

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS



**EL EFECTO DEL CALCIO SOBRE LA DIVISION MITOTICA
DE LOS LINFOCITOS HUMANOS IN VITRO**

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
PILAR PONCE DIAZ

México, D. F. Junio 1979



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.

Todo se mueve, fluye, discurre, corre o gira;
cambian la mar y el monte y el ojo que los mira.

Antonio Machado

A la memoria de mi padre
con gratitud por el cariño y apoyo
que siempre me brindó. Su ejemplo
de bondad, rectitud y trabajo será
una huella imborrable en mi vida.

A mi madre
con cariño y gratitud.

El presente trabajo fué realizado bajo la dirección del Dr. Jesús Manuel León Cázares en el Laboratorio - de Biología Celular del Departamento de Bioenergética del Centro de Investigaciones en Fisiología Celular de la U. N. A. M.

Agradezco al Dr. León Cázares sus contribuciones en la elaboración del trabajo.

Agradezco al Dr. Alfonso Cáramez T. su colaboración en la realización del trabajo de microscopía electrónica y de fotografía.

Agradezco al Sr. Francisco Cervantes su valiosa cooperación, pues sin ella hubiera sido más difícil la realización de éste trabajo.

Agradezco a Luis Herrera G. su desinteresada donación de material biológico.

Agradezco a Oscar sus consejos y apoyo, que tanto me han ayudado.

Agradezco, en fin, la intervención de todas aquellas personas que de alguna manera han contribuido a la realización de éste trabajo.



Luis A. Herrera G.

INDICE

	Página
1 INTRODUCCION	
1.1 El calcio en los sistemas biológicos	1
1.2 El calcio y la división celular	4
1.2.1 Los nucleótidos cíclicos	4
1.2.2 Variaciones de los nucleótidos cíclicos y el calcio durante el ciclo celular	6
1.2.3 Los microtúbulos y los microfilamentos durante la mitosis	8
1.3 La sangre: medio natural de los linfocitos	10
2 ANTECEDENTES Y OBJETIVO	17
3 MATERIALES Y METODOS	
3.1 Siembra e incubación	
3.1.1 Técnica básica	20
3.1.2 Variaciones experimentales introducidas a la técnica básica	23
3.2 Criterios de cuantificación	
3.2.1 Análisis citogenético	23
3.2.2 Incorporación de timidina tritiada	24
3.3 Análisis matemático	25
3.3.1 Cálculo de las desintegraciones por minuto	25
3.3.2 Cálculo de la significancia estadística de los resultados	26
3.3.3. Prueba de "t"	27
3.4 Microscopía electrónica	27
4 RESULTADOS	
4.1 Desarrollo de la población en diferentes medios	29
4.2 Efecto de diferentes concentraciones de calcio	32
5 DISCUSION	52
6 CONCLUSIONES	61
7 BIBLIOGRAFIA	63

INTRODUCCION

1.1 El calcio en los sistemas biológicos

El calcio es un catión divalente implicado en el desarrollo de varios fenómenos biológicos y esencial para el metabolismo celular.

La importancia fisiológica del calcio fué reconocida primeramente por Ringer (1882), pero no fué hasta hace aproximadamente 25 años (Heilbrunn, 1956) cuando se empezó a estudiar sistemáticamente el papel que juega el calcio en los seres vivos.

El calcio actúa como modulador o activador de muchas enzimas como las ATPasas, endonucleasas, fosfodiesterasas, etc. (Kretsinger, 1976); se enlaza a moléculas involucradas en funciones importantes de los organismos, como las glicoproteínas de la membrana plasmática responsables de la adhesión y reconocimiento celulares (Cauldwell *et al.*, 1973) y las pectinas de la pared celular de las células vegetales (Burstrom, 1968), a las cuales confiere estabilidad.

El calcio controla la actividad contráctil del sistema actina-miosina en las células del músculo estriado (Huxley, 1975); es necesario para la polimerización de las unidades de tubulina que forman a los microtúbulos del endoesqueleto de las células, los neurotúbulos de los axones nerviosos, el huso mitótico de las células en división, etc. (Wessells, 1971).

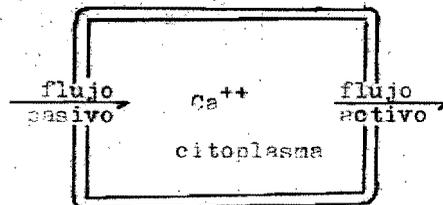
El calcio puede desplazarse a través de las membranas biológicas y producir variaciones de su concentración a uno y -

otro lado de dichas membranas, originando cambios de permeabilidad que se reflejan en el transporte de impulsos eléctricos, paso de sustancias a través de las uniones intercelulares, etc. (Lowenstein, 1970).

La concentración de calcio libre en el citosol de casi todas las células eucariontes es de 10^{-6} a 10^{-8} M, mientras -- que en el medio extracelular es de 10^{-3} M (Kretsinger, 1976). Esta relación es importante por ejemplo, para la estabilización y activación de enzimas extracelulares que no tienen actividad lítica dentro de los gránulos de secreción citoplásmicos sino hasta que son vertidos al medio extracelular. Además se ha encontrado que la exocitosis está generalmente acoplada a un flujo de calcio (Douglas, 1975).

Algunos estímulos producen variaciones en la concentración del calcio intracelular hasta de 10^{-5} M, por lo que se han propuesto algunos modelos para explicar el transporte de calcio a través de las membranas celulares. Borle (1973) varió el modelo tradicional del transporte de calcio en "dos pasos" (fig. 1a) y propuso un modelo en el que la homeostasis celular del calcio y su transporte son controlados principalmente por las mitocondrias (fig. 1b); se basa en que éstos organelos pueden acumular grandes cantidades de calcio y en que la membrana mitocondrial es altamente permeable al calcio. -- No está completamente claro como se regula el flujo de calcio a través de la membrana mitocondrial pero se cree que está implicado un gradiente de aniones y/o protones (Lehninger, 1974).

Fig. 1a. El modelo de "dos pasos" para el transporte de calcio (tomado de Borle, 1973).



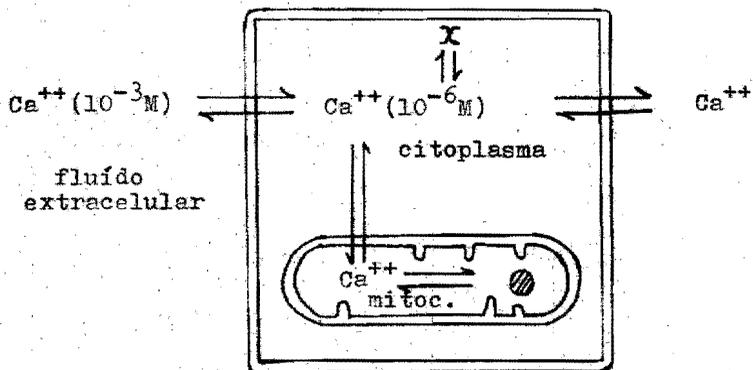


Fig. 1b. Modelo propuesto por Borle para la homeostasis celular del calcio (tomado de Borle, 1973).

La captación de calcio a través de la membrana plasmática de las células de mamífero, es un proceso que no requiere gasto de energía ya que tiene un coeficiente de temperatura bajo y no es sensible a inhibidores metabólicos y condiciones anaeróbicas (Whitney y Sutherland, 1972 a). La salida de calcio por el contrario, es dependiente de energía y parece involucrar una bomba de calcio. Esto significa que los iones de calcio no están distribuidos de acuerdo a su potencial electroquímico a través de la membrana plasmática (Rasmussen, 1970).

La captación de calcio en vesículas de retículo endoplásmico se regula por la actividad de la ATPasa dependiente de calcio y magnesio, que es modulada a su vez por la constitución lipídica de la membrana que rodea a dicha enzima (Metcalf et al., 1976).

1.2 El calcio y la división celular

Todas las células durante su desarrollo, duplican su información genética, sus componentes moleculares y organelos por lo cual pueden dar lugar a dos células hijas potencialmente idénticas a la que les dió origen.

Analizar el papel que juega un elemento como el calcio en el proceso de la división celular es interesante ya que puede actuar a diferentes niveles.

Una característica constante de la iniciación de la división celular, es el incremento de la concentración intracelular de calcio (Berridge, 1975). Este aumento de calcio está relacionado tanto con factores externos como es la presencia de sustancias mitógenas como con factores internos, como es el cambio en la concentración intracelular de nucleótidos cíclicos, adenosina 3'5' monofosfato o ácido adenílico (AMPC) y guanosina 3'5' monofosfato o ácido guanílico (GMPc).

1.2.1 Los nucleótidos cíclicos

El papel universal del AMPC como segundo mensajero intracelular ha sido ampliamente estudiado en diferentes sistemas (Sutherland, 1972; Pastan, 1972; Nathanson y Greengard, 1977; Bourne et al., 1974) y produjo interés sobre su posible actuación como una señal de la división celular (Abell y Monahan, 1973).

Rasmussen (1970) desarrolló la idea de que el calcio puede actuar como un segundo mensajero en forma paralela a la acción del AMPC. Esta proposición se ve apoyada por el hecho de que la activación de la fosfodiesterasa, enzima esencial -

en el metabolismo de los nucleótidos cíclicos, depende de la presencia de un complejo calcio-proteína (Kakiuchi et al., - 1975).

En algunos tipos celulares el AMPc inhibe la división mitótica, mientras que en otros, las concentraciones altas de dicho nucleótido se asocian con una rápida proliferación. Estas observaciones indican que el AMPc no es el regulador esencial de la división celular, pero hay evidencias de que participa en la modulación del nivel intracelular de calcio de dos maneras diferentes, dependiendo del tipo celular de que se trate (Berridge, 1975):

a) En algunos casos las sustancias que incrementan el nivel intracelular de AMPc, aumentan indirectamente la concentración intracelular de calcio, hasta alcanzar el nivel necesario para que se dispare el mecanismo de la división celular. Esto se logra a través de dos posibles mecanismos: estimulando la liberación de calcio almacenado en pozas intracelulares o estimulando el influjo de calcio desde el exterior celular.

b) En otros tipos celulares, el AMPc tiene el efecto contrario pues reduce el nivel intracelular de calcio, ya sea inhibiendo su captación a través de la membrana plasmática o desacoplando el mecanismo responsable que remueve calcio de los reservorios del citoplasma.

En ambos casos un nivel alto de calcio puede estimular a la guanilato ciclasa e incrementar el nivel de GMPc.

El AMPc y el GMPc son nucleótidos regulatorios que presentan cambios inversos de concentración, en eventos celulares en los que se regulan procesos opuestos o bidireccionales. Estas observaciones han sugerido que el AMPc y el GMPc funcionan en una interrelación recíproca, lo cual se ha denominado la "hipótesis del yin-yang" (Lehninger, 1976).

1.2.2 Variaciones de los nucleótidos y el calcio durante el ciclo celular

El proceso de crecimiento, duplicación de componentes celulares y división se conoce como ciclo celular.

En el ciclo celular de las células eucariontes, se han reconocido dos etapas:

- a) Interfase o período de crecimiento
- b) Mitosis o período en el que se lleva a cabo la división celular.

La interfase puede dividirse a su vez en tres etapas de acuerdo con los fenómenos moleculares ocurridos:

Fase G_1 o presintética, en la que se realiza la síntesis de proteínas constitutivas de los organelos y enzimas necesarias para la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN).

Fase S o de síntesis de ADN en la que se duplica toda la información genética.

Fase G_2 o postsintética, en la que existe reacomodo molecular del ADN y formación de las fibras del huso mitótico.

Cuando las células se encuentran en el inicio de la fase G_1 , lo que algunos autores denominan como G_0 o fase de transición, las células pueden seguir uno de dos caminos: pueden iniciar un nuevo ciclo de división (vía I de la fig. 2), o también pueden comenzar su proceso de diferenciación (vía II de la fig. 2).

La hipótesis de Berridge (1975) supone que la "decisión" entre éstas dos alternativas depende de la concentración intracelular de calcio. Un nivel alto de calcio inducirá en la

célula el inicio de un nuevo ciclo de división, mientras que un nivel bajo la llevará hacia la diferenciación.

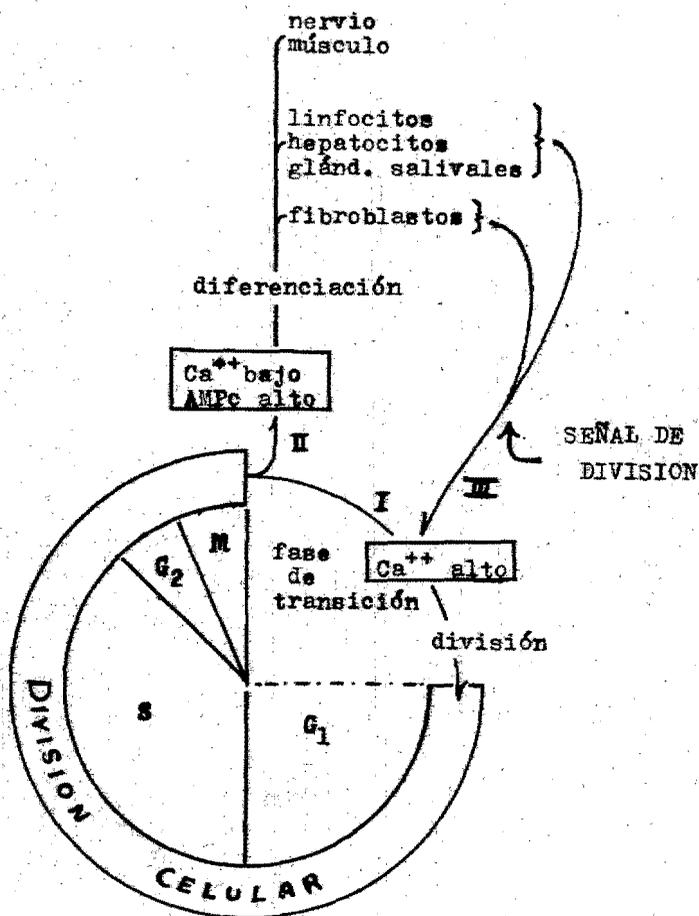


Fig. 2. Participación del calcio durante la fase de transición del ciclo celular (tomado de Berridge, 1975).

Aunque el proceso de diferenciación es por lo general irreversible, ciertas células especializadas conservan su capacidad para dividirse y pueden volver a entrar al ciclo celular respondiendo a una señal de división, que puede ser la presencia de una sustancia mitógena externa o un incremento espontáneo del nivel intracelular de calcio (vía III de la fig. 2). Ejemplos de éste caso son los linfocitos, las células del hígado, las células de las glándulas salivales y los fibroblastos.

Se consideran sustancias mitógenas todas aquellas capaces de incrementar la captación de calcio y en consecuencia estimular la proliferación celular (Parker, 1974); éste incremento de calcio se ve acompañado generalmente por un aumento en la síntesis de GMPC.

Mediante las técnicas de cultivo, se pueden obtener grandes cantidades de células en la misma fase, por lo que éste método es útil para estudiar los cambios bioquímicos producidos durante el ciclo celular. Así por ejemplo, Zeilig y Goldberg (1977) en cultivos de células de hepatoma de rata, encontraron que el máximo de AMPc y mínimo de GMPC ocurre en la fase G₁.

1.2.3 Los microtúbulos y los microfilamentos durante la mitosis.

Al inicio de la mitosis, durante la profase, la cromatina se condensa en cuerpos compactos e independientes llamados -- cromosomas, lo cual permite su distribución equitativa en las células hijas durante las etapas posteriores de la mitosis.

Cada cromosoma está formado por dos cuerpos idénticos llamados cromátidas hermanas, las cuales se unen por el centrómero. La distribución de las cromátidas se realiza gracias a la intervención de una estructura proteica formada por microtúbulos y microfilamentos, que es el aparato mitótico que consta de 3 partes principalmente:

- Centriolos: son dos cuerpos cilíndricos formados por 9 -- grupos de microtúbulos que se duplican durante la profase y dirigen la formación del huso mitótico.
- Huso mitótico: es un sistema de microtúbulos que atraviesa la región nuclear. Durante la metafase los cromosomas se unen a las fibras del huso a través del cinetocoro, en la región centromérica de cada cromosoma y se alinean en un mismo plano. Durante la anafase, las cromátidas hermanas se separan, cada una unida a una fibra del huso, hacia los polos opuestos del aparato mitótico.
- Asteres: son un sistema de microtúbulos cortos dispuestos radialmente a partir de cada uno de los centriolos y conectan al aparato mitótico con la membrana plasmática.

Durante la telofase el aparato mitótico se desensambla y ocurre la cariocinesis, es decir, se regenera la envoltura al rededor de cada grupo de cromosomas para formar los núcleos hijos y la cromatina se dispersa dentro de ellos. (Dyson, 1976).

Existen evidencias de que las unidades de tubulina que se polimerizan para formar el huso mitótico provienen del desensamble del endoesqueleto que mantiene la forma celular, lo -- que explicaría el hecho de que durante la mitosis las células adquieren característicamente la forma esférica.

Las proteínas contráctiles actina y miosina se encuentran en forma de filamentos entre los cromosomas y entre los polos

del huso y se les atribuye un papel primordial en el movimiento de los cromosomas durante la anafase (Fujiwara y Pollard, 1976).

La separación de las células hijas o citocinesis ocurre casi siempre en sincronía con la cariocinesis y se debe a la formación de un anillo contráctil de microfilamentos orientados periféricamente a la zona de constricción celular (Lazarides y Revel, 1979).

La presencia de cationes divalentes, especialmente calcio, regula la polimerización de las unidades de tubulina que constituyen a los microtúbulos (Schliwa, 1976) así como el recambio de miofibrillas (Reville et al., 1976).

La formación del huso mitótico se inhibe en presencia de colcemid, que es un compuesto que disminuye la cantidad de unidades de tubulina polimerizable (Sluder, 1976).

1.3 La sangre: medio natural de los linfocitos

La sangre es el medio de transporte de los nutrientes desde el intestino hasta cada uno de los tejidos; también transporta los productos orgánicos de desecho hacia los riñones y distribuye los gases respiratorios; asimismo, es el medio en el que se desarrolla la llamada respuesta inmune en los organismos vertebrados.

La sangre es un tejido propiamente dicho, que consta de 3 clases de elementos figurados, suspendidos en una sustancia intercelular común llamada plasma.

Los elementos figurados de la sangre son: 1) plaquetas, -- las cuales son fragmentos celulares involucrados en la coagulación de la sangre; 2) eritrocitos, los cuales constituyen cerca de la mitad del volumen total de la sangre y son los -- encargados de transportar el oxígeno; 3) leucocitos, que son los responsables de la respuesta inmune y comprenden varios -- tipos celulares.

Los leucocitos se clasifican en dos grupos de acuerdo con la presencia o ausencia de gránulos en el citoplasma, revelados por técnicas específicas de tinción:

- a) granulocitos, que agrupan a eosinófilos, basófilos y heterófilos
- b) agranulocitos, que agrupan a monocitos, macrófagos y linfocitos.

El plasma está formado en su mayor parte por agua y contiene además iones inorgánicos, moléculas orgánicas pequeñas y -- proteínas (tabla 1).

Los linfocitos constituyen del 25% al 30% de los leucocitos miden cerca de 10 micras de diámetro; presentan poco citoplasma el cual forma un anillo estrecho alrededor del núcleo, siendo éste redondeado, algo excéntrico y por lo general presenta una muesca producida por el centrosoma (fig. 3). La -- cromatina se encuentra en forma de grumos gruesos y se tinte intensamente con colorantes básicos (Forteza, 1964).

Tabla 1. Composición del plasma sanguíneo humano (tomado de Dyson 1976).

CONSTITUYENTE	mg/100 ml
Aminoácidos	35-65
Urea	20-30
Acido úrico	2-6
Carbohidratos	210-320
Glucosa	65-90
Acidos orgánicos	11-27
Lactato	8-17
Lípidos	385-675
Sales inorgánicas	900
ión bicarbonato	0.024-0.030 M
ión cloruro	0.100-0.110 M
ión sodio	0.130-0.150 M
ión potasio	0.0045 M
ión calcio	0.0050 M
ión magnesio	0.0020 M
Proteínas	5700-8000
albúmina	55.0 %
alfa globulina	14.0 %
beta globulina	13.4 %
fibrinógeno	4.0 %
gama globulina	13.5 %

Los iones inorgánicos y las moléculas orgánicas pequeñas constituyen el 1 % del peso del plasma y el 10 % del total de sólidos. Las proteínas de la sangre comprenden del 5.7 al 8.0 % del peso del plasma y cerca del 75 % del total de sólidos.

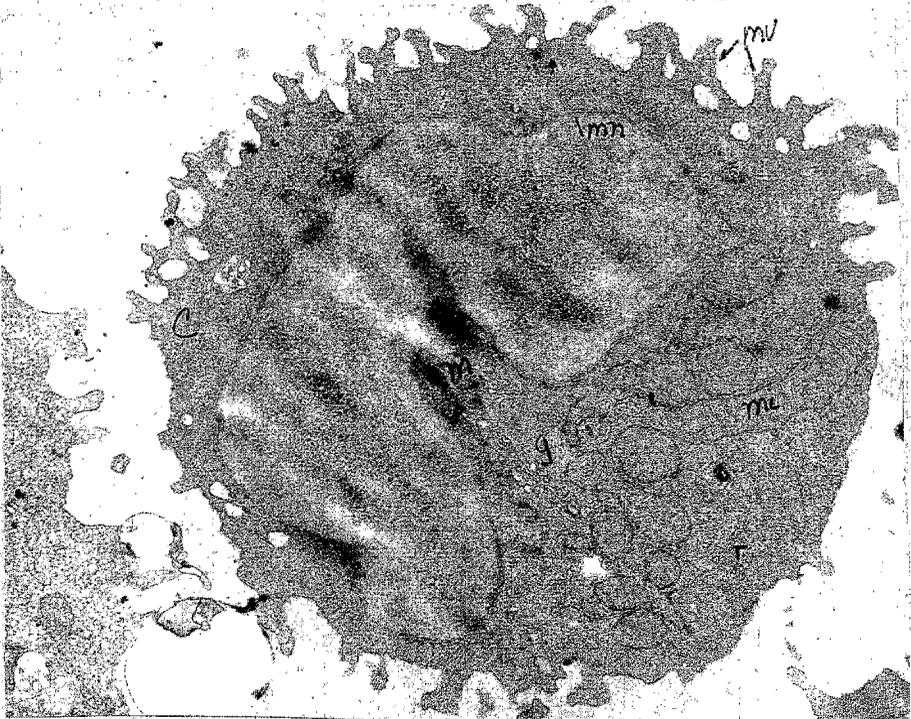


Fig. 3. Micrografía electrónica de un linfocito
c: citoplasma; g: aparato de Golgi; m: mues-
ca del núcleo; mi: mitocondria; mn: membra-
na nuclear; mv: microvellosidades de la mem-
brana plasmática; r: retículo endoplásmico.
(aumento: 20,000 diámetros).

Todos los linfocitos que circulan en la sangre se derivan de células precursoras de la médula ósea. Cerca de la mitad de esos linfocitos, las células T, han pasado a través del timo en su recorrido por los tejidos; los demás se denominan células B. Las células T y B no se pueden distinguir morfológicamente, sin embargo, solo las B y su progenie producen anticuerpos cuando están en presencia de sustancias extrañas al organismo o antígenos, lo que se conoce dentro del fenómeno inmunológico como respuesta humoral; las células T pueden matar a otras células tales como las cancerosas y las de tejidos trasplantados, a través de la producción de sustancias tales como las linfocinas y a esto se le conoce como respuesta celular (Burnet, 1976).

Se considera que el paso inicial de la respuesta inmune es el contacto de los antígenos con los receptores de la superficie de los linfocitos B (Lerner y Dixon, 1973) pero se ha encontrado que es necesaria la cooperación entre las células B y T para la producción de la mayoría de los anticuerpos (Burnet, 1976; Coutinho et al., 1975).

Los linfocitos, por ser un tipo celular que dentro de sus funciones normales incluye la proliferación clonal después de ser estimulados por la presencia de un antígeno, representan un buen sistema para estudiar in vitro los eventos bioquímicos que se relacionan con el inicio de la división celular y su regulación (Hadden et al., 1972).

Las lectinas son mucoproteínas de alto peso molecular, derivadas principalmente de vegetales, que poseen la capacidad de unirse con los residuos azucarados de la membrana plasmática (Sharon, 1977). Varias lectinas como la concanavalina A (Con A) y la fitohemaglutinina (PHA) han probado ser mitogénicas para los linfocitos, principalmente para aquellos derivados del timo (Kelly et al., 1977; Freedman et al., 1975). Los linfocitos B responden a otros mitógenos como por ejemplo los lipopolisacáridos bacterianos (LPS) (Watson, 1975).

La PHA se extrae del frijol Phaseolus vulgaris y es el agente mitogénico más comúnmente utilizado en los estudios in vitro de la proliferación de los linfocitos, por su alta efectividad y su rápida respuesta con respecto a otros antígenos específicos (Whitney y Sutherland, 1972 b).

Después de transcurrida una hora en que las células están en contacto con una concentración baja de PHA, la estimulación es irreversible, aunque las células se sometan a repeti

dos lavados, mientras que la Con A se enlaza mas debilmente; se requieren cantidades menores de PHA que de Con A para obtener una estimulación máxima (Lindahl-Kiessling, 1972).

Alford (1970) encontró que la presencia en el medio de cationes divalentes, especialmente calcio, es esencial para que se lleve a cabo la transformación de los linfocitos inducida por PHA, pero Alford no pudo distinguir entre dos posibles explicaciones, aunque éstas no son mutuamente exclusivas:

1) que los cationes divalentes son esenciales para que se realice el metabolismo normal de todas las células, incluyendo a los linfocitos, de tal manera que la síntesis de ADN se inhibiera en ausencia de dichos cationes o.

2) que los cationes divalentes juegan un papel especial en la activación de los linfocitos por PHA.

Novogredsky (1974) encontró que el tratamiento de los linfocitos con neuraminidasa, enzima que libera el ácido siálico de la superficie celular, y la adición de polipéptidos básicos a los cultivos, estimula la respuesta a PHA y Con A. - Larsen y Heron (1978) encontraron que la presencia de polielectrolitos que no son mitógenos por sí mismos, también estimulan la respuesta mientras que la adición de polianiones la inhiben. Estos estudios demuestran que la carga superficial de los linfocitos y/o las interacciones entre los componentes catiónicos y aniónicos del medio, son importantes para que se desarrolle el efecto mitogénico de las lectinas.

Los estudios en la cinética de captación de calcio en linfocitos indican que se trata de un proceso saturable, mediado por una molécula acarreadora o algún otro constituyente de la membrana, el cual enlaza calcio, evidenciando que es un fenómeno del tipo de difusión facilitada (Whitney y Sutherland, 1973 b). La PHA estimula significativamente la capta-

ción de calcio en linfocitos, dentro del primer minuto de exposición, exhibiendo también una cinética de saturación.

En todos los sistemas en que se requiere la interacción de un ligando con un receptor superficial, se provoca un cambio conformacional de la proteína receptora, el cual inicia una serie de sucesos en la membrana de los que resulta la -- traslocación de iones, cambios en el potencial de membrana, activación de la adenilato ciclasa y otros eventos que posteriormente se traducirán en una respuesta metabólica (De Robertis, 1976). De ésta manera la PHA interactúa con los receptores de la superficie de los linfocitos T (Kelly et al., 1977; Faguet, 1977), y se inicia la síntesis de ADN (Bernheim et al., 1978; Weinstein et al., 1974), de ARN estable (Mazumder y Mandal, 1975), se incrementa la captación de aminoácidos (Whitney y Sutherland, 1973 a), varían los niveles de nucleótidos cíclicos (Smith et al., 1971 a y 1971 b; Hadden et al., 1972; De Robertis et al., 1974; Coffey et al., 1977), aumenta la captación de calcio (Allwood et al., 1971; Whitney y Sutherland, 1972 a y 1972 b) etc. y finalmente se realiza la división celular, quedando las células hijas en condiciones de volver a ser estimuladas.

ANTECEDENTES Y OBJETIVO

La importancia de la presencia de calcio en los cultivos de linfocitos se ha visto a través de la utilización de diferentes metodologías, con introducción de diferentes sustancias:

a) Incorporación de calcio radiactivo: la PHA origina en los linfocitos un rápido incremento en la acumulación intracelular de calcio, hecho que no sucede en otros tipos celulares como los eritrocitos (Allwood et al., 1971). La curva de incorporación de ^{45}Ca en presencia de PHA es similar a la de incorporación de timidina tritiada (Whitney y Sutherland, 1972 a).

b) Agentes quelantes: el calcio y en general los cationes divalentes pueden removerse del medio utilizando agentes como el citrato de sodio, EDTA, EGTA. Las constantes de afinidad calcio-quelante están bien determinadas para ciertas condiciones constantes pero no para las circunstancias en que se desarrollan los cultivos, es decir, 37°C y pH variable a través de los días de incubación.

c) Medio libre de calcio y magnesio: Alford (1970) reportó que el efecto de estos dos cationes es aditivo, es decir, en un medio depletado de cationes por EGTA la adición de calcio restaura la respuesta en un 75% mientras que el magnesio lo hace aproximadamente en un 25%.

d) Ionóforos: son sustancias capaces de intervenir en el transporte de iones a través de las membranas celulares; Maino et al. (1974) utilizaron el ionóforo A 23187 que es específico

co para cationes divalentes y forma un complejo liposoluble. Dicho ionóforo inicia en los linfocitos una serie de eventos similares a los causados por la PHA, pero produce un desarrollo menor del retículo endoplasmático y anomalías en las mitocondrias, que se traducen en un marcado efecto tóxico, es decir, disminución en la viabilidad celular.

e) Suero: el suero humano tiene aproximadamente 2.7 mM de -- calcio y el suero fetal de ternera contiene 3.0 mM; en el -- suero normal cerca del 53% del total de calcio está ionizado (Whitney y Sutherland, 1972 b) mientras que el resto se halla enlazado a proteínas del suero, principalmente a la albúmina. Brennan et al. (1975) encontraron que la tasa de crecimiento de los linfocitos se reduce cuando se cultivan en un medio con suero dializado o con suero tratado con una resina quelante de calcio y magnesio.

Cada uno de estos métodos ofrece diferentes ventajas y solo la integración de todos ellos puede dar una idea global del efecto del calcio en los cultivos de linfocitos. Es importante hacer notar que en la mayoría de los trabajos mencionados únicamente se cuantifica la fase S del ciclo celular.

En el presente trabajo el objetivo fué encontrar un medio que fuera lo mas sencillo posible y permitiese analizar el crecimiento de la población de linfocitos (fases S y M) asociado a diferentes suplementos de calcio, bajo la hipótesis de que la investigación de determinados elementos ha de hacerse a base de cultivos en medios de composición controlada de los que se supriman a voluntad unos u otros elementos (Margalef, 1977).

En la técnica básica utilizada para el cultivo de linfocitos, se incluyen suero, que es un complejo molecular cuya composición no está bien definida, y medios nutritivos comerciales que contienen diversas sustancias en solución como: aminoácidos, vitaminas, sales inorgánicas, nucleótidos, azúcares, etc. En estas condiciones es difícil evaluar los efectos de cada uno de los componentes en el cultivo, además de que se desconocen todas las posibles interacciones entre los elementos del mismo cultivo.

En este trabajo se analiza el desarrollo de la población de linfocitos en un medio carente de nutrientes y suero, en un medio que contiene 20% de suero fetal de ternera inactivado y en solución isotónica con una concentración de calcio semejante a la que contiene el suero.

Además se compara el efecto de diferentes concentraciones de calcio en medio carente de nutrientes y suero, en medio nutritivo carente de suero y en un medio a base de suero fetal de ternera inactivado.

MATERIALES Y METODOS

Se hicieron diez cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica, siguiendo la microtécnica de Arakaki y Sparkes (1963) con varias modificaciones.

3.1 Siembra e incubación

3.1.1 Técnica Básica

Se utilizan frascos ampula de 100 ml, estériles, que contienen 5 ml de medio TC-199 (Difco 5477) al 20 % de suero fetal de ternera (Gibco 614) previamente inactivado a 60°C durante 30 minutos en baño María. Se añaden 0.02 ml de una solución de glutamina 0.5% (Difco 5789), 0.25 ml de fitohemaglutinina (Difco 0528), 100 U.I. de TC Penicilina y 100 µg de estreptomina (Difco 5854) y 300 U.I. de heparina (Abbott de 1000 U. I.). En cada frasco se siembran 0.30 ml de sangre completa, extraída a adultos varones sanos con una jeringa previamente heparinizada, momentos antes de la siembra. Los cultivos se incuban a 37°C durante 72 horas.

3.1.2 Variaciones experimentales introducidas a la técnica básica (tabla 2)

A) Para analizar el desarrollo de la población de linfocitos en el tiempo, se hicieron cosechas cada 24 horas durante 4 días, es decir, al finalizar las 24, 48, 72 y 96 horas de incubación. Esto se hizo en tres medios diferentes:

- a) solución isotónica salina estéril de NaCl 0.9% (Abbott)
- b) misma solución con 20 % de suero fetal de ternera inactivado por calor
- c) misma solución con 1.4 mM de CaCl_2

B) Para comparar el efecto de la presencia de calcio se probaron diferentes cantidades de una solución madre estéril de cloruro de calcio (CaCl_2) (Baker Analyzed 1306) 125 mM para obtener distintas concentraciones finales en los frascos de cultivo y se cosechó a las 72 horas de incubación. Esto se hizo en tres medios diferentes:

- a) solución isotónica salina estéril de NaCl 0.9%
- b) medio TC-199
- c) solución isotónica de NaCl con 5% de suero fetal de ternera inactivado. Se utilizó ésta concentración ya que resultó ser la óptima para los fines del trabajo, después de una prueba en que se utilizaron diferentes concentraciones de suero.

Se probó un rango de concentraciones de CaCl_2 desde 0.5 hasta 10.0 mM ya que contiene cantidades cercanas al nivel normal de calcio en la sangre, que es de 5mM (tabla 1) y se comparó siempre con un control carente de calcio.

Tanto en A como en B, los demás elementos del cultivo: mitógeno (PHA), anticoagulante (heparina), glutamina que es un factor importante en el metabolismo nitrogenado de las células y antibióticos, se mantuvieron constantes por ser indispensables para el desarrollo de los cultivos. Asimismo se mantuvieron constantes el volumen de los cultivos (5 ml) y la temperatura (37°C).

Tabla 2. Variaciones experimentales utilizadas en éste trabajo

CULTIVO	VARIABLE	NaCl 0.9%	TC-199	SFTI (%)	CaCl ₂ (mM) ²	TIEMPO (horas)
371	Solución salina	+	-	-	-	24,48, 72,96
372	Suero	+	-	20	-	24,48, 72,96
380	Baja conc. calcio	+	-	-	1.4	24,48 72,96
390	Diferentes conc. calcio	+	-	-	0, 2.5, 5, 10.	72
391	Diferentes conc. calcio	+	-	-	0, 2.5, 5, 10.	72
395	Diferentes conc. calcio	+	-	-	0, 2.5, 5, 7.5, 10	72
402	Diferentes conc. calcio en medio nutritivo	-	+	-	0, 2.5, 5, 7.5, 10	72
405	Diferentes conc. de suero	+	-	0, 1, 5, 10, 15, 20	-	72
406	Conc. baja de suero conc. altas calcio	+	-	5	0, 2.5, 5, 7.5, 10	72
407	Conc. baja de suero conc. bajas calcio	+	-	5	0, 0.5, 1, 1.5, 2	72

SFTI Suero fetal de ternera inactivado

TC-199 Medio nutritivo

El tiempo se refiere al número de horas en incubación

3.2 Criterios de cuantificación

La proliferación celular en los cultivos se evaluó mediante dos criterios, por lo que fué necesario seguir dos metodologías: análisis citogenético e incorporación de timidina tritiada (timidina ^3H).

3.2.1 Análisis citogenético

Consiste en la observación directa del número de figuras mitóticas en preparaciones fijas de los cultivos. A los frascos destinados para análisis citogenético, se les agregó 0.05 ml de una solución de Colcemid (Ciba) de 2 $\mu\text{g/ml}$, 3 horas antes de comenzar la cosecha. La cosecha se realizó según la técnica propuesta por Moorhead et al. (1960):

Al término de la incubación, el contenido de cada frasco de cultivo se homogeneizó y se centrifugó a 150 g durante 7 minutos; se desechó el sobrenadante y el paquete celular se resuspendió suavemente en agua destilada estéril hasta completar 5 ml. Los tubos fueron incubados a 37°C durante 15 minutos, al término de los cuales se centrifugaron a 150 g durante 7 minutos y nuevamente se desechó el sobrenadante; el paquete celular de cada tubo se resuspendió suavemente en 5 ml de fijador elaborado con metanol-ácido acético (3:1) y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 minutos. Se centrifugaron a 150 g durante 7 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió en 5 ml de fijador. Se repitió el lavado hasta que el paquete celular estuvo libre de hemoglobina y los tubos se dejaron 24 horas en el congelador.

Para la obtención de figuras mitóticas, se hicieron 2 ó 3 preparaciones con el contenido de cada uno de los tubos que estuvieron 24 horas en el congelador, siguiendo la técnica -

de secado al aire (Moorhead et al., 1960). Posteriormente - se tiñeron con una solución de Giemsa-Leishman-agua (3:1:36) durante 20 minutos a temperatura ambiente; se enjuagaron con agua destilada y alcohol al 50% y se dejaron secar a temperatura ambiente. Se realizaron un total de 98 preparaciones, que posteriormente fueron revisadas al microscopio y se registró el número total de profases, metafases, anafases y telofases encontradas en cada una.

3.2.2 Incorporación de timidina tritiada

La timidina tritiada es un precursor radiactivo de la timina y se incorpora en el ADN durante la fase S del ciclo celular, de tal manera que marca radiactivamente los núcleos de las células que duplican su ADN durante el cultivo.

A los frascos destinados a cuantificación de la incorporación de timidina tritiada, se agregó 1 μ Ci de timidina tritiada (Metil-timidina, New England Nuclear NEN 0.27x, actividad específica 20 Ci/mM), 15 horas antes de iniciar la cosecha.

La cosecha se realizó siguiendo la metodología mencionada anteriormente, suprimiendo el choque hipotónico. Una vez que los paquetes celulares estuvieron libres de hemoglobina, se desechó el sobrenadante y se agregaron 5 ml de ácido tricloroacético (TCA) (Merck) frío al 7%. Se dejaron incubar a 4° C durante una hora. Terminada ésta incubación se centrifugaron a 600 g durante 10 minutos; se desechó el sobrenadante y se les agregó 5 ml de TCA frío. Cada paquete celular se re-suspendió y se hizo pasar a través de un filtro de celulosa Millipore de poro 0.65 μ m de diámetro; cada tubo se enjuagó con otros 5 ml de TCA frío, los cuáles también se filtraron.

Cada papel filtro se colocó en un vial de cortador, agregándole 0.4 ml de dodecil sulfato de sodio (SDS) (Sigma) al 2% y se incubó a 60°C durante 30 minutos; después de ésta incubación los viales se dejaron enfriar y se les agregaron 10 ml de líquido de centelleo tipo Bray.

Los viales se analizaron en un Contador de Centelleo Líquido de Hewlett Packard automático, conectado a una terminal de -- computadora, el cuál proporcionó impreso el registro de partículas beta emitidas por la timidina tritiada contenida en los núcleos de las células, como cuentas por minuto (cpm).

3.3 Análisis matemático

Para asegurar el efecto de cualquier agente sobre un sistema, dicho efecto debe ser reproducible, por lo que se plantea la necesidad de hacer varias repeticiones y obtener así conclusiones estadísticamente válidas (Taylor y Evans, 1973).

Con éste propósito se realizó cada cultivo por triplicado bajo las mismas condiciones y se obtuvo así un valor promedio y una medida de la variabilidad intrínseca del sistema en cada tratamiento.

3.3.1 Cálculo de las desintegraciones por minuto

Los datos proporcionados por el contador de centelleo para cada uno de los frascos de cultivo son: las cuentas por minuto (cpm) y una medida de la eficiencia del aparato. El porcentaje de la eficiencia real del aparato se calcula periódicamente ya que varía con el tiempo.

En las gráficas e histogramas se utilizaron los valores porcentuales respecto al control (% Control).

$$\% \text{ Control} = \frac{(\bar{x}) (100)}{\bar{x} \text{ control}} + \frac{(s\bar{x}) (100)}{\bar{x} \text{ control}}$$

El ajuste de las curvas se hizo por el método de mínimos cuadrados.

3.3.3 Prueba de "t"

Fue ideada por William S. Gosset, quien utilizaba el seudónimo de "Student", en 1908. Se utiliza para probar si dos medias muestrales son diferentes o no, (Parker, 1976).

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{s_1^2}{n_1} + \frac{s_2^2}{n_2}}} \quad \text{Grados de libertad} = n_1 + n_2 - 2$$

Se aplicó esta prueba para comparar el comportamiento de dos diferentes cultivos y para saber si había diferencias significativas o no entre el control y los tratamientos cuando los datos así lo ameritaron.

3.4 Microscopía electrónica

Se aplicó la técnica de microscopía electrónica para tener un criterio morfológico y cualitativo del comportamiento de los linfocitos en cultivo, de acuerdo a la siguiente metodología:

Se sembraron 8 frascos de cultivo de linfocitos siguiendo la técnica básica; al cabo de las 72 horas de incubación el contenido de los frascos se homogeneizó y se centrifugó a 800

rpm durante 7 minutos. Se desechó el sobrenadante de los tubos y se procedió a aislar los linfocitos por la técnica de Ficoll-paque. Cuando los paquetes celulares estuvieron limpios, se resuspendieron en 4 tubos de microfuga que contenían glutaraldehído al 3% en buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.3, y se dejaron a 4°C durante 2.5 horas. Se centrifugaron a 10 000 rpm durante 30 segundos, se desechó el glutaraldehído y se les agregó sacarosa 0.25 M dejándolos toda la noche en refrigeración. Se desechó la sacarosa y se dejaron durante 2 horas con OsO₄ rodeados de hielo. Se quitó el tetróxido de osmio y se agregó sacarosa 0.25 M dejándolo durante un minuto. Se desechó la sacarosa y se agregó alcohol al 30% el cuál se dejó durante 10 minutos en baño de hielo, dicho alcohol se eliminó y se repitió el paso anterior con alcohol al 50 %, 70 %, 95 % y finalmente con alcohol absoluto durante 15 minutos. Se pasaron los botones a viales con alcohol absoluto y se dejaron 15 minutos a temperatura ambiente en una rotadora. Se eliminó el alcohol y se les agregó óxido de propileno dejando los viales 15 minutos en la rotadora a temperatura ambiente; ésto se repitió una vez más. Se decantó el óxido de propileno y se les agregó -- epón-óxido (1:1) dejándolos toda la noche en una desecadora a temperatura ambiente. Los botones se pasaron a cápsulas de polimerización y posteriormente se cortaron.

Los cortes fueron observados en un microscopio electrónico JEOL 100 B operado a 60 KV y con apertura de 100 μ en el condensador.

RESULTADOS

4.1 Desarrollo de la población en diferentes medios

En el cultivo 371 que contenía solución isotónica salina - (tabla 3) se observó un decremento en la timidina tritiada incorporada conforme pasó el tiempo, como lo muestra la pendiente negativa de la curva en la figura 4; esto se debió probablemente a la muerte celular.

Como se observa en la misma figura, la adición de una concentración baja de calcio (1.4 mM de CaCl_2) probada en el cultivo 380, evitó el decremento de la población y el ajuste de la curva correspondiente a éste cultivo muestra una pendiente positiva.

Con el fin de poder comparar éstos cultivos, se escogió el tercer día (72 horas de incubación) como el control para cada cultivo. Existen diferencias significativas entre los extremos de las curvas, como se muestra en la tabla 4.

Como se observa en la tabla 3, la adición de 1.4 mM de CaCl_2 probada en el cultivo 380 no logró alcanzar la respuesta que se produce en presencia de suero fetal de ternera (cultivo 372) en valores absolutos de dpm, aunque la concentración de calcio disociado es similar.

En los cultivos 371 y 380 que contenían solución isotónica salina y la misma solución con 1.4 mM de CaCl_2 respectivamente, no se encontraron figuras mitóticas en las preparaciones; sin embargo cuando se utilizó la misma solución con 20% de suero fetal de ternera (cultivo 372) hubo una alta producción de figuras mitóticas hacia los últimos días de incubación (tabla 5).

Tabla 3. Resultados de la incorporación de timidina ³H en los cultivos 371, 372 y 380 realizados en presencia de solución isotónica salina, misma sol. con 20 % de suero fetal de ternera y misma sol. con 1.4 mM de CaCl₂ respectivamente. Las cosechas se realizaron cada 24 horas.

CULTIVO	INCUBACION (horas)	\bar{x} (dpm)	s	$s\bar{x}$	% \bar{x}	%Control
371	24	500.87	95.87	55.35	11.05	119.4 [±] 13.2
	48	430.07	138.07	79.71	18.53	102.5 [±] 19.0
	C 72	419.42	115.55	66.71	15.90	100.0 [±] 15.9
	96	388.18	44.65	25.78	6.64	92.5 [±] 6.1
372	24	464.79	51.12	29.51	6.35	3.5 [±] 0.22
	48	3528.91	400.28	231.10	7.09	24.6 [±] 1.7
	C 72	13260.11	412.49	238.15	1.79	100.0 [±] 1.8
	96	14085.59	1393.46	804.51	5.71	106.2 [±] 6.1
380	24	399.56	15.52	8.96	2.24	80.6 [±] 1.8
	48	455.98	210.13	121.32	26.61	92.0 [±] 24.5
	C 72	495.54	124.69	71.99	14.53	100.0 [±] 14.5
	96	556.51	151.70	87.58	15.64	112.3 [±] 17.7

\bar{x} promedio n= 3

s desviación estándar

$s\bar{x}$ error estándar

% \bar{x} porcentaje del promedio

% Control porcentaje del control

C control

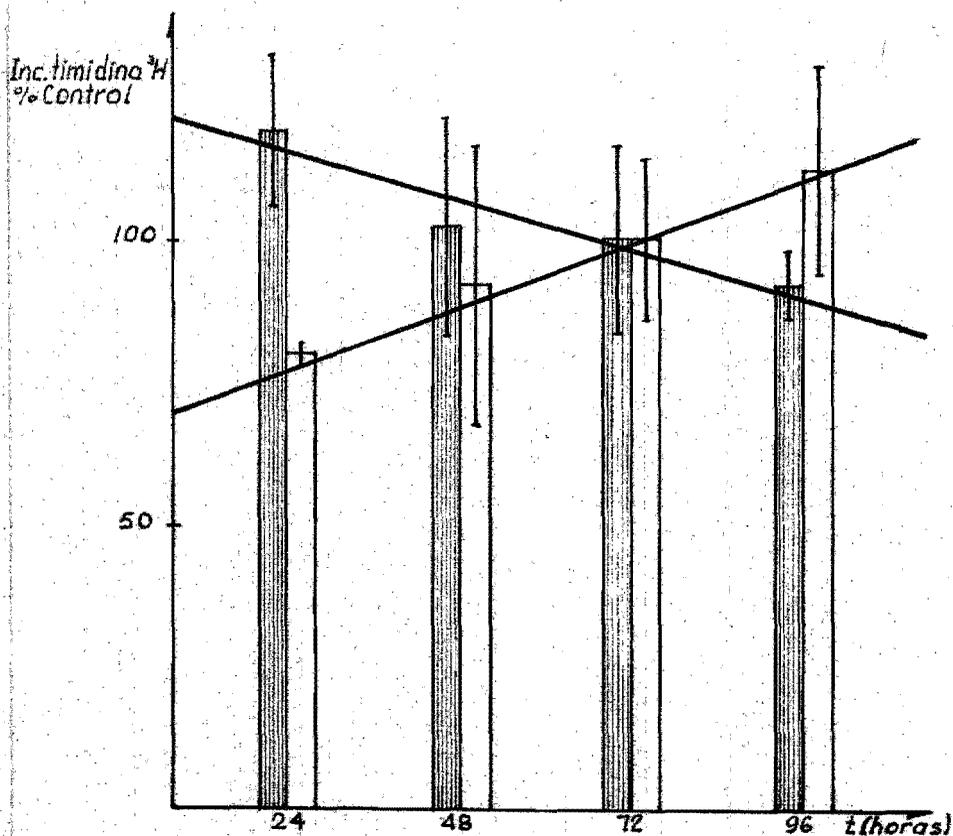


Figura 4. Efecto de una concentración baja de calcio (1.4mM de CaCl_2) en medio carente de nutrientes y suero, en función del tiempo.

- Sol. isotónica salina (cultivo 371)
 100.0 % = 419.42 dpm. $y = -0.35 x + 120.9$
- Sol. isotónica salina + 1.4 mM CaCl_2 (cul. 380)
 100.0 % = 495.54 dpm. $y = 0.429 x + 70.49$

Tabla 4. Valores de p obtenidos al aplicar la prueba de t para comparar los resultados de la incorporación de timidina tritiada entre los cultivos 371 (realizado con solución isotónica salina) y 380 (realizado en presencia de 1.4 mM de CaCl_2). Grados de libertad = 22.

TIEMPO DE INCUBACION (horas)	VALOR DE p
24	< 0.002 *
48	> 0.1
72	< 0.1
96	< 0.01 *

* Dato estadísticamente significativo a $p < 0.05$

Tabla 5. Figuras mitóticas encontradas en el cultivo 372, realizado en presencia de solución isotónica salina al 20% de suero fetal de ternera inactivado, cosechado a diferentes --- tiempos de incubación.

CULTIVO	INCUBACION (horas)	PROFASES	METAFASES	ANAFASES	TELOFASES	TOTAL
372	24	0	0	0	0	0
	48	7	6	2	2	17
	72	61	106	19	17	203
	96	47	136	18	15	216

Cuando el suero está presente (cultivo 372) existe una estrecha relación entre el número de mitosis y la incorporación de timidina tritiada, como se muestra en la figura 5, - es decir, a las 24 horas de cultivo se observa la mínima incorporación de timidina tritiada y no hay figuras mitóticas en las preparaciones; entre las 48 y 72 horas de incubación se disparan ambos mecanismos, lo que se conoce como fase exponencial del cultivo. A las 96 horas, el cultivo ya está en la fase estacionaria y cesa el incremento.

Como se muestra en la tabla 5, el mayor número de figuras mitóticas corresponde al de metafases como era de esperarse después del tratamiento con colcemid.

De acuerdo con éstos resultados, los siguientes cultivos - se cosecharon a las 72 horas de incubación, pues es el tiempo en que se obtiene un buen rendimiento del cultivo y hay suficientes figuras mitóticas analizables.

4.2 Efecto de diferentes concentraciones de calcio

Se probaron diferentes concentraciones de CaCl_2 (2.5, 5.0, 7.5 y 10.0 mM) en cultivos que contenían solución isotónica salina. Como se observa en la tabla 6, éste sistema se repitió tres veces (cultivos 390, 391 y 395) y se encontró un incremento en la incorporación de timidina tritiada a medida -- que se aumentó la dosis de CaCl_2 , como lo muestra la pendiente positiva de la curva correspondiente al cultivo 395 en la figura 6. Al aplicar la prueba de t para comparar el control carente de calcio con cada uno de los tratamientos, se encuentra que hay diferencias significativas sólo en las dosis más altas de CaCl_2 (tabla 7).

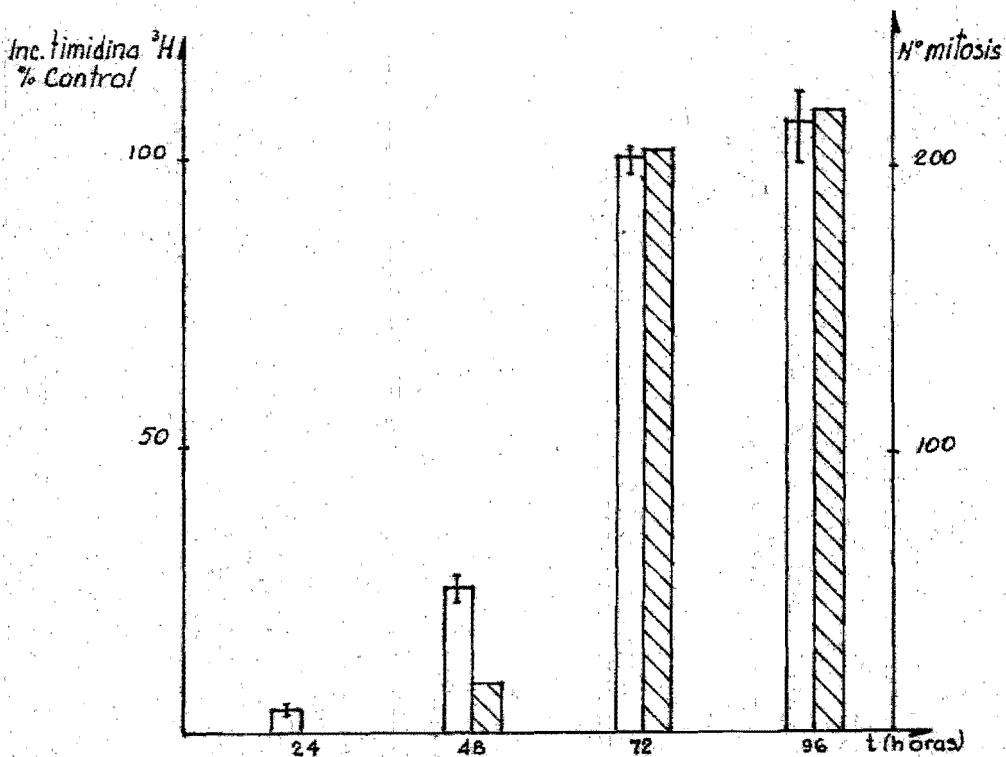


Figura 5. Comparación del porcentaje de la incorporación de timidina tritiada y el número de figuras mitóticas en función del tiempo de incubación, obtenidos en el cultivo 372 realizado en solución isotónica al 20% de suero fetal de ternera.

- Incorporación de timidina tritiada
100.0 % = 13 260.11 dpm
- ▨ Número de mitosis

Tabla 6. Resultados de la incorporación de timidina ³H en los cultivos 390, 391 y 395 (solución isotónica con diferentes concentraciones de CaCl₂) y 402 (medio TC 199 con diferentes conc. de CaCl₂), cosechados a las 72 horas de incubación.

CULTIVO	CaCl ₂ (mM)	\bar{x} (dpm)	s	s \bar{x}	% \bar{x}	% Control
390	0.0	205.59	15.43	8.91	4.33	100.0 [±] 4.3
	2.5	501.36	59.39	29.67	5.92	243.9 [±] 14.4
	5.0	1589.32	1900.25	1097.11	*69.03	773.0 [±] 533.6
	10.0	1233.15	704.64	406.82	32.99	599.8 [±] 197.9
391	0.0	209.40	6.85	3.95	1.88	100.0 [±] 1.9
	2.5	314.00	98.77	69.84	22.24	149.9 [±] 33.4
	5.0	368.59	183.62	129.84	35.22	176.0 [±] 62.0
	10.0	802.26	138.93	80.21	9.99	383.1 [±] 38.3
395	0.0	360.24	39.02	22.52	6.25	100.0 [±] 6.2
	2.5	447.61	128.01	73.91	16.51	124.2 [±] 20.5
	5.0	469.68	106.58	61.53	13.10	130.4 [±] 170.1
	7.5	634.73	182.77	105.52	16.62	176.2 [±] 29.3
	10.0	626.26	157.23	90.78	14.49	173.8 [±] 25.2
402	0.0	80389.89	26714.61	15423.69	19.19	100.0 [±] 19.2
	2.5	59565.07	15098.55	8717.15	14.63	74.1 [±] 10.8
	5.0	63645.62	20262.96	11698.82	18.38	79.2 [±] 14.5
	7.5	64149.59	8092.21	4672.04	7.28	79.8 [±] 5.8
	10.0	58345.78	9939.40	5738.55	9.83	72.6 [±] 7.1

\bar{x} valor promedio n = 3

s desviación estándar

s \bar{x} error estándar

% \bar{x} porcentaje del promedio

% Control porcentaje del control

* Dato no válido estadísticamente (Ongay 1978)

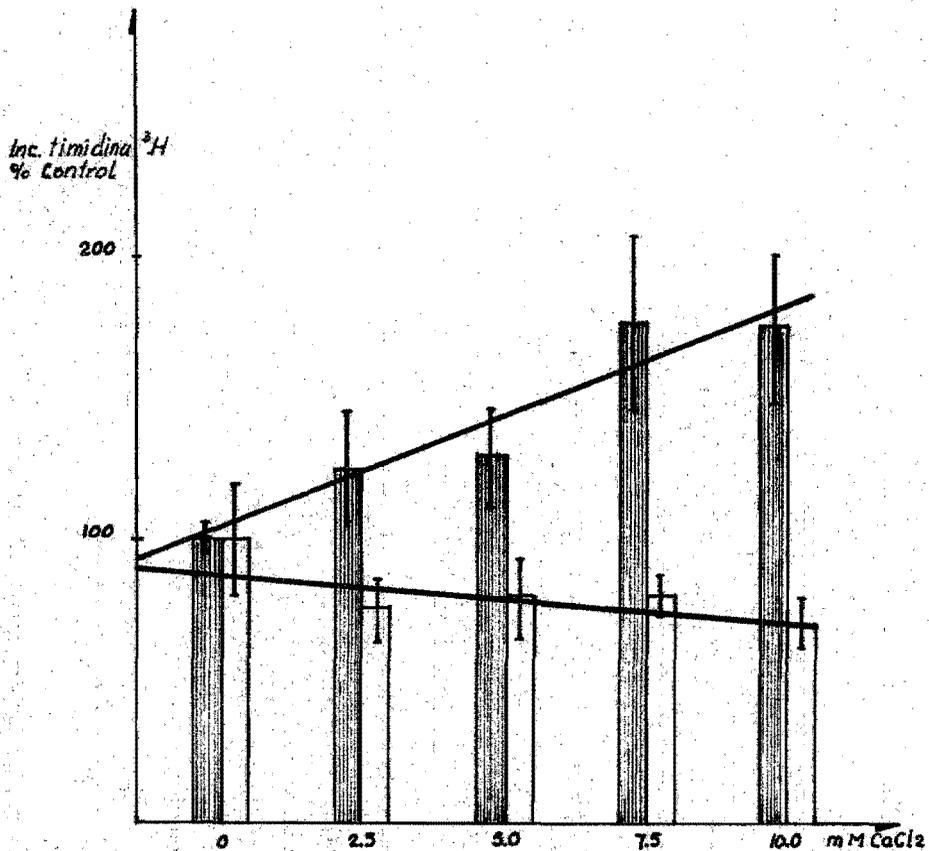


Figura 6. Efecto de diferentes concentraciones de calcio sobre el porcentaje de incorporación de timidina tritiada, en dos medios distintos, a las 72 horas de incubación.

- Sol. isotónica salina (cultivo 395)
 100.0 % = 360.24 dpm $y = 9.92 x + 97.90$
- Medio TC-199 (cultivo 402)
 100.0 % = 80 389.89 dpm $y = -1.96 x + 90.96$



Tabla 7. Valores de p obtenidos al aplicar la prueba de t para comparar los resultados del control con los de cada tratamiento en los cultivos 395 (realizado con solución isotónica salina) y 402 (realizado con medio TC 199). Grados de libertad = 4.

CULTIVO	TRATAMIENTO	VALOR DE p
395	2.5 mM de CaCl_2	> 0.1
	5.0 mM de CaCl_2	> 0.1
	7.5 mM de CaCl_2	< 0.1
	10.0 mM de CaCl_2	< 0.05
402	2.5 mM de CaCl_2	> 0.1
	5.0 mM de CaCl_2	> 0.1
	7.5 mM de CaCl_2	> 0.1
	10.0 mM de CaCl_2	> 0.1

p es la probabilidad de equivocarse al rechazar la H_0 o Hipótesis nula, la cual propone que no hay diferencias significativas entre las muestras.

Tabla 8. Figuras mitóticas encontradas en el cultivo 402 (realizado en presencia de medio TC 199) en las diferentes concentraciones de CaCl_2 , a las 72 -- horas de incubación.

CULTIVO	CaCl_2 (mM)	PROFASIS	METAFASIS	ANAFASIS	TELOFASIS	TOTAL
402	0.0	19	59	8	4	90
	2.5	85	221	34	24	364
	5.0	122	147	3	11	283
	7.5	103	417	44	16	580
	10.0	81	367	37	22	507

En las preparaciones obtenidas de los cultivos con solución isotónica salina y diferentes concentraciones de calcio (390, 391 y 395) no se encontraron figuras mitóticas.

Cuando está presente el medio nutritivo TC-199 (cultivo - 402), la adición de CaCl_2 disminuye aparentemente el número de dpm respecto al control como se puede observar en la tabla 6, sin embargo, al aplicar la prueba de t para comparar el control con cada uno de los tratamientos resultó que no hay diferencias significativas entre ellos (tabla 7).

En las preparaciones de cultivo 402 realizado en presencia de medio nutritivo TC-199, si se obtuvieron figuras mitóticas (tabla 8), correspondiendo la mayoría a metafases, como era de esperarse después del tratamiento con colcemid.

La comparación de dpm y número de figuras mitóticas del cultivo con medio nutritivo (402) se muestra en la figura 7. No existe una relación directa entre el aumento del número de mitosis y la incorporación de timidina tritiada.

La presencia de suero fetal de ternera se probó en el cultivo 405 y se encontró que aún en pequeñas proporciones favorece la incorporación de timidina tritiada, como se muestra en la tabla 9. En las concentraciones más bajas de suero hay poca producción de figuras mitóticas (tabla 10).

La comparación de la incorporación de timidina tritiada y el número de mitosis para cada dosis de suero se muestra en la figura 8 y se observa que hay una estrecha relación entre la cantidad de suero y ambos procesos.

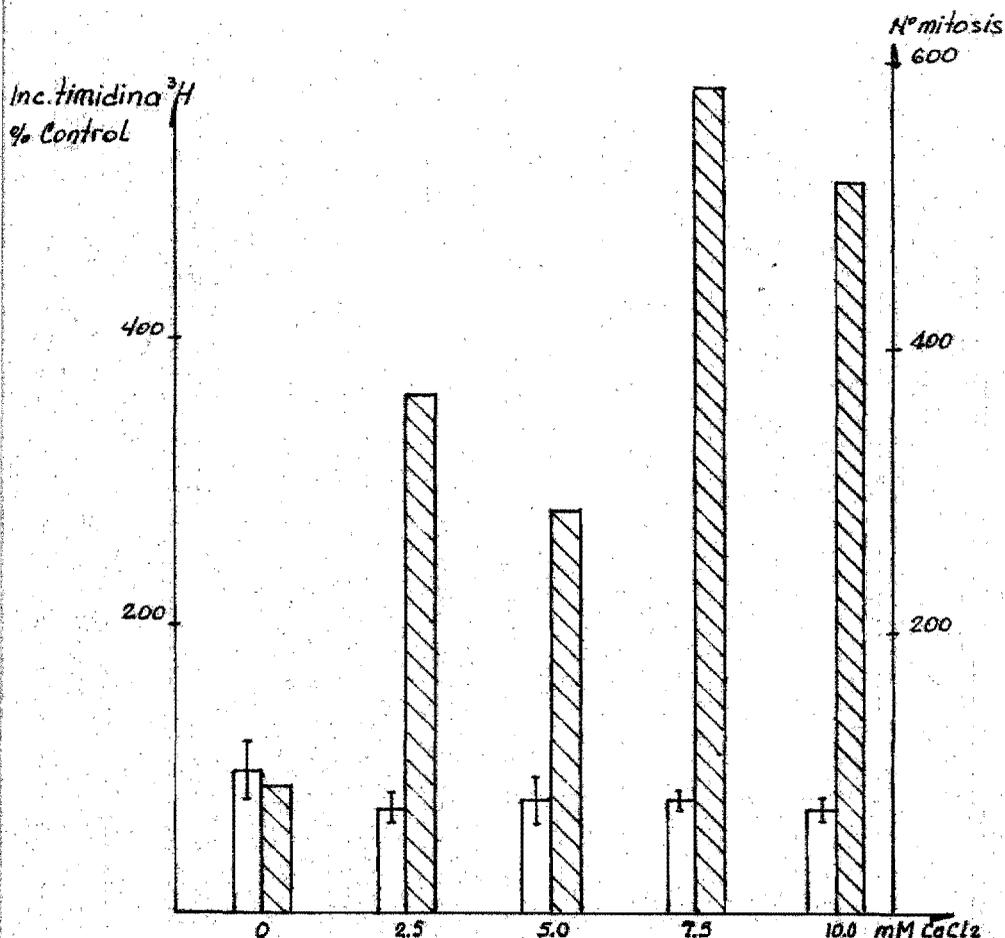


Figura 7. Comparación del porcentaje de la incorporación de timidina tritiada y el número de figuras mitóticas obtenidos en el cultivo 402, realizado en presencia de medio TC-199 y diferentes concentraciones de CaCl_2 , a las 72 horas de incubación.

- Incorporación de timidina tritiada
100.0 % = 80 389.89 dpm
- ▨ Número de mitosis

Tabla 9. Resultado de la incorporación de timidina ³H en el cultivo 405, realizado en presencia de diferentes concentraciones de suero fetal de ternera inactivado y cosechado a las 72 horas de incubación.

CULTIVO	SFT(%)	\bar{x}	s	s \bar{x}	% \bar{x}	% Control
405	0.0	206.76	22.46	12.96	6.27	100.0 \pm 6.3
	1.0	223.79	62.37	36.00	16.09	108.2 \pm 17.4
	5.0	1315.46	366.80	211.77	16.10	636.2 \pm 102.4
	10.0	10633.16	2273.43	1312.56	12.34	5142.7 \pm 634.8
	15.0	8672.68	2216.93	1279.94	14.76	4194.6 \pm 619.0
	20.0	8129.69	2193.66	1266.51	15.58	3931.9 \pm 612.5

SFT suero fetal de ternera inactivado

Tabla 10. Figuras mitóticas encontradas en el cultivo 405 realizado con diferentes concentraciones de suero fetal de ternera inactivado y cosechado a las 72 horas de incubación.

CULTIVO	SFT(%)	PROFASES	METAFASES	ANAFASES	TELOFASES	TOTAL
405	0.0	0	0	0	0	0
	1.0	0	0	0	0	0
	5.0	6	0	0	0	6
	10.0	29	35	3	4	71
	15.0	41	45	5	6	97
	20.0	52	110	5	13	180

SFT Suero fetal de ternera inactivado

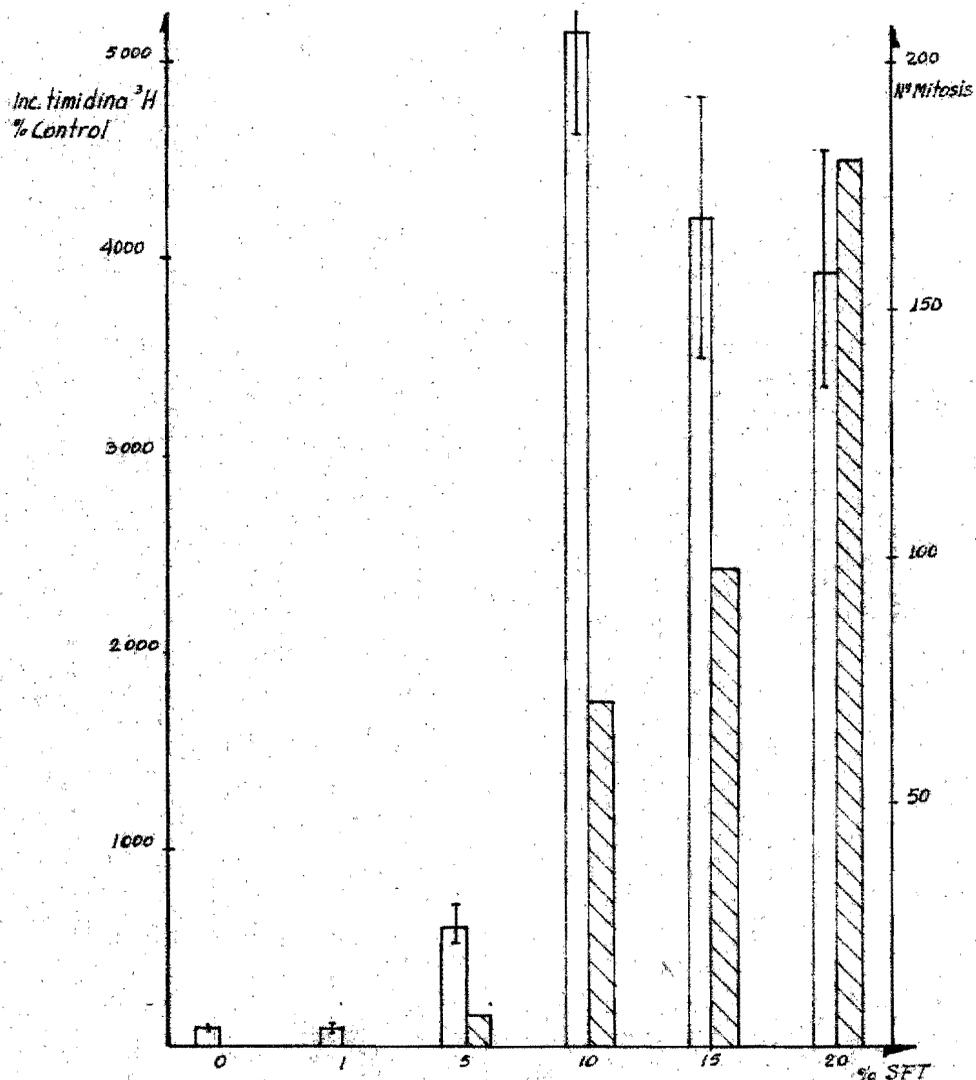


Figura 8. Comparación del porcentaje de la incorporación de timidina tritiada y el número de figuras mitóticas obtenidas en el cultivo 405, realizado en solución isotónica y diferentes concentraciones de suero fetal de terrera y cosechado a las 72 horas de inc.

- Incorporación de timidina tritiada
100.0 % = 206.76 dpm
- ▨ Número de mitosis

Como se muestra en la tabla 10, todas las figuras encontradas en la concentración de 5% de suero fetal de ternera fueron profases mientras que el mayor número de figuras mitóticas se encontró en la mayor concentración de suero (20%).

La concentración de 5% de suero fetal de ternera es crítica ya que determina el punto de subida de incorporación de timidina tritiada y es la mínima para que aparezcan figuras mitóticas en las preparaciones, por lo que en los dos últimos cultivos (406 y 407) se utilizó como medio solución isotónica salina al 5% de suero fetal de ternera inactivado y se probaron 8 dosis de CaCl_2 en un rango desde 0.5 hasta 10mM (tabla 11). En estas condiciones se encontró que la menor concentración de CaCl_2 (0.5 mM) es la mas efectiva para estimular la incorporación de timidina tritiada.

En la figura 9 se puede observar que la presencia de calcio tiene dos efectos: estimulatorio a concentraciones bajas e inhibitorio a concentraciones altas; tanto en la incorporación de timidina tritiada como en el número de figuras mitóticas, los valores son siempre mayores que el control, exceptuando la incorporación de timidina tritiada en la concentración mas alta de calcio.

En la tabla 12 se muestra el número de figuras mitóticas encontradas en cada dosis de CaCl_2 ; el número total es mayor a concentraciones altas pero al normalizar los valores de cada cultivo respecto a su control, éste efecto no es tan marcado. Las diferencias entre los controles carentes de CaCl_2 se pueden deber a diferencias en el rendimiento de los cultivos y/o a que el número inicial de células no fué estrictamente controlado.

Tabla 11. Resultados de la incorporación de timidina ^3H en los cultivos 406 y 407 realizados en presencia de 5% de suero fetal de ternera inactivado y diferentes concentraciones de CaCl_2 , cosechados a las 72 horas de incubación.

CULTIVO	CaCl_2 (mM)	x (dpm)	s	s \bar{x}	% \bar{x}	% Control
406	0.0	12825.51	2927.22	1690.03	13.17	100.0 \pm 13.2
	2.5	25669.64	7869.10	4543.23	17.70	200.1 \pm 35.4
	5.0	21464.26	3362.63	1941.41	9.04	167.4 \pm 15.1
	7.5	14309.93	6109.58	3527.37	24.65	111.6 \pm 27.5
	10.0	10220.24	1632.13	1154.09	11.29	79.7 \pm 8.9
407	0.0	1453.19	127.34	73.52	5.06	100.0 \pm 5.1
	0.5	10971.66	2375.83	1371.69	12.50	755.0 \pm 94.4
	1.0	10244.17	4093.39	2363.32	23.07	704.9 \pm 162.6
	1.5	8641.35	1345.06	776.57	8.99	594.6 \pm 53.4
	2.0	6134.97	1673.61	966.26	15.75	422.2 \pm 66.5

\bar{x} valor promedio

s desviación estándar

s \bar{x} error estándar

% \bar{x} porcentaje del promedio

% Control porcentaje del control

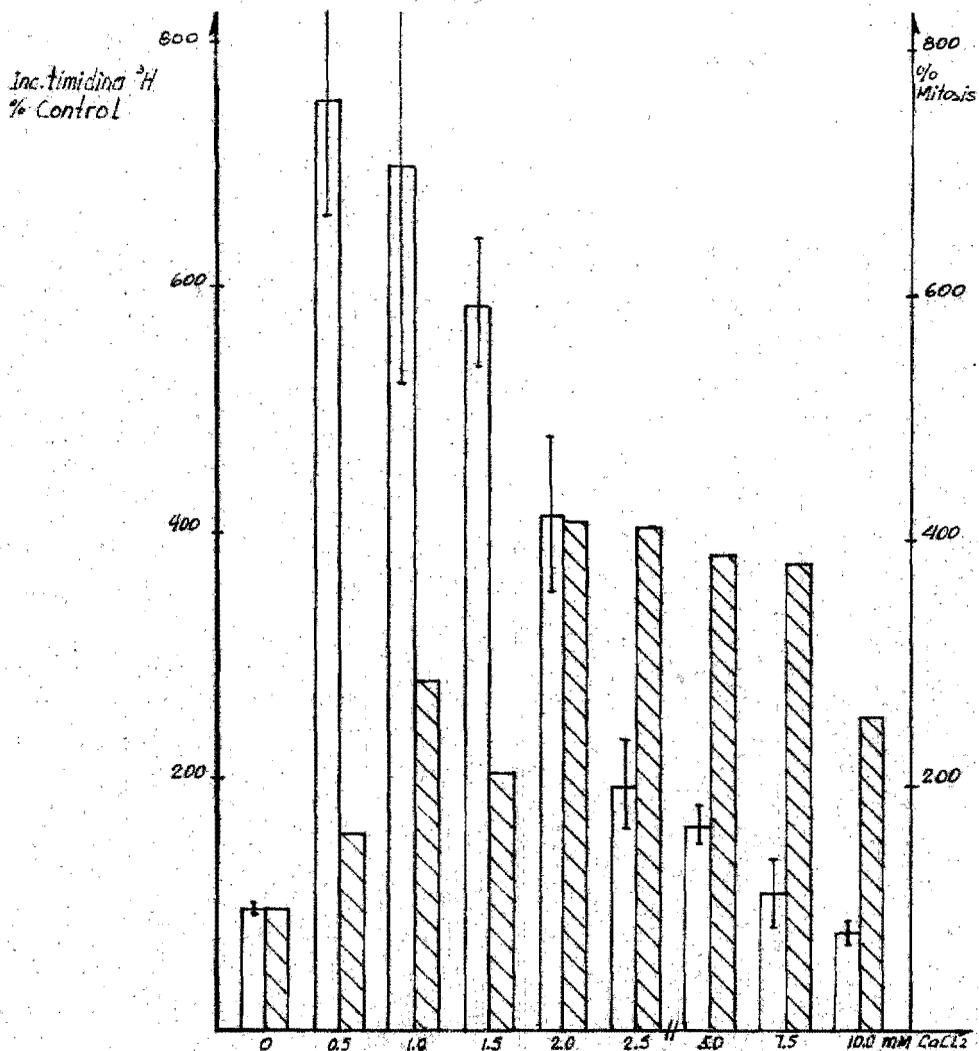


Figura 9. Comparación del porcentaje de la incorporación de timidina tritiada y el número de figuras mitóticas obtenidos en los cultivos 406 y 407, realizados en solución isotónica con 5% de suero fetal de ternera y diferentes concentraciones de CaCl_2 , a las 72 horas de incubación.

□ Inc. de timidina tritiada ▨ Número de mitosis

Cult. 406: 2.5 a 10.0 mM de CaCl_2 . 100.0% = 12825 dpm y 31 mitosis

Cult. 407: 0.5 a 2.0 mM de CaCl_2 . 100.0% = 1453 dpm y 13 mitosis

Tabla 12. Figuras mitóticas encontradas en los cultivos con 5% de suero fetal de ternera inactivado y diferentes concentraciones de CaCl_2 (cultivos 406 y 407) a las 72 horas de incubación.

CULTIVO	CaCl_2 (mM) ²	PROFASES	METAFASES	ANAFASES	TELOFASES	TOTAL	%
406	0.0	9	19	1	2	31	100.0
	2.5	41	62	12	13	128	412.9
	5.0	37	69	9	7	122	393.5
	7.5	23	78	10	7	118	380.6
	10.0	28	35	6	10	79	254.8
407	0.0	6	6	0	1	13	100.0
	0.5	8	10	0	3	21	161.5
	1.0	11	19	3	4	37	284.6
	1.5	13	11	1	2	27	207.7
	2.0	25	22	2	5	54	415.4

En el análisis citogenético no se observaron daños cromosómicos en ninguno de los cultivos.

En la figura 10 se muestran núcleos de linfocitos en diferentes fases del ciclo celular (10a interfase y 10b-10i mitosis) encontrados en las preparaciones fijas.

En la figura 11 se muestran micrografías electrónicas de los linfocitos a las 72 horas de cultivo.

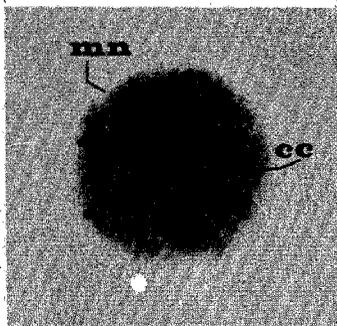


Fig. 10a Núcleo interfásico.
mn: membrana nuclear
cc: cromatina condensada
8750 diámetros

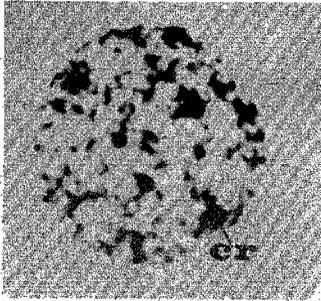


Fig. 10b. Profase temprana
cr: cromocentro
8000 diámetros

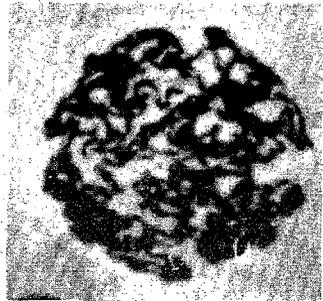


Fig. 10c. Profase tardía
6375 diámetros

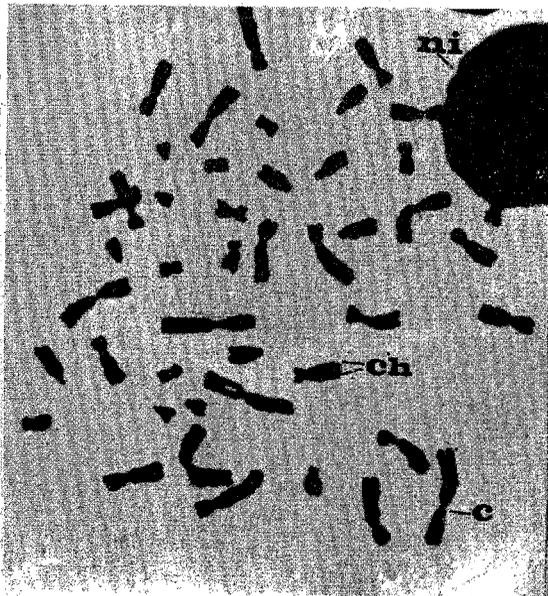


Fig. 10d. Metafase. 6750 diámetros
c: centrómero
ch: cromátidas hermanas de los cromosomas
ni: núcleo interfásico

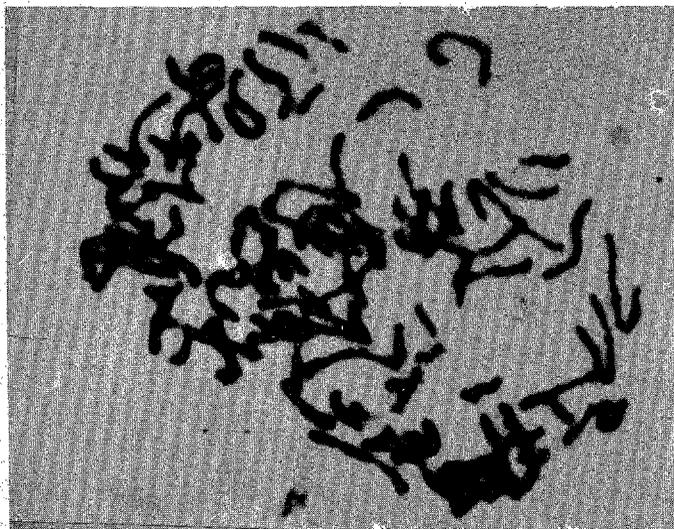


Fig. 10e. Anafase temprana. 8250 diámetros.

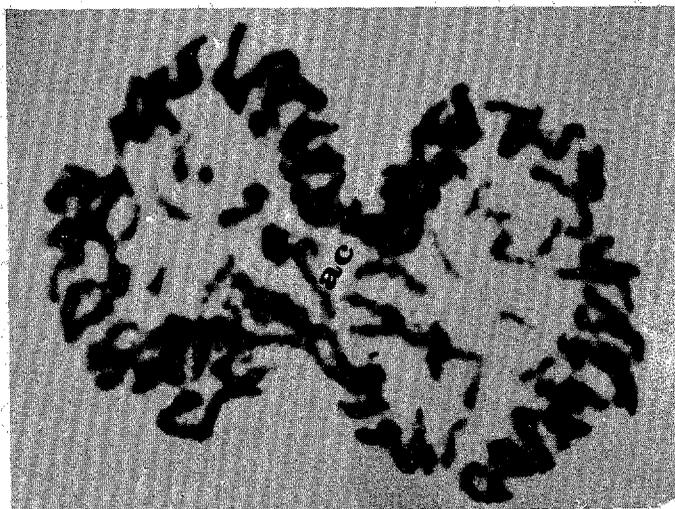


Fig. 10f. Anafase tardía. 9625 diámetros.
ac: zona del anillo de constricción

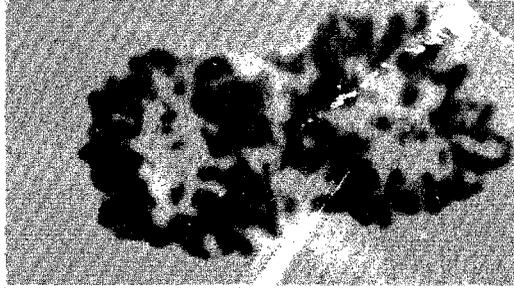


Fig. 10g. Telofase temprana. 9625 diámetros.

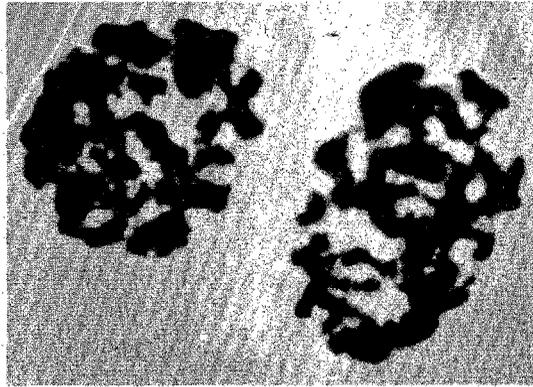


Fig. 10h. Telofase tardía. 8000 diámetros.

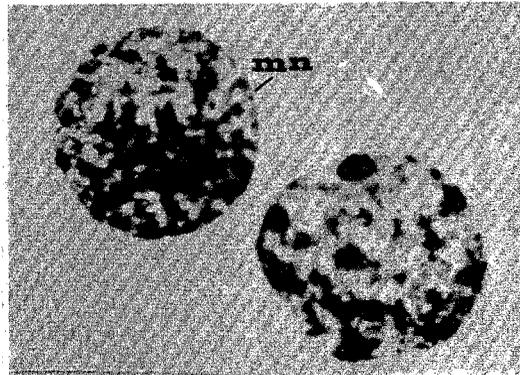


Fig. 10i. Telofase tardía. 9625 diámetros.
mn: membrana nuclear

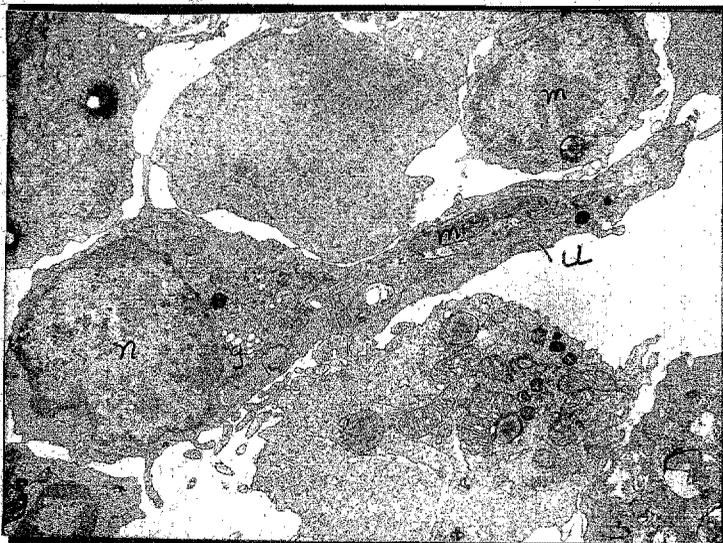


Fig. 11a. Aspecto de un linfocito en cultivo, que no ha sido retado antigénicamente. 7,000 diámetros. g: Aparato de Golgi mi: mitocondria n: núcleo u: urópodo m: muesca del núcleo de otro linfocito

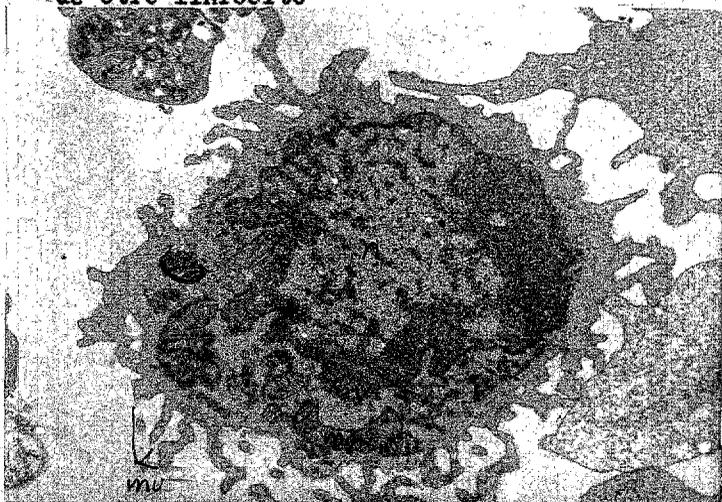


Fig. 11b. Aspecto de un linfocito en cultivo, que ya ha sido retado antigénicamente. 12,000 diámetros. mi: mitocondria mv: microvellosidades de la membrana plasmática n: núcleo

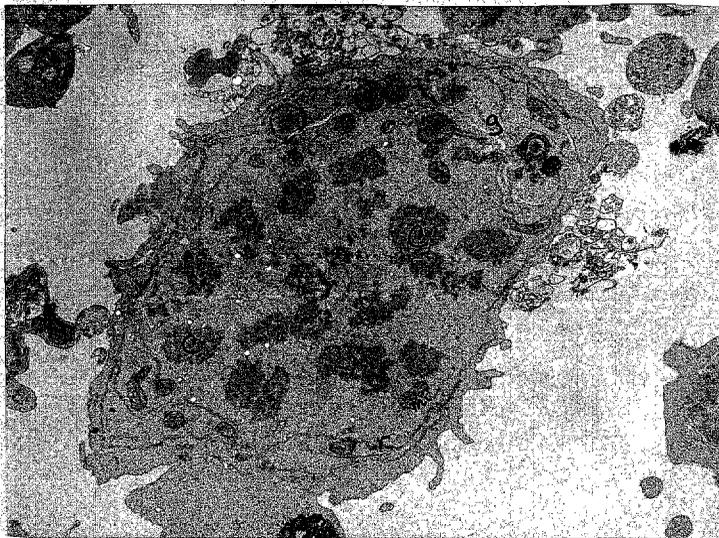


Fig. 11c. Micrografía que muestra a un linfocito en el proceso de mitosis. 9,600 diámetros
c: cortes de cromosomas
g: Aparato de Golgi mi: mitocondria
r: retículo endoplásmico

DISCUSION

La comparación de los cultivos 371 y 380 realizados en un medio compuesto a base de sodio, cloro, agua y en el caso del segundo, calcio, es una prueba clara de que el calcio de alguna manera favorece la fase S del ciclo celular, (fig. 5).

Ha sido muy discutida la relación entre el calcio y el inicio de la respuesta de los linfocitos a la PHA.

Whitney y Sutherland (1973 a) reportaron que el calcio influye en el transporte de aminoácidos, evento importante en el ciclo celular, para que se inicie la síntesis de proteínas algunas de las cuáles son enzimas indispensables en la duplicación del ADN, etc.

Kay (1971) encontró que la adición de EDTA inhibe el enlace de la PHA a la membrana, por lo que es razonable pensar — que el calcio influye en la interacción del mitógeno con la superficie celular. La ventaja de éste modelo es que no se requiere gasto de energía metabólica por parte de los linfocitos para enlazar a la PHA; una vez unida la PHA a la superficie celular, se puede incrementar la permeabilidad a cationes divalentes y a otras moléculas orgánicas pequeñas.

Dado que en los cultivos 371 y 380 se utilizó solución isotónica salina que es un medio carente de aminoácidos, es mas probable que se cumpla la proposición de Kay, es decir, que es necesaria la presencia de calcio para que la PHA se enlace a los receptores de la superficie celular y se inicie así la respuesta, reflejada en un aumento en la incorporación de timidina tritiada aunque debido a la carencia de recursos nutritivos no se llega a la fase M por lo menos hasta las 96 horas en que se estudió.

Dado que en éste sistema no se llegó a la fase M como lo demuestra la ausencia de figuras mitóticas en las preparaciones, se probó un medio mas complejo, aún en ausencia del medio nutritivo es decir, la células se cultivaron en un medio que contenía solución isotónica salina con 20% de suero fetal de ternera (cultivo 372) que es la concentración de suero utilizada en la técnica básica.

Los resultados de dicho cultivo muestran también un incremento en la incorporación de timidina tritiada a medida que transcurre el tiempo, pero en éste sistema las células si -- llegan a la fase mitótica del ciclo celular.

A las 24 horas de incubación hay un mínimo de incorporación de timidina tritiada y no se encuentran mitosis en las preparaciones; a las 48 horas aumenta la incorporación y ya hay figuras mitóticas y entre las 72 y 96 horas se encuentra el máximo de incorporación de timidina tritiada y mitosis -- (fig. 5). Esto concuerda con los trabajos de Aguilar (1977), Ducclomb (1977) y Ongay (1978) realizados con la técnica básica, por lo que se eliminó la posibilidad de hacer un cultivo que contuviera únicamente medio nutritivo sin suero y cosechado a diferentes tiempos de incubación, ya que la curva de crecimiento de la población de linfocitos en estas condiciones debe ser muy semejante a las mencionadas anteriormente.

El incremento de ambos mecanismos, síntesis de ADN y división celular en el tiempo, se explica porque al principio -- hay pocas células estimuladas que comienzan a entrar a la fase S y posteriormente a la fase M; este número aumenta rápidamente en forma exponencial, ya que cada vez hay mas células que están siguiendo el mismo proceso debido a que el es-

tímulo sigue presente, hasta que llega un momento en que la tasa de crecimiento de la población se abate y ésto puede deberse a alguna o a una combinación de las siguientes causas: a) incapacidad intrínseca de las células para seguirse dividiendo b) competencia por los recursos nutritivos c) acumulación de catabolitos en el medio d) degradación o inactivación de la molécula estimuladora (PHA), etc. por lo que bajo éstas condiciones de cultivo la población decae lentamente y desaparece hacia el 14o. día de incubación (Ongay, 1978).

La adición de cantidades conocidas de calcio a los cultivos realizados con la técnica básica, puede ofrecer resultados falsos debido a que no se conocen las interacciones de dicho catión con los componentes del medio y del suero, por ejemplo: precipitación de fosfatos, enlace a proteínas como la albúmina, etc. además de que tanto el medio como el suero contienen una cierta cantidad inicial de calcio (1.2 y 3 mM respectivamente), por lo que en éste trabajo se probaron 3 medios diferentes para estudiar el efecto de diferentes concentraciones de calcio: solución isotónica salina, medio nutritivo TC-199 y suero fetal de ternera inactivado. En éstos experimentos el tiempo de incubación se mantuvo fijo (72 horas) ya que según los cultivos anteriores, el comportamiento de las curvas en el tiempo es semejante, alcanzando el máximo de incorporación y de mitosis entre las 72 y - 96 horas.

En los resultados de éste trabajo se muestra que hubo división celular únicamente cuando estuvo presente el medio nutritivo (cultivo 402) o el suero (cultivos 372 con 20 % SFT, 405 con 5-20 % SFT, 406 y 407 con 5 % SFT).

En los cultivos 390, 391 y 395 que se hicieron en ausencia de medio y de suero con diferentes suplementos de calcio, la respuesta de incorporación de timidina tritiada es pobre cuantitativamente respecto a cuando están presentes el medio nutritivo y/o el suero pero es un sistema que ilustra bien la necesidad de calcio en el medio para que se inicie la síntesis de ADN, ya que la respuesta aumenta a mayor concentración de CaCl_2 .

En el cultivo 402 que contenía medio nutritivo TC-199, la adición de CaCl_2 tuvo poco efecto en la incorporación de timidina tritiada mientras que incrementó hasta seis veces el número de figuras mitóticas a concentraciones altas de calcio, como se observa en la figura 7.

Estos resultados sugieren que se requieren diferentes concentraciones de calcio para estimular los mecanismos de incorporación de timidina y división celular, que además son eventos representativos de diferentes fases del ciclo celular: la incorporación de timidina tritiada es el hecho que marca la fase S mientras que la presencia de figuras mitóticas muestra la fase M del ciclo celular y éstos son procesos separados en el tiempo.

Probablemente el medio TC-199 contiene un nivel de saturación de calcio por arriba del cuál la tasa de síntesis de ADN ya no varía, pero que no alcanza aún para que todas las células que ya han pasado por la fase S lleguen a la fase M.

Las curvas de incorporación de timidina tritiada y número de células en mitosis están desfasadas en el tiempo, es decir, en un medio nutritivo rico en calcio después de una división celular, las células hijas empiezan a tomar calcio y sustancias nutritivas del medio y crecen durante la fase G_1 . --

Cuando la concentración de calcio intracelular respecto al volumen celular llega a un cierto nivel, se dispara el mecanismo de síntesis de ADN o fase S pero las células siguen tomando calcio del medio o liberándolo de pozas intracelulares hasta que llega a un nivel en que se inhibe la síntesis de ADN (fase G₂) y la célula está preparada para entrar a la fase M y dividirse.

Este modelo implica que el calcio está aumentando a través del ciclo celular dado que la entrada de calcio a la célula es de tipo pasivo, y disminuye al término de cada división celular, momento en que la célula puede "decidir" si se diferencia o se divide, según lo propuesto por Berridge (1975).

Con base en los resultados del cultivo 402 realizado con medio nutritivo y tomando en consideración que el suero tiene una concentración normal de calcio disociado, se eliminó la posibilidad de hacer un cultivo con suero al 20% y diferentes aportes de CaCl₂; se optó por probar el efecto de concentraciones menores de suero, siendo ésta una forma de disminuir la concentración inicial de calcio en los cultivos.

Los medios de cultivo de tejido tradicionales contienen 15-20 % de suero desde que históricamente los investigadores encontraron que ese rango de concentración promovía rápidamente el crecimiento de células en cultivo. Existe el problema de que la composición del suero no está bien definida y desde el punto de vista endocrinológico contiene hormonas y otros agentes no hormonales que están presentes en cantidades desconocidas y que de alguna manera ayudan a promover el buen desarrollo de los cultivos (Channing, 1975).

El suero humano normal contiene ciertas fracciones que -

son capaces de estimular y otras que tienen la habilidad de inhibir la respuesta de los linfocitos a la PHA y Con A, -- cuantificada como captación de timidina tritiada (Chase, -- 1972).

El principal componente de la fracción inhibitoria es una alfa glicoproteína que puede enlazarse a las moléculas de - lectina y disminuir así el número de moléculas capaces de - interactuar con la superficie de los linfocitos (Chase, --- 1972).

Gupta y Good (1977) reportan que diferentes concentraciones de alfa-fetoproteína, otra glicoproteína presente en el suero fetal, inhiben la respuesta de los linfocitos a la PHA.

Estas evidencias explican por qué un exceso de suero en - los cultivos resulta inhibitorio. Bonilla et al. (1970) reportan que en presencia de medio TC-199, a una concentración del 30 % de suero fetal de ternera ya no se observan figuras mitóticas en las preparaciones.

Al probar diferentes concentraciones de suero (cultivo -- 405) la máxima incorporación de timidina tritiada se observó en la concentración de 10 % mientras que el mayor número de mitosis se encontró en la concentración de 20 % de suero fetal de ternera inactivado como se muestra en la figura 8.

Como ya se mencionó anteriormente, se escogió la concen-- tración de 5 % de suero fetal de ternera inactivado para pro bar varias dosis de calcio ya que éste era un medio "mínimo" en el que se podía estudiar tanto la fase S como la fase M - del ciclo celular y de haber algún cambio en la respuesta al agregar diferentes cantidades de calcio, dicho efecto se de-

bería exclusivamente a la presencia de dicho catión.

Es obvio que también se hubiera podido encontrar el medio "mínimo" a base de medio nutritivo TC-199 siguiendo el mismo procedimiento, es decir, probando el medio en distintas concentraciones hasta encontrar la mínima para que se dieran si multáneamente las fases S y M pero como se ha visto el suero tiene ciertas características que hacen interesante el estudio de su comportamiento en los cultivos de tejidos.

En presencia de suero fetal de ternera al 5 % (cultivos - 406 y 407) la máxima incorporación de timidina tritiada se encontró en la menor concentración de CaCl_2 (0.5 mM) mientras que el mayor número de mitosis se observó en la concentración de 2 mM como se muestra en la figura 9. Estos resultados mué vamente concuerdan con la idea de que se necesitan diferentes umbrales de calcio para que se lleven a cabo las fases S y M, siendo mayor el de la fase M.

Es importante hacer notar que existen evidencias (Bernheim et al., 1978; Rogers et al., 1972) de que gran parte del ADN sintetizado después de la estimulación mitogénica, se excreta al medio y de las células que entran a fase S menos del 40 % se dividen. Además el tamaño de la respuesta en la incorporación de timidina tritiada en células estimuladas puede depender de cuan largo sea el pulso de timidina, es decir, de cuan to tiempo estuvo presente la molécula radiactiva en el cultivo antes de iniciar la cosecha.

Tomando en consideración que los cultivos realizados en és te trabajo no son sincronizados es decir, que no todas las cé lulas están en la misma fase del ciclo celular en el momento de la siembra puesto que algunas pueden haber sido retardadas an

tigénicamente en el torrente sanguíneo de los donadores, y - que la duración del ciclo celular de las células de mamífero es aproximadamente de 20 horas, se utilizó un pulso de 15 horas de timidina tritiada en todos los experimentos.

La mayoría de las células de mamífero en cultivo de tejidos son incapaces de crecer en un medio que contenga aminoácidos, vitaminas y glucosa a menos que se les añada suero. Cada tipo celular requiere una mezcla específica de hormonas y factores de crecimiento para que se inicie la síntesis de ADN (Hayashi y Sato, 1976). Por ejemplo, la iniciación de la síntesis de ADN en las células 3T3 se puede controlar por la concentración de diferentes nutrientes de bajo peso molecular presentes en el medio y por factores del suero (Paul et al., 1971).

La limitación de ciertos nutrientes "reguladores" en el medio conduce a las células a permanecer en la fase G_0 ó G_1 del ciclo celular. Holley y Kiernan (1974) encontraron por el método de microfluorometría que cuando las células 3T3 son sometidas a un exceso de suero y bajas concentraciones de aminoácidos, glucosa o ión fosfato, se quedan en el inicio de la fase G_1 y la síntesis de ADN se inicia hasta que la concentración del factor limitante se incrementa. En un medio carente de aminoácidos las células 3T3 permanecen en la fase G_0 y el paso hacia la fase S sólo se logra cuando se añaden cistina y glutamina al medio, indicando que éstos dos aminoácidos son indispensables para el inicio de la síntesis de ADN en éstas células.

Paul y Walter (1975) encontraron que las células fetales de hígado de rata en un medio libre de suero, pueden sintetizar ADN cuando se les añade una alta concentración de ar-

ginina. Cuando el medio contiene bajos niveles de arginina no se induce la proliferación celular a menos que el suero - esté presente. Estos resultados sugieren que en las células fetales de hígado de rata los factores de crecimiento presentes en el suero estimulan la captación de arginina hasta que el nivel intracelular es suficiente para iniciar la síntesis de ADN.

Según los resultados de éste trabajo, la incorporación de timidina tritiada en los linfocitos estimulados por PHA en un medio carente de medio nutritivo y suero, aumenta cuando está presente el calcio. Sería interesante saber si la glutamina, que es un aminoácido que se mantuvo constante en todos los cultivos, es un factor limitante como lo es junto con la cistina para las células 3T3 o la arginina para los hepatocitos de rata, en el inicio de la síntesis de ADN. De ser ésto verdadero habría que estudiar la relación entre la presencia de glutamina con la de calcio.

La técnica de microscopía electrónica es una buena herramienta para detectar cambios morfológicos de las células debidos a la presencia de diferentes elementos en los cultivos por lo que sería interesante comparar el aspecto de los linfocitos cultivados en los diferentes medios. Así por ejemplo, se esperaría la producción de estructuras autofágicas en las células carentes de recursos nutritivos, etc.

CONCLUSIONES

a) Se requieren diferentes concentraciones de calcio para que se inicien la síntesis de ADN o fase S y la división mitótica o fase M del ciclo celular, en los linfocitos estimulados por PHA.

b) En una concentración baja de calcio (1.4 mM de CaCl_2), en suero fetal de ternera inactivado al 20% y en medio nutritivo TC-199 con 20% de suero fetal de ternera inactivado, el máximo de la incorporación de timidina tritiada se alcanza entre las 72 y 96 horas de incubación a 37°C.

c) En un medio carante de nutrientes y suero, la incorporación de timidina tritiada por los linfocitos estimulados por PHA es dependiente de la concentración de calcio en el medio.

d) La división mitótica de los linfocitos estimulados por PHA solamente se realiza cuando está presente el suero y/o el medio nutritivo en los cultivos.

e) Cuando está presente el medio nutritivo TC-199, la respuesta en la incorporación de timidina tritiada por linfocitos estimulados por PHA, es independiente de la concentración de calcio en el medio mientras que la división mitótica se favorece a concentraciones altas.

f) La incorporación de timidina tritiada y el número de células en mitosis, son dependientes de la concentración de suero fetal de ternera presente en el medio.

g) En una concentración "crítica" de suero fetal de ternera inactivado (5 %), la incorporación de timidina tritiada y el número de células en mitosis son dependientes de la concentración de calcio en el medio.

h) El efecto del calcio sobre la división mitótica de los linfocitos humanos in vitro puede estar dado a diversos niveles:

- enlace del agente mitógeno a la membrana plasmática
- permeabilidad de la membrana plasmática
- activación y regulación de diversas enzimas
- regulación de nucleótidos cíclicos
- ensamble de microtúbulos y microfilamentos
- regulación del funcionamiento mitocondrial
- interacción de los elementos del medio

B I B L I O G R A F I A

- Abell, C. W. y Monahan, T. M. 1973. The role of adenosine 3' 5'-cyclic monophosphate in the regulation of mammalian cell division. *The Journal of Cell Biology*. 59: 549-558.
- Aguilar, M. A. 1977. Estudio del ciclo celular del linfocito humano mediante la incorporación de timidina tritiada in vitro. Tesis profesional. Facultad de Ciencias. U.N.A.M.
- Alford, R. H. 1970. Metal cation requirements for phytohemagglutinin-induced transformation of human peripheral blood lymphocytes. *The Journal of Immunology*. 104 (3): 698-703.
- 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. *Journal of Immunology*. 120 (3): 955-962.
- Berridge, M. J. 1975. Control of cell division: a unifying hypothesis. *Journal of Cyclic Nucleotide Research*. 1: 305-320.
- Bonilla, M., Benítez, M. T., León-Cázares, J. M. 1970. Comportamiento de linfocitos humanos en cultivo. I.- Cinco modificaciones a la técnica convencional. *Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural*. Tomo XXXI : 339-347.
- Borle, A. B. 1973. Calcium metabolism at the cellular level. *Federation Proceedings*. 32 (9): 1944-1950.

- Bourne, H. R., Lichtenstein, L. W., Melmon, K. I., Henney, G. S., Weinstein, Y., Shearer, G. M. 1974. Modulation of inflammation and immunity by cyclic AMP. *Science*. 184: 19-28.
- Brennan, J. K., Mansky, J., Roberts, G., Lichtman, M. A. - 1975. Improved methods for reducing calcium and magnesium concentrations in tissue culture medium: application to studies of lymphoblast proliferation in vitro. *In Vitro*. 11 (6): 354-360.
- Burnet, F. M. 1976. *Immunology. Readings from Scientific American*. W. H. Freeman and Company. San Francisco.
- Burström, H. G. 1968. Calcium and plant growth. *Biol. Rev.* 43: 287-316.
- Cauldwell, Ch. B., Henkart, P., Humphreys, T. 1973. Physical properties of sponge aggregation factor. A unique proteoglycan complex. *Biochemistry*. 12: 3051-3055.
- Coffey, R. G., Hadden, E. M., Hadden, J. W. 1977. Evidence for cyclic GMP and calcium mediation of lymphocyte activation by mitogens. *The Journal of Immunology*. 119 (4): 1387-1394.
- Continho, A., Gronowicz, E., Möller, 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. Nueva York. pp. 213-227.
- Channing, C. P., Ledwitz-Rigby, F. 1975. Methods for assessing hormone-mediated differentiation of ovarian cells in culture and in short-term incubations. En: *Methods in Enzymology*. Vol. 39 Hormone action. Parte D. (Ed. J. G. Hardman y B. W. O'Malley). Academic Press. Nueva York. pp. 183-237.
- Chase, P. S. 1972. The effects of human serum fractions of phytohemagglutinin and concanavalin A- stimulated human lymphocyte cultures. *Cell. Immun.* 5: 544-554.
- 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 ce). Academic Press. Nueva York. pp. 339-361.

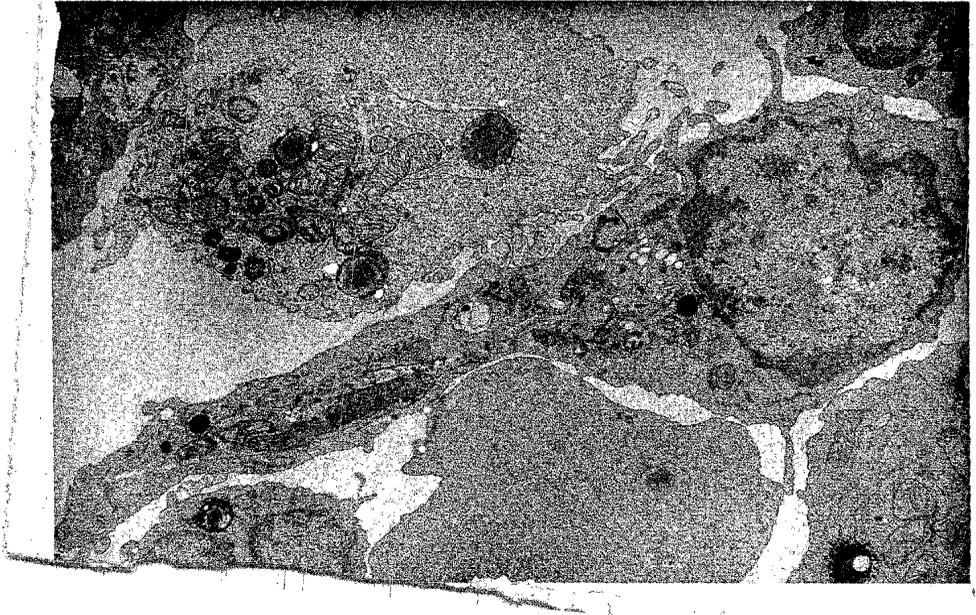
- De Rubertis, F. R., Zenser, T. V., Adler, W. H., Hudson, T. 1974. Role of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in lymphocyte mitogenesis. *The Journal of Immunology.* 113 (1): 151-161.
- Douglas, W. W. 1975. Calcium Transport in Secretion and Contraction. Ed. E. Carafoli, F. Clementi, W. Drabikowski, A. Margreth. Amsterdam. pp. 167-174.
- Ducolomb, Y. C. 1977. Estudio del ciclo mitótico del linfocito humano "in vitro". Tesis profesional. Facultad de Ciencias. U.N.A.M.
- Dyson, R. D. 1976. Cell Biology. A Molecular Approach. 5a. Edición. Cap. 9: Cellular replication and its control. Allyn and Bacon Inc. Boston. pp. 701.
- Faguet, G. B. 1977. Mechanisms of lymphocyte activation. *The Journal of Biological Chemistry.* 252 (6): 2095-2100.
- Forteza, G. 1964. Atlas of Blood Cytology. Toray. U.S.A.
- Freedman, M. H., Raff, M. C., Gomperts, B. 1975. Induction of increased calcium uptake in mouse T lymphocytes by concanavalina A and its modulation by cyclic nucleotides. *Nature.* 255: 378-382.
- Fujiwara, K., Pollard, T. D. 1976. Fluorescent antibody localization of miosin in the cytoplasm, cleavage furrow and mitotic spindle of human cells. *The Journal of Cell Biology.* 71: 848-875.
- Gupta, S., Good, R. A. 1977. alfa-Fetoprotein and human lymphocyte subpopulations. *The Journal of Immunology.* 118 (2): 405-408.
- 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. USA.* 69(10): 3024-3027.
- Hayashi, I., Sato, G. H. 1976. Replacement of serum by hormones permits growth of cells in a defined medium. *Nature.* 259: 132-134.

- Heilbrunn, L. V. 1956. The Dynamics of Living Protoplasm. Academic Press. Nueva York. pp. 327.
- Holley, R. W., Kiernan, J. A. 1974. Control of the initiation of DNA-synthesis in 3T3 cells: low-molecular-weight nutrients. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 71(8): 2942-2945.
- Huxley, H. E. 1976. The regulation of muscle function by the tropomyosin-troponin system. En: The Structural Basis of Membrane Function. (Ed. Y. Hatefi y L. Djavadi-Ohanian). Academic Press. Nueva York. pp. 313-327.
- Kakiuchi, S., Yamazaki, R., Teshima, Y., Uenishi, K., Miyamoto, E. 1975. Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterase activities from rat tissues and occurrence of a calcium-plus-magnesium-ion-dependent phosphodiesterase and its protein activator. Biochem J. 146: 109-120.
- Kay, J. E. 1971. Interaction of lymphocytes and phytohemagglutinin: inhibition by chelating agents. Exptl. Cell. Res. 68: 11-16.
- Kelly, J. P., Wedner, H. J., Parker, Ch. W. 1977. Mitogenic receptors on human peripheral blood lymphocytes: the interaction of Phaseolus vulgaris erythroagglutinating - phytohemagglutinin and anti-thymocyte globulin on the human peripheral blood lymphocyte membrane. The Journal of Immunology. 118 (6): 2213-2220.
- Kretsinger, R. H. 1976. Calcium-binding proteins. Annual Review of Biochemistry. 45: 239-266.
- Larsen, B., Heron, I. 1978. Modification of lymphocyte response to phytomitogens by polycations and polyanions. Experientia. 34: 1224-1226.
- Lazarides, E., Revel, J. P. 1979. The molecular basis of cell movement. Sci. Am. 240 (5): 88-100.
- Lehninger, A. L. 1974. Role of phosphate and other proton-donating anions in respiration-coupled transport of Ca^{++} by mitochondria. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 71 (4): 1520-1524.
- Lehninger, A. L. 1976. Biochemistry. 2a. Ed. Worth Publishers Inc. Nueva York. pp. 1104.
- Lerner, R. A., Dixon, F. J. 1973. The human lymphocyte as an experimental animal. Sci. Am. 228 (6): 82-91.

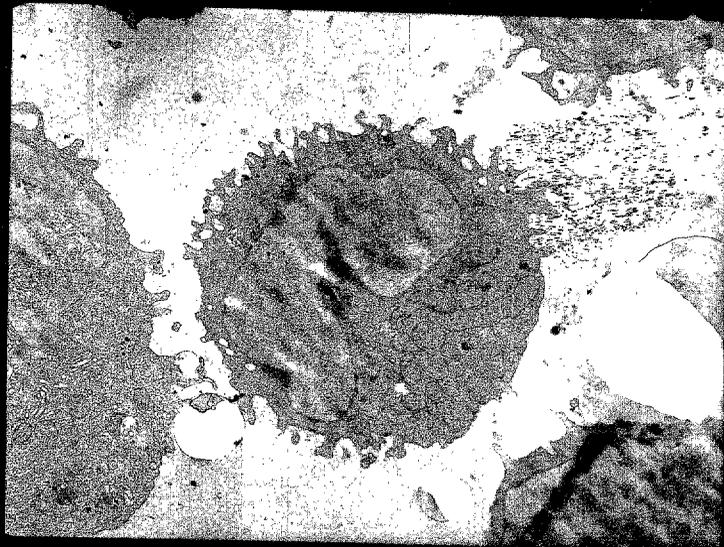
- Lindshl-Kiessling, K. 1972. Mechanism of phytohemagglutinin (PHA) action. V. PHA compared with Concanavalin A -- (Con A). *Exp. Cell Res.* 70: 17-26.
- Lowenstein, W. R. 1970. Intercellular communication. *Sci. Am.* 222 (5): 78-86.
- Maino, V. G., Green, N. M., Crumpton, M. J. 1974. The role of calcium ions in initiating transformation of lymphocytes. *Nature.* 251: 324-327.
- Margalef, R. 1977. *Ecología*. 2a. Edición. Ed. Omega. Barcelona. pp. 951.
- 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 differentiation function in eukaryote cells. (Ed. G. P. Taylor). Raven Press Pub. Nueva York. pp. 207-211.
- Metcalfe, J. C., Bennett, J. P., Hesketh, T. R., Houslay, M. D., Smith, G. A., Warren, G. R. 1976. The lateral organization of lipids around a calcium transport protein: evidence for a phospholipid annulus that modulates function. En: The structural basis of membrane function. (Ed. Y. Hatefi y L. Djavadi-Ohanian). Academic Press. Nueva York. pp. 57-67.
- Moorhead, P. S., Nowell, P. C., Mellman, W. J., Battips, D. M., Hungerford, D. A. 1960. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Experimental Cell Research.* 20: 613-616.
- Nathanson, J. A., Greengard, P. 1977. "Second messengers" in the brain. *Sci. Am.* 237 (2): 108-119.
- Novogrodsky, A. 1974. Potentiation of phytomitogens action by neuraminidase and basic polypeptides. *Nature.* 250: 788-790.
- Ongay, M. I. 1978. Modelo experimental del desarrollo de una población de linfocitos humanos in vitro. Tesis profesional. Facultad de Ciencias. U.N.A.M.
- Parker, Ch. W. 1974. Correlation between mitogenicity and stimulation of calcium uptake in human lymphocytes. *Biochem. and Biophys. Res. Com.* 61 (4): 1180-1186.
- Parker, R. E. 1976. Estadística para biólogos. Cuadernos de Biología. Ed. Omega. Barcelona. pp. 136.

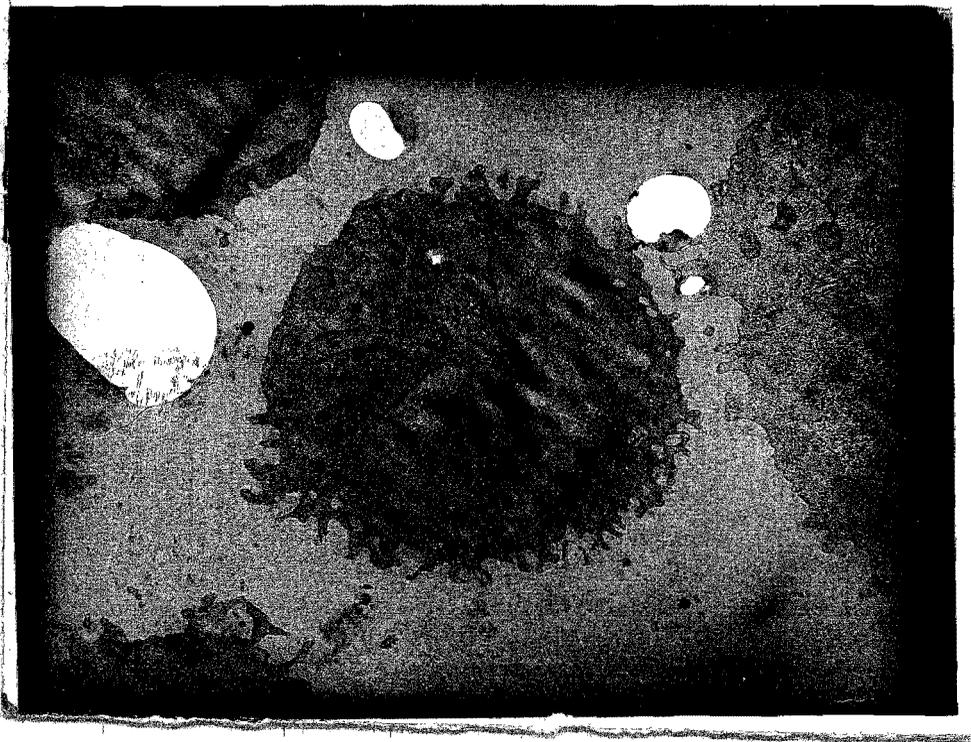
- Pastan, I. 1972. Cyclic AMP. *Sci. Am.* 227 (2): 97-105.
- Paul, D., Lipton, A., Klinger, I. 1971. Serum factor requirements of normal and simian virus 40-transformed 3T3 mouse fibroblasts. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 68 (3): 645-648.
- Paul, D., Walter, S. 1975. Growth control in primary fetal - rat liver cells in culture. *J. Cell. Physiol.* 85: 113-123.
- Rasmussen, H. 1970. Cell communication, calcium ion, and cyclic adenosine monophosphate. *Science.* 170: 404-412.
- Reville, W. J., Goll, D. E., Stromer, M. H., Robson, R. M., Dayton, W. R. 1976. A Ca^{2+} activated protease possibly involved in myofibrillar protein turnover. *The Journal of Cell Biology.* 70:1-8.
- Ringer, S. 1882. A further contribution regarding the influence of the different constituents of the blood on the contraction of the heart. *J. Physiol.* 4: 29-42.
- 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. USA.* 69: 1685-1689.
- Schliwa, M. 1976. The role of divalent cations in the regulation of microtubule assembly. *The Journal of Cell Biology.* 70: 527-540.
- Sharon, N. 1977. Lectins. *Sci. Am.* 236 (6): 108-119.
- Sluder, G. 1976. Experimental manipulation of the amount of tubulin available for assembly into the spindle of dividing sea urchin eggs. *The Journal of Cell Biology.* 70: 75-85.
- Smith, J. W., Steiner, A. L., Newberry, M. Jr., Parker, Ch. W. 1971 a. Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in human lymphocytes. Alterations after phytohemagglutinin stimulation. *The Journal of Clinical Investigation.* 50: 432-441.
- Smith, J. W., Steiner, A. L., Parker, Ch. W. 1971 b. Human lymphocyte metabolism. Effects of cyclic and noncyclic nucleotides on stimulation by phytohemagglutinin. *The Journal of Clinical Investigation.* 50: 442-448.

- Sutherland, E. W. 1972. Studies on the mechanism of hormone action. *Science*. 177: 401-408.
- Taylor, W. G., Evans, V. J. 1973. Preparation and use of replicate mammalian cell cultures. In: *Tissue Culture Methods and Applications*. (Ed. P. F. Kruse y M. R. Patterson Jr.) Cap. 4. Academic Press. Nueva York.
- Watson, J. 1975. The influence of intracellular levels of cyclic nucleotides on cell proliferation and the induction of antibody synthesis. *J. Exp. Med.* 141: 97.
- Weinstein, Y., Chambers, D. A., Bourne, H. R., Melmon, K. L. 1974. Cyclic GMP stimulates lymphocytes nucleic acid synthesis. *Nature*. 251: 352-353.
- Wessells, N. K. 1971. How living cells change shape. *Sci. - Am.* 225 (4): 76-82.
- Whitney, R. B., Sutherland, R. M. 1972 a. Enhanced uptake of calcium by transforming lymphocytes. *Cellular Immunology*. 5: 137-147.
- Whitney, R. B., Sutherland, R. M. 1972 b. Requirements for calcium ions in lymphocyte transformation stimulated by phytohemagglutinin. *Journal of Cellular Physiology*. 80: 329-337.
- Whitney, R. B., Sutherland, R. M. 1973 a. Effects of chelating agents on the initial interaction of phytohemagglutinin with lymphocytes and the subsequent stimulation of aminoacid uptake. *Biochimica et Biophysica Acta*. 298: 790-797.
- Whitney, R. B., Sutherland, R. M. 1973 b. Characteristics of calcium accumulation by lymphocytes and alterations in the process induced by phytohemagglutinin. *Journal of Cellular Physiology*. 82 (1): 9-20.
- Zeilig, Ch. E., Goldberg, N. D. 1977. Cell-cycle-related changes of 3',5' cyclic GMP levels in Novikoff hepatoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 71 (3): 1052-1056.



30016





4. 30 0186

