleósido. Utilizar inhibidores de la ADA in vitro y comparar estos resultados entre los diferentes tipos de células linfoides. Separar los linfocitos de las demás células de la médula ósea de rata y repetir el experimento de dosis respuesta. Medir los niveles de fosforribosil pirofosfato con diferentes concentraciones de Ada en cultivos in vitro. Hacer experimentos in vivo inyectando a las ratas el nucleósido y medir los parámetros utilizados en este trabajo. Añadir Ada marcada al medio de cultivo, con lo cual se trataría de comprobar si el nucleósido entra al interior celular.

El estudio de las células linfoides de rata in vitro bajo el efecto de la Ada resulta ser un modelo de gran utilidad pues permite, por ejemplo hacer comparaciones con otros modelos de células linfoides de otras especies para tratar de establecer los mecanismos de acción de este nucleósido así como conocer más sobre el sistema inmune.

También este modelo puede ser de gran interés para tratar de comprender el posible papel de la Ada como regulador asociado con las inmunodeficiencias que presentan los pacientes debidas a la ausencia de ADA. Además de que se encuentra que los linfocitos de estos pacientes responden pobremente a la adición de mitógenos (Zimmerman y col., 1983) y en este trabajo se observa que las células linfoides de rata in vitro no responden a la PHA.

VI) BIBLIOGRAFIA

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D. (1983). Molecular Biology of the Cell. Garland Publishing, Inc. New York, N. Y., USA
- Arakaki, D. T. y Sparkes, R. S. (1963). Microtechnique for culturing leukocytes from whole blood. Cytogenetics. 2:57-60
- Belloni, F. L., Rubio, R. y Berne, R. M. (1984). Intracellular adenosine in isolated rat liver cells. Pflügers Arch. Eur. J. Physiol. 400:106
- Berne, R. M. (1963). Cardiac nucleotides in hypoxia: possible role in regulation of coronary blood flow. Am. J. Physiol. 204: 317-322
- Betancourt, M., Aguilar Santamaría, M. A., Ducolomb Ramirez Y. y León Cázares, J. M. (1978). Ciclo celular del linfocito humano in vitro. Memorias de la XLVII Reunión Reslamentaria de la Asociación de Investigación Pediátrica: México, Méx.
- Burton, K. (1956). A study of the conditions and mechanism of the dihydroamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem. J. 62:315-323
- Carson, D. A. y Seesmiller, J. E. (1976). Effect of adenosine deaminase inhibition upon human lymphocyte blastogenesis. J. Clin. Invest. 57:274-282
- Cline, M. J. (1975). The white cell. Harvard University Press, Cambridge, Ma., USA y Londres, Inglaterra
- Colowick, S. P. y Kaplan, N. O. (1979). Cell culture. Methods in Enzymology, Vol. LVIII, Academic Press, Inc., New York, USA
- Chasova de Sánchez, V. (1984). Caracterización y función del ciclo circádico de la Adenosina. En Mensaje Bioquímico. Vol. VII, Ed. Saldaña de Delsadillo, Y., Alvarez Llera, G., Zentella de Piña, M. Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM.
- Fischer, D., Van der Weyden, M. B., Snyderman, R. y Kelley, W. N. (1976). A role for adenosine deaminase in human monocyte maturation. J. Clin. Invest. 58:399-407
- Fox, I. H. y Kelley, W. N. (1978). The role of adenosine and 2'-deoxyadenosine in mammalian cells. Ann. Rev. Biochem. 47:655-686

- Fredholm, B. E. (1982). Adenosine receptors. *Med. Biol.* 60:289-293
- Humason, G. L. (1979). *Animal Tissue Techniques*, 4a. ed. W. F. Freeman and Company, San Francisco, California, USA
- Kessel, R. G. y Kardon R. H. (1979). *Tissues and organs. A text-atlas of scanning electron microscopy*. W. H. Freeman and Company, San Francisco, USA
- Lehninger, A. L. (1982). *Bioquímica*, 2a. ed. Omesa, S.A. Barcelona, España
- Lins, N. R. y Kay, J. E. (1975). *Lymphocyte stimulation*. North Holland Publishing Co. Amsterdam, Holland
- Lowry, D. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275
- Martínez Valdez, H., Madrid Marina, V. y Piña, E. (1982). In vivo effect of adenosine on adenine nucleotides and inorganic phosphate in rat blood. *Life Sci.* 30:191-198
- Mazia, D. (1974). The cell cycle. *Sci. Am.* 230(1):54-64
- Metcalf, D. (1984). *Clonal culture of hemopoietic cells: techniques and applications*. Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam, The Netherlands
- Mishell, B. B. y Shiisi, S. M. (1980). *Selected methods in cellular immunology*. W. H. Freeman and Company, San Francisco, USA
- Mitchison, J. M. (1971). *The biology of the cell cycle*. Cambridge University Press, Great Britain
- Mustafin, A. T. y Volkov, E. I. (1982). On the distribution of the cell cycle generation times. *Biosystems.* 15:111-126
- Pardee, A. B., Dubrow, R., Hamlin, J. L. y Kletzien, R. F. (1978). Animal cell cycle. *Annu. Rev. Biochem.* 47:715-750
- Paton, D. M. (1984). Classification of adenosine receptors. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 6:167-169
- Peña Ransel, M. T. (1983). Efecto de algunas hormonas esteroides sobre la estimulación por fitohemaglutinina (PHA) en linfocitos de humano en cultivo. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. UNAM

- Peters, G. J., Oosterhof, A. & Veerkamp, J. H. (1982a). Metabolism of purine nucleosides and phosphoribosyl-pyrophosphate in thymocytes and splenocytes of various mammalian species. *Comp. Biochem. Physiol.* 73B:535-541
- Peters, G. J., Oosterhof, A. & Veerkamp, J. H. (1982b). Effects of adenosine and deoxyadenosine on PHA-stimulation of lymphocytes of man, horse and pig. *Int. J. Biochem.* 14:377-385
- Peters, G. J., Oosterhof, A. & Veerkamp, J. H. (1982c). Age-dependency of adenosine deaminase and purine nucleoside phosphorylase activities in rat spleen and thymus. *Biol. Neonate.* 42:195-200
- Peters, G. J., De Abreu, R. A., Oosterhof, A. & Veerkamp, J. H. (1983). Concentration of nucleotides and deoxynucleotides in peripheral and phytohemagglutinin-stimulated mammalian lymphocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* 759:7-15
- Phillips, H. J. (1973). Dye exclusion test for cell viability in tissue culture: methods and applications. Kruse, P. F. Jr., & Petterson, M. K. Jr., Academic Press, Inc., New York, N. Y.
- Rohlf, F. J. & Sokal, R. R. (1981). *Statistical tables.* Second ed., W. H. Freeman and Company, San Francisco, USA
- Sandberg, G. (1983). Regulation of thymocyte proliferation by endogenous adenosine and adenosine deaminase. *Int J. Immunopharmacol.* 5:259-266
- Snyder, F. F., Mendelsohn, J. & Seesmiller, J. (1976). Adenosine metabolism in phytohemagglutinin-stimulated human lymphocytes. *J. Clin. Invest.* 58:654-666
- Snyder, F. F. & Lukey, T. (1982). Kinetics considerations for the regulation of adenosine and deoxyadenosine metabolism in mouse and human tissues based on a thymocyte model. *Biochim. Biophys. Acta.* 696:299-307
- Sokal, R. R. & Rohlf, F. J. (1981). *Biometry.* Second ed. W. H. Freeman and Company, San Francisco, USA
- Ueland, P. M. & Saebø, J. (1979). Sequestration of adenosine in crude extract from mouse liver and other tissues. *Biochim. Biophys. Acta.* 587:341-352
- Ueland, P. M. (1983). Interaction of adenosine with adenosine-binding protein, S-adenosylhomocysteine hydrolase. Berney, R. M., Rall, T. W. & Rubio, R. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, The Netherlands

- Valentine, J. M. (1978). The evolution of multicellular plants and animals. *Sci. Am.* 239(3):140-158
- Wolbers, G., Zimmerman, T. P., Hiemstra, K., Winston, M. & Chu, L. (1975). Adenosine inhibition of lymphocyte-mediated cytotoxicity: possible role of cyclic adenosine monophosphate. *Science*. 187:957-959
- Zenser, T. V. (1975). Formation of adenosine 3',5'-monophosphate from adenosine in mouse thymocytes. *Biochim. Biophys. Acta*. 404:202-213
- Zimmerman, T. P., Wolbers, G. & Duncan, G. S. (1983). Mechanism of adenosine and 2'-deoxyadenosine inhibition of immune function in mouse lymphocytes. Berney, R. M., Rall, T. W. & Rubio, R. Martinus Nijhoff Publishers, The Hague, The Netherlands

VII) ABBREVIATURAS

AC,	adenosina cinasa
Ad,	adenosina
ADA,	adenosina desaminasa
ADN,	ácido desoxirribonucleico
ADP,	difosfato de adenosina
AMP,	monofosfato de adenosina
AMPC,	monofosfato de adenosina cíclico
ATP,	trifosfato de adenosina
cpm,	cuentas por minuto
dADP,	difosfato de desoxiadenosina
dATP,	trifosfato de desoxiadenosina
EHNA,	eritro-9-(2-hidroxi-2-nonil)adenina
IMP,	ácido inosínico
M,	molaridad
N,	normalidad
nm,	nanómetros
PHA,	fitohemaglutinina
rpm,	revoluciones por minuto