

23. 11. 4

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE CIENCIAS

COMPORTAMIENTO DE CELULAS EN CULTIVO .  
EFECTO DE LA 6-FURFURILAMINOPURINA SOBRE LA  
CAPACIDAD DE RESPUESTA A LA FITOHEMAGLUTINI  
NA DE LOS LINFOCITOS *in vitro*.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE :

B I O L O G O

PRESENTA

*SAUL HERNAN AGUILAR OROZCO*

MEXICO, D. F., JUNIO DE 1982.



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.

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN

## RESUMEN

Borek y colaboradores, en 1977, reportaron que en humanos que padecen de algún tipo de cáncer, hay una excreción exagerada de una base púrica modificada, la N<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>-dimetilguanosina, proveniente del rompimiento de moléculas de ARN de transferencia; en individuos normales la excreción es de 2 mg, mientras que en los pacientes de cáncer es de 20 mg. Según Horgan (1978), esta molécula es una citocinina, un tipo de reguladores del crecimiento de los vegetales.

Utilizando el cultivo de linfocitos de humano y borrego, encontramos que la presencia en el medio de -- cultivo de una citocinina, la cinetina, inhibe la capacidad de respuesta de estas células a un antígeno inespecífico como la fitohemaglutinina.

El crecimiento de los linfocitos in vitro fue inhibido en diferentes grados en un intervalo de concentraciones de cinetina de 10 a 500 micromolar.

## INDICE

	Página
1. INTRODUCCION	1
- Comunicación	1
- Hormonas	6
- Citocininas	10
- Interacción de mediadores	19
- Linfocitos	21
- Animales y citocininas	23
2. MATERIALES Y METODOS	25
- Selección de concentraciones de cinetina	25
- Obtención de linfocitos para cultivo	26
- Medio de cultivo	26
- Siembra	27
- Incorporación de timidina tritiada	28
- Cosecha	28
- Procesamiento de los datos	30
3. RESULTADOS	33
4. DISCUSION	62
5. BIBLIOGRAFIA	74

\*\*\*\*\*

## 1. INTRODUCCION.

El trabajo que se presenta a continuación, tiene como marco de referencia los fenómenos de la comunicación, y está enfocado específicamente al nivel de la comunicación celular.

Dentro de ésta, los aspectos estudiados son dos formas de comunicación: la hormonal y la inmune y, pues to que se trata con hormonas de origen vegetal probadas en un cultivo de células de animales, los linfocitos, - será necesario revisar, además del concepto de comunicación y los sistemas implicados, el concepto de hormona, según se entiende dentro del campo de la fisiología animal y vegetal, algunas interacciones de estos mediadores en diferentes sistemas y las características de los linfocitos.

Por otra parte, se hace una revisión acerca de -- las citocininas, su papel dentro de la fisiología de -- las plantas, su posible origen y formas de acción y su estructura.

Todo esto con el objeto de tratar de comprender - de que manera, la presencia de una citocinina, la cine- tina, modifica la capacidad de respuesta de los linfocitos cultivados, cuando son estimulados por un antígeno inespecífico como la fitohemaaglutinina.

### Comunicación.

Desde hace medio siglo, Alexis Carrel propuso que para entender a la célula, había de estudiarse tomando en cuenta su medio ambiente, ya que influye directamente en los diversos procesos que la célula lleva a cabo. La relación, decía, es recíproca, pues ésta, al realizar sus actividades, modifica a su vez su entorno ---- (Carrel, 1931).

Entendiendo a la célula y a su medio como una unidad, se puede conocerla mejor. Por lo tanto, cuando se experimente con ella, se debe tratar de proporcionarle un medio lo más cercano al natural.

La unidad célula-medio, incorpora a la biología y en especial a la biología celular, un concepto importante en extremo: la comunicación. Proceso entendido como un flujo de información constante y recíproco.

Shannon (1948, citado en Pierce, 1972), en su Teoría Matemática de la Comunicación propone el esquema -- que se muestra en la figura 1, en el cual, tratándose de seres vivos, el transmisor y el receptor son siempre los propios organismos, sea cual sea su nivel de complejidad.

Sin embargo, para que este proceso funcione como una verdadera comunicación y no sólo como un flujo de información unidireccional, es necesario que el destinatario se convierta a su vez en fuente de información, -- es decir, que la recepción de un mensaje provoque una reacción.

De acuerdo a Wiener (1948, citado por Pierce, --- 1972), la comunicación tanto entre los organismos como entre los sistemas, es parte fundamental de los procesos de regulación u homeostasis; concepto que involucra dos eventos, la detección de un estado diferente al normal y el retorno, si nó al estado original, sí a uno -- nuevo más o menos adecuado, por medio de una retroalimentación negativa.

En síntesis, es gracias a la capacidad de comunicación, que un ser vivo puede "darse cuenta" de las condiciones que privan en su medio ambiente, por la facultad que tiene de percibir señales, y es la comunicación misma, la que le permite responder de una forma adecua-

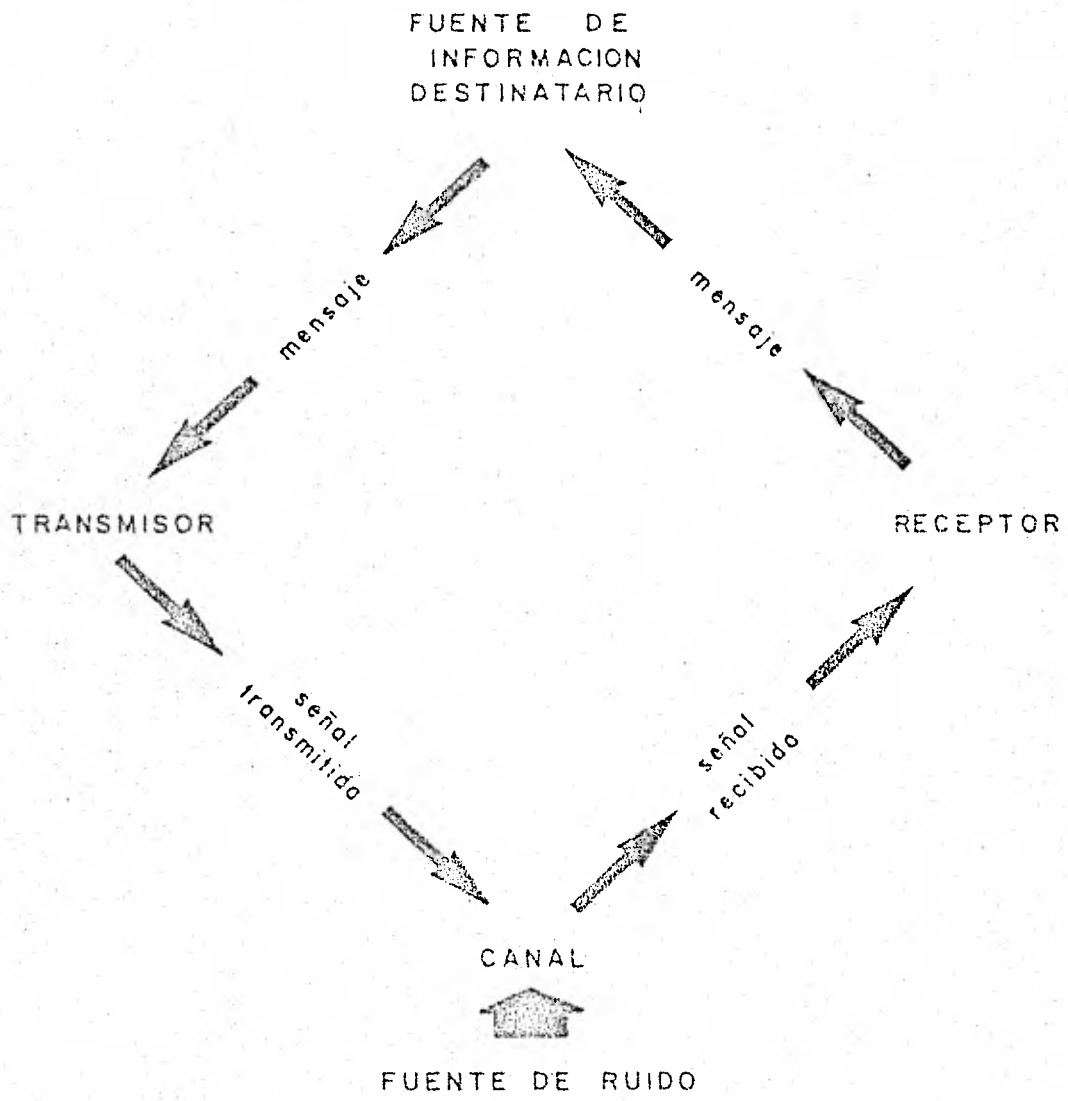


Figura 1. Esquema general de comunicación diseñado por Shannon (Adaptado de Pierce, 1972).



da.

En biología es familiar que los sistemas de comunicación entre los organismos cubren necesidades prioritarias para la comunidad a la que pertenecen; ejemplo de ello, por mencionar uno clásico, es el patrón de movimientos que lleva a cabo la abeja, Apis mellifera, -- descrito por Von Frisch en 1945, con el que es capaz de indicar con precisión, el sitio en el que se encuentra un campo de flores donde se pueden obtener néctar y polen, la base de su alimentación (Wilson, 1972).

Si se trata de localizar las bases de los sistemas de comunicación de los seres vivos, dentro de los esquemas conceptuales de la biología moderna, forzosamente se tienen que ubicar en el nivel celular, pues es en la célula en donde se encuentran los principios de todas las actividades, ya sea considerándola como un organismo en ella misma o bien, como parte de un nivel de complejidad mayor, como una colonia o un pluricelular (Brachet, 1961).

Aunque en ocasiones se pase por alto, hay que recordar que "la capacidad de comunicación es un hecho -- fundamental de las células vivas" (Stent, 1972) y que este tipo de comunicación está presente desde el primer organismo que poblara la tierra y, a final de cuentas, es la que propiciado la evolución de todo ser viviente.

Merced a la comunicación, las células más primitivas, al modificar al medio que las rodeaba, propiciaron nuevas condiciones que actuaron como selectoras de ciertos modelos de organismos. Un ejemplo de esto es la producción de una atmósfera oxidante, entre los 3,500 y -- 2,500 millones de años atrás, que gradualmente substituyó a la reductora existente (Schopf, 1979).

Aún los organismos que actualmente son considerados los más primitivos, como es el caso de las bacterias, son capaces de obtener información, procesarla de alguna manera no muy bien entendida hasta la fecha, y dar una respuesta adecuada a las señales recibidas (Alder, 1976).

A la comunicación celular se le podría clasificar en genética, nerviosa y metabólica. Para la continuidad de los seres vivos es importante la comunicación genética y para que su fisiología sea acorde al medio que la rodea, siempre fluctuante, se requieren sistemas de comunicación interna eficientes (Stent, 1972). Sin embargo, a partir de la relación estrecha que hay entre las hormonas y el sistema nervioso (McLwen, 1976) y tomando en cuenta a la respuesta inmune, sería más adecuado dividirla en genética, neuro-humoral e inmune (León-Cázar, 1977). Todas ellas, le permiten a la célula percibir las condiciones que existen en su contorno.

La comunicación genética consiste en la transmisión y expresión de la información codificada en el ácido desoxirribonucleico, el ADN. La metabólica, en la producción de moléculas denominadas en general mediadores, que sólo producen su efecto sobre células blanco, que son las que poseen los receptores adecuados. La nerviosa, solamente existe en los animales y es efectuada por células especializadas, las neuronas, que por tener contacto "íntimo" con otras células a través de una sinapsis química, eléctrica o ambas, pueden transducir una señal de tipo físico o químico en una señal eléctrica, provocando una reacción específica (Stent, 1972), y la inmune, llevada a cabo principalmente por los linfocitos, quienes reconocen a una molécula u organismo ajeno y lo destruyen (Pierce, 1972).

Recientemente se ha encontrado que una serie de -

desórdenes en los organismos, tienen su base en una falla de la comunicación celular. Como este proceso implica la producción de una señal o mediador y la presencia de un receptor que generalmente es una proteína, la explicación a estas fallas se encuentra en la sobre o infraproducción del mediador y/o el receptor, así como en errores en su estructura (Rubenstein, 1980; Kaplan, --- 1981).

Hormonas.

Giese (1973) dice que "en los organismos multicelulares, tanto el metabolismo como el crecimiento son regulados de una manera compleja por algún centro coordinador".

Existe un tipo de reguladores químicos que aún -- cuando su estructura es bien conocida, su función no lo es tanto. A estos se les conoce como hormonas y son --- sustancias producidas por ciertas células del cuerpo - que actúan regulando la función de células blanco específicas en otros órganos o tejidos (Luria, 1975).

La palabra hormona proviene del griego hormón, -- excitar, y es un término acuñado dentro de la fisiología animal, para designar a una serie de sustancias -- que son producidas por glándulas, las cuales vierten -- sus secreciones hacia el sistema vascular o linfático - del organismo. Dichas hormonas tienen su efecto a dis-- tancia, es decir, las células blanco no tienen forzosa-- mente relación espacial directa con los sistemas produc-- tores de las señales (Steward y Krikorian, 1971; Wa--- reing y Phillips, 1978).

Las hormonas de los animales se han clasificado - por su estructura química, el aspecto fisiológico que - regulan, etc. (Luria, 1975).

Por su estructura química se dividen en dos grupos: las hormonas peptídicas y las esteroides. Debido a su solubilidad, las primeras no pueden atravesar la región media de la membrana celular, que es hidrofóbica, y los receptores para este tipo de señales se hallan en la superficie. En cambio, las esteroides son completamente solubles en la bicapa de fosfolípidos, pudiendo llegar hasta el interior de la célula, en donde son detectadas por receptores citoplásmicos (O'Malley y Schader, 1976; Rubenstein, 1980).

Las hormonas de los vegetales son sustancias químicas sencillas y realmente funcionan como factores primarios de crecimiento: auxinas, giberelinas, citocininas, etc. En el sentido estricto de la palabra, no son hormonas, ya que no actúan específicamente en un grupo de células blanco (Luria, 1973).

Difícilmente se pueden señalar entidades específicas que produzcan tales hormonas y, aunque es claro su "efecto a distancia", tampoco es fácil el reconocer células blanco. A diferencia de las hormonas de los animales, las que tienen los vegetales, en la mayoría de los casos, están implicadas en más de un proceso fisiológico y generalmente hay una fuerte interacción entre los diferentes tipos de hormonas. Sólo en contadas situaciones se puede correlacionar directamente a estas moléculas con un fenómeno particular (Tabla 1).

Así pues, es válido el empleo del concepto de hormona vegetal, o bien de otros, como fitorregulador del crecimiento, sustancia de crecimiento, hormona de crecimiento, siempre recordando que más que una clasificación por estructura química, la división es operativa y relacionada comúnmente con el crecimiento y el desarrollo (Greulach, 1973; Steward y Eriksorian, 1971; Wareing y Phillips, 1978).

TABLA 1

Los reguladores del crecimiento de los vegetales y algunas de las funciones en que participan.

FITORREGULADORES	PRECURSOR(ES)	FUENTE ORIGINAL DE AISLAMIENTO	DESCUBIERTOS POR:	IMPLICADOS EN:
AUXINAS	TRIPTOFANO	COLEOPTILOS DE AVERNA	F. W. Went en 1926	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Crecimiento de la pared celular</li> <li>- División celular</li> <li>- Crecimiento de las hojas</li> <li>- Formación y crecimiento de los frutos</li> <li>- Dominancia apical</li> <li>- Foto y geotropismo</li> <li>- Formación de flores femeninas</li> <li>- Retardo del envejecimiento en plantas leñosas</li> </ul>
GIBERELINAS	ACIDO MEVALONICO	<u>Gibberella fujikuroi</u> , HORIO	Kurosawa en los 1920s	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inducción de la síntesis de alfa-amilasa en la germinación</li> <li>- Alargamiento de las regiones internodales por crecimiento de la pared y divisiones celulares</li> <li>- Crecimiento de las hojas</li> <li>- Crecimiento de los frutos</li> <li>- Floración en las plantas de día largo</li> <li>- Formación de flores masculinas</li> <li>- Interrupción de la latencia</li> <li>- Retardo del envejecimiento en plantas herbáceas</li> </ul>
CITOCININAS	BASES NITROGENADAS Y ACIDO MEVALONICO	ADN DESNATURALIZADO	Miller y colaboradores en 1955	<ul style="list-style-type: none"> <li>- División celular</li> <li>- Crecimiento de las hojas</li> <li>- Crecimiento del fruto</li> <li>- Dominancia apical</li> <li>- Interrupción de la latencia</li> <li>- Retardo del envejecimiento</li> <li>- Movilización de nutrientes</li> </ul>

TABLA 1 (continuación)

FITORREGULADORES	PRECURSOR(ES)	FUENTE ORIGINAL DE AISLAMIENTO	DESCUBIÉRTOS POR:	IMPLICADOS EN:
ETILENO	METIONINA	GAS NATURAL	Denny en 1934	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Caída de hojas</li> <li>- Maduración de frutos carnosos</li> <li>- Aceleración del envejecimiento</li> <li>- Formación de frutos</li> <li>- Engrosamiento de regiones internodales</li> <li>- Crecimiento de la hoja</li> <li>- Interrupción de la latencia</li> </ul>
ACIDO ABSCISICO	ACIDO MEVALONICO	FRUTOS DE ALCO-DOL	Addicott y colaboradores en 1964	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Inhibición del crecimiento</li> <li>- Respuesta geotrópica positiva de las raíces</li> <li>- Cierre de estomas</li> <li>- Aceleración del envejecimiento</li> </ul>

La información que contiene esta tabla fué extraída de las siguientes fuentes: Van Overbeek, 1968; Steward y Krikorian, 1971; Greulach, 1973; Wareing, 1978; Wareing y Phillips, 1978.

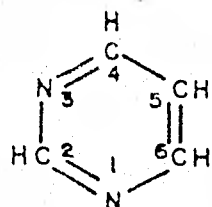
### Citocininas.

De acuerdo a Borgan (1978), la definición de citocininas es esencialmente fisiológica. Se les puede definir como compuestos que promueven la división de las células de los vegetales en un medio de cultivo que incluye una fuente exógena de auxinas.

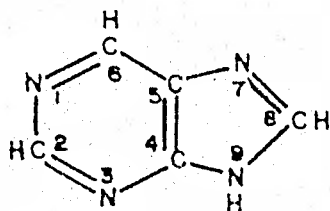
Esta definición se ha ido estructurando desde el trabajo original de Miller y colaboradoras en 1955, --- (citado en Steward y Krikorian, 1971), en el que por -- primera vez se observó que los cultivos de células de la médula del tabaco, Nicotiana tabacum, crecían mejor cuando se agregaba al medio adenina y auxinas y aún más, que se tenían mejores resultados cuando en lugar de adenina se añadía ADN "viejo" proveniente de esperma de arenque, o desnaturalizado por autoclave. La razón de este efecto se debió a que con el proceso se liberan bases púricas modificadas, entre las que ocurre la 6-furfurilaminopurina, llamada posteriormente cinetina, que favorece grandemente la división de las células de vegetales en cultivo, en comparación a la adenina ----- (Salisbury, 1957; Borgan, 1978; Laloue, 1978; Wareing y Phillips, 1978).

Las citocininas, al igual que la adenina, son bases nitrogenadas heterocíclicas derivadas de las purinas, que a su vez se consideran derivadas de las pirimidinas (Lehninger, 1975). En la figura 2 se puede ver la estructura química de estas moléculas, así como su sistema de numeración.

Como se mencionó anteriormente, la cinetina o --- 6-furfurilaminopurina, fue la primera citocinina reconocida y actualmente es considerada como un artefacto, ya que nunca ha sido aislada de ningún organismo (Steward y Krikorian, 1971). Sin embargo, su identificación como



PIRIMIDINA



PURINA

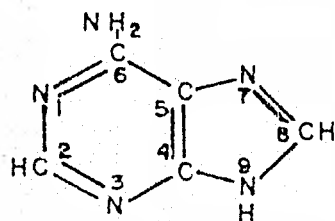
ADENINA  
(6-aminopurina)

Figura 2. Estructura química de las bases nitrogenadas y su sistema de numeración (tomado de Lehninger, 1975)



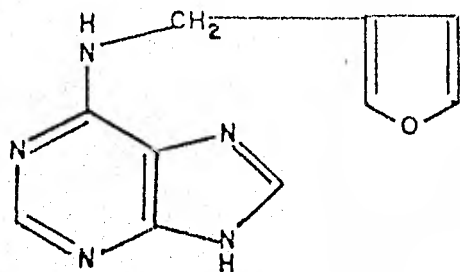
una purina con una sustitución en la posición 6, N6 -- sustituida, condujo a la síntesis de un gran número de compuestos análogos como los mostrados en la figura 3 - (Salisbury, 1957; Morgan, 1978).

La ocurrencia de estos reguladores de crecimiento en los vegetales, se hizo evidente cuando en 1953 Lett- ham, purificó a partir de maíz, Zea mays, un compuesto identificado como 6-(4-hidroxi-3-metil-2-butenilamino)- purina o zeatina, y posteriormente, en 1968, obtuvo otros compuestos de una leguminosa, Lucinus, entre los que separó la dihidrozeatina e 6-(4-hidroxi-3-metilbu- tilamino)purina (citado en Steward y Krikorian, 1971; - Morgan, 1978; Wareing y Phillips, 1978). Estos compues- tos se muestran en la figura 4.

Aunque es evidente su existencia en los vegetales, es poca la capacidad técnica para detectar la presencia de la citocininas y queda aún por aclarar su papel, da- do que, la concentración endógena es mucho más baja que la demostrada como efectiva, en la promoción de la divi- sión celular en cultivo de tejidos vegetales (Morgan, -- 1978).

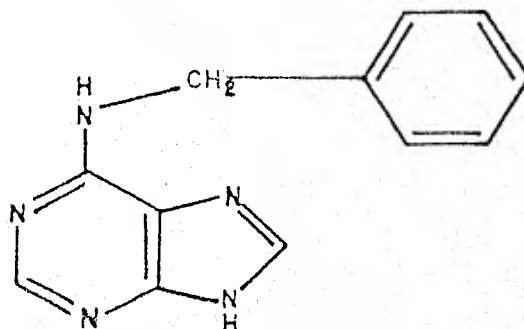
Del estudio de su estructura, se ha establecido - que la actividad de una citocinina, depende en primer - lugar de la presencia de un radical en la posición 6 -- del residuo de adenina, en sustitución del grupo ami- no. La actividad en aquellas moléculas en que el radi- cal no incluye un anillo, varía dependiendo de la longi- tud de la cadena lateral de carbonos, siendo la máxima, cuando la cadena es de 5 y disminuyendo al ser mayor o menor de este número. También, la actividad es mayor, -- cuando en la cadena lateral hay enlaces dobles ----- (Steward y Krikorian, 1971; Morgan, 1978; Laloue, 1978).

En general, se puede decir que cualquier cambio -



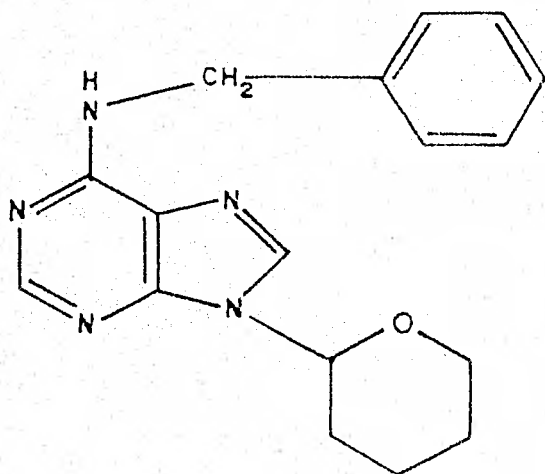
CINETINA

(6-FURFURILAMINOPURINA)



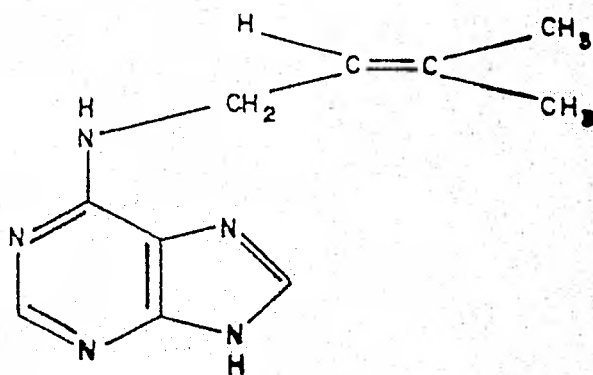
BENCILADENINA

(BA)



TETRAHIDROPIRANILBENCILADENINA

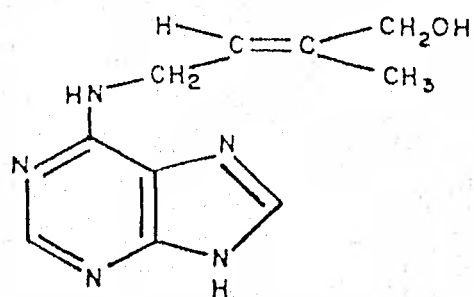
(PBA)



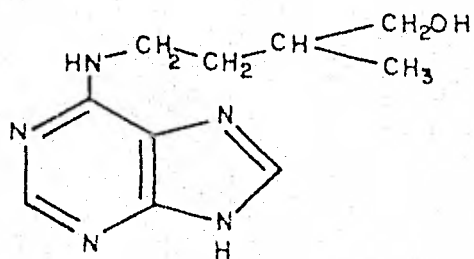
6-(3-METIL-2-BUTENILAMINO)PURINA ★

(i<sup>6</sup> Ade)

Figura 3. Estructura de algunas citocininas sintéticas (tomado de Horgan, 1978; ★ Wareing y Phillips, 1978).



ZEATINA



DIHIDROZEATINA\*

Figura 4. Estructura de dos cinetinas de ocurrencia natural (tomado de Horgan, 1978; \* Wareing y Phillips, 1978).

en el residuo de adenina, diferente a la substitución - en la posición 6; conduce a una disminución en la actividad de la molécula. Aún cuando a la adenina se le ha considerado una citocinina, se piensa que en realidad - las células pueden transformarla, al agregar una cadena de carbonos en posición 6, obteniendo así la capacidad de actuar como una hormona (Steward y Krikorian, 1971; Horgan, 1978).

Al igual que otras purinas, las citocininas forman derivados como ribósidos y ribótidos, los cuales se han encontrado formando parte de ácidos nucleicos ---- (Horgan, 1978; Wareing y Phillips, 1978).

El papel de las citocininas al retardar el proceso de envejecimiento en los órganos de los vegetales y en activar la división celular en cultivos de tejidos - vegetales, probablemente sea a nivel de la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos.

En el caso del envejecimiento hay dos ideas: la - una es que las citocininas pueden provocar la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos, polímeros que se degradan rápidamente en las células en proceso de envejecimiento, y la otra, que las citocininas puedan interferir con la producción de proteasas y nucleasas.

Respecto a la división celular, hay evidencias de que un tratamiento con estos reguladores, promueve la - síntesis de proteínas específicas que capacitan a las - células para llevar a cabo este proceso (Steward y Krikorian, 1971; Laloue, 1978; Wareing y Phillips, 1978).

Puesto que se ha observado la presencia de algunas citocininas en ciertos ARN de transferencia (Zachau et al., 1966, citado en Horgan, 1978), en plantas, bacterias, levaduras y aún en hepatocitos de rata (Steward y Krikorian, 1971), en posición adyacente a la termina-

ción 3' del anticodón (Hall et al., 1966, citado en Steward y Krikorian, 1971; Laloue, 1978; Wareing y Phillips, 1978), se ha postulado que mediante esta asociación molecular, las citocininas estimulan la síntesis de proteínas.

Hay evidencias de que en el ARN de transferencia ya formado, a la adenina adyacente a la terminación 3' del anticodón se le agrega, en la posición N6, un radical que proviene del ácido mevalónico; se considera entonces, que cuando se añaden citocininas a las células vegetales, son incorporadas en el ARNt no de manera selectiva, sino por "equivocación" de la maquinaria celular (Horgan, 1978).

Otra idea al respecto, es que las moléculas de ARN de transferencia perderían ser fuente de citocininas al ser degradadas. Sin embargo, una serie de experimentos demuestra que las citocininas que se encuentran en los ácidos nucleicos poseen configuración cis, mientras que las citocininas libres y activas en las células, poseen configuración trans (Wareing y Phillips, 1978). Esto no es concluyente, pues también hay casos, como el de Agrobacterium tumefaciens, en donde la citocininas presentes en los ácidos nucleicos, tienen configuración trans (Chapman et al., 1976; Kaiss-Chapman y Morris, 1977, citados en Horgan, 1978).

Los trabajos de Fox y Erión reportados en 1975 y 1977 (citados en Laloue, 1978), permitieron observar que las citocininas se unen a los ribosomas de las células de los vegetales superiores, en una relación de una molécula de hormona por ribosoma.

Se ha aislado una proteína ribosómica con capacidad de fijar a las purinas N6 substituídas con actividad de citocininas, exceptuando a la zeatina y, sin embargo, se cree que este reconocimiento es meramente la

identificación del residuo de adenina por parte de los ribosomas. (Berridge et al., 1970, citado en Laloue, -- 1978).

Otra proteína, no ribosómica, es capaz de reconocer a las citocininas e interactuar con los ribosomas - (Takegami y Yashida, 1977, citado en Laloue, 1978).

Berridge y colaboradores, en 1970 (citado en Steward y Krikorian, 1971), demostraron que las citocininas sintéticas, como la cinetina y la 6-bencilaminopurina, se unen a los ribosomas de las células vegetales, - en tanto que la adenina y sus derivados, sin actividad de citocinina, no lo hacen.

Stuchburry y Falni (citado en Horgan, 1978), sugieren que la transformación de adenina a citocinina en condiciones experimentales, es muy rápida como para implicar su paso por un ARNt, en donde podría ser alterada su configuración. Se ha propuesto también, que las - citocininas pueden ser dotadas de la cadena lateral de carbonos, aún cuando estén en forma libre, sólo que no se ha demostrado experimentalmente (Wareing y Phillips, 1978).

Un residuo de adenina en una ARN de transferen---cia, puede reaccionar con el  $\Delta^2$ -isopentenil pirofosfato, un isoprenoide, produciendo la  $i^6$ Ade, una citocinina. - Esta reacción, mediada por una enzima, se ha encontrado en las células de los vegetales (Chen y Hall, 1969, citado en Horgan, 1978). Se piensa también, que algunas - citocininas en los vegetales, se pueden producir por interconversión, tal como se muestra en la figura 5 (Wa--reing y Phillips, 1978).

Aunque se ha observado que las células modifican a las citocininas, algunas veces por glucosilación o -- por conjugación con aminoácidos y de esta forma varían su efecto, el resultado en todos los casos es la pérdi-

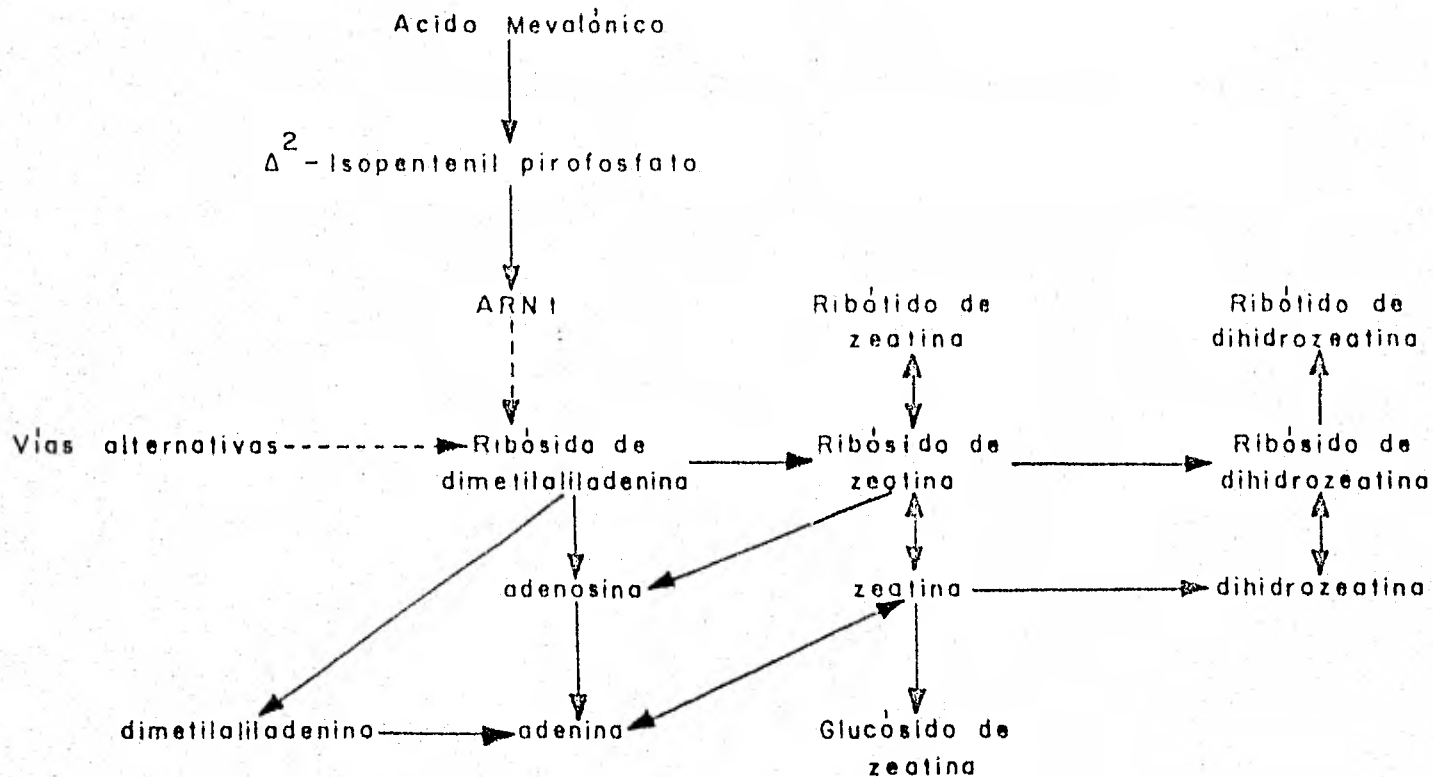


Figura 5. Posible patrón de interconversión de algunas citocininas naturales de los vegetales (dimetilalil=isopentenil). Las líneas punteadas indican evidencias indirectas o sólo base teórica para tales interconversiones (Adaptado de Wareing y Phillips, 1978).

de en actividad (Horgan, 1972). No es clara la función de estos conjugados, pero podrían representar una forma de desintoxicación o bien, de almacenaje (Wareing y Phillips, 1978).

Además de estas formas de inactivación, las citozininas pueden ser degradadas por oxidación del enlace  $\beta$ -amino, separándose así la cadena lateral del residuo de adenina, el que, por efecto de la enzima xantina-oxidasa, es transformado en ácido úrico y luego urea (Wareing y Phillips, 1978).

Resulta curioso, además, que un cierto número de derivados de la urea, actúan como factores que promueven la división en forma experimental en los vegetales (Steward y Krikorian, 1971).

Debe ser tomado en cuenta, que en ocasiones, las purinas y pirimidinas son estimulantes cuando se añaden a los medios de cultivo de tejidos vegetales (Steward y Krikorian, 1971).

#### Interacción de Mediadores.

En el concepto de célula, están implicadas una serie de actividades características de este nivel de complejidad, algunas de las cuales son reguladas por mediadores que pueden interactuar en formas diversas.

Un ejemplo ilustrativo de ello lo proporcionan -- los esteroides, cuya presencia y abundancia es muy grande en los vegetales. Aunque por mucho tiempo a estas moléculas o a los esteroides se les consideró meros productos del metabolismo secundario, se ha evidenciado fuertemente su acción en varios procesos, como el crecimiento vegetativo y la floración. Aún más, cuando se han probado hormonas de animales, como el estradiol y la testosterona en algunas plantas, se ha observado una tendencia hacia la feminización o masculinización en las -



flores producidas. Su acción a nivel de la membrana de las células, hace suponer que, al igual que el colesterol, los esteroides pueden determinar su dinámica (Grunwald, 1975; Geuns, 1978 y 1982).

También dentro del reino de los hongos, se ha encontrado que algunos esteroides, en cierto número de géneros como Achlya y Mycos, participan como reguladores de algunas funciones relacionadas con los procesos de reproducción sexual (Barksdale, 1969).

Hay evidencias de que una sustancia producida -- por las glándulas submaxilares del ratón, que funciona como un factor de crecimiento epidérmico, puede promover el crecimiento de los tallos del sorgo, Sorghum bicolor. Este también se encuentra en la orina de los mamíferos y el tracto digestivo de algunos insectos (Dyer, 1980).

En otros estudios se encontró que el suero sanguíneo de humano, inhibe el proceso de la germinación y el crecimiento de las raíces de Lepidium sativum L. En cambio, el suero sanguíneo de humanos con tumores, al igual que un medio nutritivo sin este suero, permiten -- que estos dos procesos ocurran normalmente, lo cual hace suponer que en el suero sanguíneo normal, hay sustancias inhibidoras que no se presentan o están modificadas en el suero sanguíneo de los humanos con tumores (Ruppel et al., 1961).

Vale la pena recordar que algunas hormonas de los vegetales, originalmente fueron reconocidas como sustancias producidas por organismos de otros reinos, que al afectar algún proceso fisiológico vegetal, despertaron el interés de ver si tenían un papel dentro de la fisiología normal de las plantas. Tal es el caso de las giberelinas (Phinney et al., 1957), aisladas de un hongo, Gibberella fujikuroi, que al infectar a las plantas

de error, les provoca un crecimiento anormal (Salisbury, 1957; Steward y Krikorian, 1971; Grellach, 1973; Wareing y Phillips, 1978).

Con las citoquininas se han hecho experimentos empleando sistemas animales para probar si se producen efectos similares a los encontrados en los vegetales y, en general, los resultados han sido negativos, aunque se ha observado que la  $H^6(10^2$ -isopentenil) adenosina, es un potente inhibidor del crecimiento de varias líneas celulares de tejidos de animales (Steward y Krikorian, 1971).

A este respecto, Fox y colaboradores (1966, citado en Steward y Krikorian, 1971), mencionan que es bien conocido el efecto de la puromicina, un antibiótico derivado de la adenosina, como inhibidor del crecimiento de células de vegetales, animales y en bacterias.

#### Linfocitos.

Cuando se tienen células provenientes de animales y se cultivan, se cuenta con un sistema en el cual se puede observar el efecto de diversas sustancias al agregarlas al medio en el cual están creciendo. Un sistema tal, lo proporcionan los linfocitos.

Los linfocitos son células del tejido sanguíneo y forman parte de la línea conocida como de células blancas.

En términos generales, son los encargados de la respuesta inmune, es decir, se especializan en reconocer a las sustancias u organismos extraños y montar una respuesta adecuada, neutralizando o destruyendo a esos agentes, en general conocidos como antígenos (Lerner y Dixon, 1973; Ling y Kay, 1975).

Así pues, dentro del esquema de comunicación, detectan una señal gracias a los receptores situados en -

su membrana celular, las inmunoglobulinas, y dan una -- respuesta.

Los linfocitos B, encargados de la respuesta humoral, se transforman en una célula blasto por efecto de la estimulación y producen anticuerpos circulantes, en tanto que los T, encargados de la respuesta celular, se activan y producen diversas sustancias, algunas de e--llas citotóxicas (Ling y Kay, 1975).

Según Thomas (1974), los linfocitos llevan una información específica en sus receptores de superficie, - presentándola a manera de pregunta: ¿hay en algún sitio mi configuración molecular específica?. Cuando la en---uentran, sucede la estimulación, desencadenando una -- gran actividad: en el caso del linfocito B, de ser una célula pequeña, con poco citoplasma, un gran núcleo, un número relativamente reducido de mitocondrias y sin retículo endoplásmico aparente, pasa a ser una célula --- grande, con un retículo endoplásmico prominente y mayor número de mitocondrias (Lerner y Dixon, 1973; Thomas, - 1974; Ling y Kay, 1975).

Comienza entonces la síntesis de ADN y finalmente ocurre la división celular. Se producen dos células diferentes, una célula plasma que sintetiza y vierte al - medio un anticuerpo específico, destinado a neutralizar al antígeno y, un linfocito de memoria, cuya función es la de seguir circulando con el mismo anticuerpo que produce la célula plasma, sólo que teniéndolo como receptor de superficie.

En cuanto a los T, la estimulación induce la división, de la que resulta una mayor proliferación de células, que producen moléculas citotóxicas, las linfoci---nas, cuyo papel es el de destruir a las células que hayan podido invadir los tejidos del organismo (Ling y -- Kay, 1975).

Esta misma respuesta puede ser evocada en un sistema de cultivo, en el cual se mantiene a los linfocitos obtenidos de sangre periférica completa, que se siembran directamente (Moorhead, 1973; Ling y Kay, 1975); o bien, aislándolos por diversos métodos a partir de sangre periférica o del bazo, timo y médula ósea (Ling y Kay, 1975).

Dada su especificidad con respecto a las moléculas antigénicas, si se aplica un antígeno específico al medio de cultivo, se observará una respuesta, cuantificada con base en la capacidad de división de estas células, sólo que de una magnitud pequeña. Sin embargo, a partir del aislamiento de complejos glucoprotéicos encontrados primero en vegetales y conocidos en general como lectinas, se cuenta con una herramienta capaz de estimular en cultivo a los linfocitos de una manera más intensa, ya que las lectinas actúan como antígenos inespecíficos (Ling y Kay, 1975; Sharon, 1977).

De esta forma, teniendo linfocitos en un medio de cultivo y agregando una lectina como la fitohemaglutinina (PHA) o la concanavalina (ConA), se cuenta con un sistema en el cual es posible observar de que manera, el manejo de algunas variables hace que la respuesta normal in vitro sea afectada.

En cuanto a la interpretación de los resultados, se facilita por 2 características de estas células en cultivo: persiste su expresión fenotípica, así como el número cromosómico diploide normal, a lo largo del tiempo en que se realiza su cultivo (Lerner y Dixon, 1973).

#### Animales y citocininas.

Borek y colaboradores (1977), reportaron que en los pacientes de cáncer y en animales con tumores, hay una excreción de grandes cantidades de purinas y pirimi

dinas modificadas, entre las cuales se encuentra la ---  
 $N_2,N_2$ -dimetilguanósina, que de acuerdo a Morgan (1978)  
es una citocinina.

Todo parece indicar que se originan solamente de  
moléculas de ARN de transferencia y experimentalmente -  
se ha demostrado que la tasa de rompimiento de los ARNt  
en ratas con tumores inducidos, excede a la tasa de ---  
muerte de las células. El nivel de excreción en los in-  
dividuos que padecen algún tipo de cáncer, es 10 veces  
más grande que el de los humanos normales. En los prime-  
ros es de 20 mg por día y en los segundos, de 2. Esto -  
representa una actividad de rompimiento de moléculas de  
ARN de transferencia, 500 veces mayor en las células --  
del tumor (Borek et al., 1977).

"No podemos descartar algún efecto desconocido --  
del tumor sobre las células distantes, supuestamente --  
normales. Se han observado tales efectos telepatogéni-  
cos de algunas enzimas, en las células normales de ani-  
males con tumores". (Borek et al., 1977).

Con esta evidencia, sin embargo, el mecanismo si-  
gue siendo obscuro: "Si se asume que en las células de  
los mamíferos algunas moléculas de ARN de transferencia  
tienen algún papel regulador, tal como sucede en las --  
bacterias, entonces es posible esperar un recambio dife-  
rencial en las subpoblaciones de ARNt en las células --  
normales. Más que un ejemplo de comportamiento anormal,  
el aumento en la tasa de recambio de las subpoblaciones  
de ARNt en el tejido del tumor, es un ejemplo de exage-  
ración del normal" (Borek et al., 1977).

Estos antecedentes son la base de la cual se par-  
te para encontrar en que forma, la presencia de diferen-  
tes concentraciones de cinetina en el medio de cultivo,  
en el que se mantiene a los linfocitos obtenidos a par-  
tir de sangre periférica completa, modifica su capaci-  
dad de respuesta a la estimulación de un antígeno ines-  
pecífico, la fitohemaglutinina.

## 2. MATERIALES Y METODOS.

Se utilizó el cultivo de linfocitos como un sistema para observar el efecto de la cinetina sobre la capacidad de respuesta de estas células a la fitohemaqlutini-na, al agregarla al medio de cultivo.

### Selección de concentraciones de cinetina.

Para determinar el nivel de concentraciones de cine-tina a utilizar en este trabajo, se partió de dos bases: por un lado, de los datos de Borek y colaboradores ---- (1977), se sabía que en algunos pacientes de cáncer hay excreción de aproximadamente 20 mg de  $N_2,N_2$ -dimetilgua-nosina por día, cantidad que es 10 veces mayor a la ex-cretada por individuos no afectados, en los que la ex-creción de esta sustancia es de 2 mg por día.

Asumiendo que un adulto promedio pesa alrededor de 60 Kg, la cantidad de la citocinina excretada por gramo de peso corresponde a  $3.3 \times 10^{-4}$  mg en los pacientes de cáncer y de  $3.3 \times 10^{-5}$  mg en individuos normales.

Por otro lado, las citocininas, y en particular la cinetina, en los medios de cultivo para células y teji-dos vegetales, se emplea en concentraciones que van des-de 0.01 a 1 mg o más por litro de medio, lo que corres-ponde a concentraciones entre  $1 \times 10^{-5}$  a  $1 \times 10^{-3}$  mg por mililitro.

Esta conversión fue necesaria porque el volumen de medio de cultivo empleado para los linfocitos fue de -- 1 ml.

Inicialmente se usaron las siguientes 5 concentra-ciones finales:

$1 \times 10^{-7}$	mg/ml
$5 \times 10^{-5}$	"
$1 \times 10^{-5}$	"
$5 \times 10^{-4}$	"
$1 \times 10^{-3}$	"

entre las cuales quedan incluidos los valores calculados. En el primer cultivo se utilizó adenina a las mismas concentraciones.

#### Obtención de linfocitos para cultivo.

Las células fueron obtenidas a partir de muestras de sangre periférica completa de humano y borrego, *Ovis* sp; las de humano en el laboratorio y las de borrego en la granja de la facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM. Para ello se emplearon jeringas desechables previamente heparinizadas y las muestras se colectaron el mismo día del cultivo.

#### Medio de Cultivo.

El medio en que se cultivaron los linfocitos contenía el 80% de medio TC-199 (Difco 5477, Detroit, Mich.); 20% de suero fetal de bovino (Microlab, México, D.F.), inactivado previamente por calentamiento a 60°C durante 30 minutos; glutamina 2 mM (Difco 5789). Por cada 5 ml de medio se agregó TC-Penicilina-Estreptomicina (Difco 5854) equivalente a 500 unidades y 500 µg respectivamente, y 2 gotas de Heparina de 1,000 U.I. (Abbott 3979, - México, D.F.). Además, a todos los medios se les agregó 0.4 mg/ml de Fitohemaaglutinina "M" (Difco 0528) como agente mitogénico.

En cuanto a la Adenina (Eastman) y la Cinetina (Sigma), se hicieron diluciones en agua bidestilada a partir de soluciones concentradas, 1 mg/ml, preparadas también en agua bidestilada, y se esterilizaron por filtración en Millipore con un diámetro de poro de 0.45 µm.

Para la dilución de estas sustancias fue necesario agregar 3 gotas de HCl 1N y calentar ligeramente

Cabe señalar, que el medio TC-199 contiene  $1 \times 10^{-2}$  mg de Adenina y  $3 \times 10^{-4}$  mg de Guanina por mililitro.

Para cada cultivo se utilizaron frascos ampulla con capacidad de 10 ml, en los que se sirvió 1 ml de medio de cultivo completo, y exceptuando a los testigos correspondientes, 0.1 ml de las diluciones de adenina y -cinetina.

#### Siembra.

Se trabajó sembrando linfocitos sin separar de los demás elementos sanguíneos, tanto de humano como de borrego, de acuerdo a una modificación a la microtécnica de Arakaki y Sparkes (1963), y con linfocitos de borrego aislados de sangre periférica completa, por medio de Ficoll-paque (Egyum, 1965; Bradley, 1960).

Para los cultivos a partir de sangre completa, se sembraron 0.3 ml de sangre completa por frasco.

En el caso de los cultivos de linfocitos aislados, las muestras de sangre se diluyeron 1:1 volumen a volumen (v/v) en medio de cultivo. En tubos de vidrio para centrífuga, con capacidad de 15 ml, se colocaron 3 ml de Ficoll-paque (Pharmacia, Uppsala, Suecia) y sobre esta solución, de densidad mayor a la de las células blancas, se depositaron suavemente 4 ml de la sangre diluída.

Los tubos se centrifugaron en una centrífuga clínica (Hettich, Universal 11) durante 40 minutos a 2,000 - revoluciones por minuto (rpm) y luego, se recuperaron con una jeringa las capas que yacían sobre la superficie del gradiente.

Este material se concentró por centrifugación a 600 rpm, durante 10 minutos; el volumen del botón se llevó a 10 ml con medio de cultivo, se tomaron 0.9 ml de esta dilución y se les agregó 0.1 ml de colorante Azul Tripan (Sigma 468) al 0.5% en solución salina al 0.85% --- (Phillips, 1973).



Con esta suspensión se cargaron las 2 cámaras de un hemocitómetro, para determinar el número de células vivas, de acuerdo al criterio de exclusión, en el cual, - las células muertas se muestran coloradas de azul (Absher, 1973; Phillips, 1973).

A partir de este cálculo, se hicieron las diluciones necesarias para que al final hubiera, en 1 ml, entre 600,000 y 800,000 células vivas, cantidad que se sembró en cada frasco.

Todos los cultivos se hicieron por triplicado y se realizaron repeticiones de los tratamientos sólo en los casos que se deseó comprobar un efecto.

#### Incorporación de timidina tritiada.

Como criterio para cuantificar la respuesta de los linfocitos in vitro, se utilizó la tasa de incorporación de timidina tritiada, partiendo de la base de que todas las células que fueran estimuladas, tienen que llegar a la fase de síntesis de ADN, como requisito para que ocurra la división (Baserga y Kisielski, 1963; - Macieira-Coelho, 1973).

Para hacer esta medición, 16 horas antes del proceso de cosecha, a cada frasco se le agregó 0.1 ml de timidina metil-tritiada (New England Nuclear Net 027A, -- con una actividad específica de 2 Ci/mmol), equivalente a una actividad de 1  $\mu$ Ci o microCurie,  $3.7 \times 10^4$  desintegraciones por segundo.

#### Cosecha.

Después de incubar los cultivos a 37°C durante 72 h, se cosecharon de la siguiente manera:

a) Cultivos a partir de sangre completa.

El material de cada frasco se transfirió con pipeta Pasteur a tubos de plástico de 15 ml para centrífuga y

se lavaron con 5 ml de solución salina 0.85%, transfiriendo esta solución al tubo respectivo.

Los tubos se centrifugaron a 800 rpm durante 10 minutos para recuperar el paquete de células, eliminando el sobrenadante.

Las células se resuspendieron en fijador, alcohol metílico (Baker) y ácido acético (Baker), en una proporción 3:1 v/v, hasta un volumen de 5 ml y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min.

Posteriormente se centrifugaron durante 10 min. a 800 rpm, recuperando el botón y desechando el sobrenadante.

Se resuspendió nuevamente en fijador y se centrifugaron de igual forma.

Se retiró el sobrenadante de cada tubo, hasta dejar solamente el botón, y éste se resuspendió en ácido tricloroacético, TCA, (Merck) al 7% y frío, para precipitar a las nucleoproteínas. Se incubó a 4°C durante una hora.

Después de la incubación, se centrifugaron los tubos a 2,000 rpm durante 10 min. Se desechó el sobrenadante y el botón fue resuspendido en 5 ml de TCA al 7% frío.

El material resuspendido se filtró al través de una membrana Millipore, con un diámetro de poro de 0.65  $\mu$ m, para retener la porción sólida. Se lavó el tubo con otros 5 ml de TCA al 7% frío, resuspendiendo, y se filtró sobre la misma membrana.

Cada filtro se colocó en un vial de vidrio para contador, añadiendo 0.4 ml de dodecilsulfato de sodio, SDS (Sigma) al 2% y se incubaron a 60°C, 30 min. Luego, se les agregaron 10 ml de líquido de centelleo, tipo Bray.

b) Cultivos de linfocitos aislados.

El material de los frascos se resuspendió y se vertió en el dispositivo para filtración Millipore, a través de una membrana con un diámetro de poro de 0.65  $\mu$ m.

Los frascos fueron lavados con 2 ml de solución salina 0.85% fría, se vertió en el filtro y se repitió una vez más este lavado.

Directamente en el filtro, se añadieron 10 ml de TCA al 7% frío y después que fue filtrado, se agregaron 10 ml más.

El filtro se lavó con 2 ml de alcohol etílico al 96% y esto se hizo 2 veces más.

Cada filtro fue colocado en un vial para contador, se secaron a 37°C durante una hora, agregándoles después 5 ml del líquido de Bray y refrigerándolos cuando menos 45 min., a 4°C, antes de contarlos.

La detección de la radiactividad relativa en cada vial fue determinada en un contador de centelleo líquido, marca Packard, automático, y registradas en una impresora Teletype, como cuentas por minuto (cpm). Cada vial se contó en el modo autostandard durante 4 min.

#### Procesamiento de los datos.

La radiactividad relativa, medida como cpm, se transformó a radiactividad real, en desintegraciones por minuto (dpm), encontrando la eficiencia de lectura en una gráfica patrón y de acuerdo a la siguiente conversión:

$$dpm = \frac{cpm \times 100}{\text{Eficiencia}}$$

Puesto que para cada concentración probada de adenina y cinetina, se obtuvieron 3 datos por cultivo, se calcularon los siguientes parámetros estadísticos:

a) Promedio:

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$$

b) Desviación típica:

$$S_{\bar{x}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

c) Error típico:

$$E_{\bar{x}} = S_{\bar{x}} / \sqrt{n}$$

de acuerdo a Parker (1976) y Heath (1977).

La significancia estadística de cada promedio se en contró comparándolo con el promedio de los testigos. Si el promedio, más menos una vez el error típico de los testigos, es mayor o menor que el promedio, más menos u na vez el error típico de los tratamientos, entonces la diferencia es significativa (Ongay-Larios, 1978).

Además, si el error típico de cada terna de datos promediados, es mayor de 40% respecto al promedio, se rechaza, pues la variabilidad intrínseca del cultivo de linfocitos, determinada por Ongay-Larios (1978), medida como porcentaje del error típico, no debe ser mayor a ese valor.

El cálculo del error típico como porcentaje del pro medio se hizo así:

$$\%E_{\bar{x}} = \frac{E_{\bar{x}} \times 100}{\bar{x}}$$

Para poder comparar los valores medios obtenidos de

los diferentes cultivos, cuando fue necesario, se hizo una normalización para expresar las respuestas como porcentaje del promedio de los testigos respectivos:

$$\% \text{CONTROL} = \frac{\bar{x} \text{ tratamiento} \times 100}{\bar{x} \text{ testigo}}$$

Con los datos normalizados de tal manera, se determinó la ecuación de la curva que describe el comportamiento de los linfocitos en cultivo, ante las diferentes concentraciones de cinctina en el medio. Esta se obtuvo por un ajuste según el método de mínimos cuadrados (Sokal y Rohlf, 1969; Snedecor y Cochran, 1971; Parker, 1976; Heath, 1977; Ongay-Larios, 1978), encontrando así el valor de la pendiente y la ordenada al origen, y con ellos, se elaboró la curva teórica.

Con la prueba de ji cuadrada ( $\chi^2$ ), se obtuvo la probabilidad de que las diferencias encontradas entre los valores experimentales y los calculados, fueran debidas o no al azar.

El cálculo se realizó de la siguiente manera:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^n \frac{(\text{valor observado} - \text{valor calculado})^2}{\text{valor calculado}}$$

En esta prueba, entre más cercano a cero sea el valor de  $\chi^2$ , el ajuste es más aproximado. La probabilidad se obtiene en una tabla de valores para  $\chi^2$ , de acuerdo a los grados de libertad, el número de elementos que intervienen en la suma menos uno (Sokal y Rohlf, 1969; Snedecor y Cochran, 1971; Parker, 1976; Heath, 1977; Ongay-Larios, 1978).

Todos los cálculos se hicieron en una calculadora marca Texas Instruments, modelo TI-55.

### 3. RESULTADOS.

Utilizando sangre periférica de humano, en el primer cultivo, se obtuvo una ligera inhibición de la captación de timidina tritiada, tanto con adenina como con cinetina, y tal parecía que la mayor concentración producía estimulación, aunque no significativa desde el punto de vista estadístico (tablas 2 y 3).

Para confirmar los resultados y poder hacer un tratamiento estadístico adecuado, se utilizó sangre de un animal diferente, borrego, para repetir los tratamientos anteriores, probando además, cuál era el efecto producido al agregar adenina y cinetina en ausencia de la fitchemaglutinina.

En este caso, lo observado fue que no había diferencias significativas, entre los tratamientos y los testigos, que mostraran alguna tendencia; sin embargo, fue importante encontrar que cuando no hay un antígeno presente en el medio, ninguna de las dos sustancias fueron capaces de estimular a los linfocitos, lo que se refleja en la poca radiactividad de las muestras, cercana al valor del fondo (tablas 4 a la 7).

Aquí surgió la duda de si la respuesta diferente era o no debida al hecho de que se estaba manejando sangre de un animal distinto, es decir, si las diferencias reflejaban algunas características inherentes a cada especie.

Buscando el obtener una serie de datos confiables, decidimos regresar al sistema de cultivo de linfocitos de humano, repitiendo las mismas dosis empleadas con anterioridad, tanto de cinetina como de adenina.

Como se puede notar en las tablas 8 y 9, la variabilidad dada por los testigos, medida como porcentaje del error típico, es muy alta, y aunque para este sistema se ha calculado que la variación máxima permitida es de un

TABLA 2

Incorporación de timidina tritiada por los linfocitos de HUMANO, cultivados a partir de sangre periférica completa en un medio que contiene ADE-NINA a diferentes concentraciones. Cultivo número 576. CON FITOHEMAGLUTI  
NINA.

CONCENTRACION ( $\mu$ M)	dpm promedio	S $\bar{X}$	E $\bar{X}$	%E $\bar{X}$
0.0	22,749.0	1,651.0	953.2	4.2
0.00074	20,108.0	4,240.0	2,228.0	12.2
0.37	17,298.0	1,445.0	824.3	4.8
0.74	18,958.0	3,209.0	1,852.7	9.8
3.7	19,830.0	4,185.0	2,416.2	12.2
7.4	23,118.0	348.0	200.9	0.9

NOTA: Las concentraciones están expresadas en unidades de concentración micromolar ( $1 \times 10^{-6}$  M); dpm promedio significa desintegraciones por minuto promedio de 3 repeticiones; S $\bar{X}$  es la desviación típica del promedio; E $\bar{X}$  es el error típico del promedio y %E $\bar{X}$  representa el valor del error típico expresado como porcentaje del promedio respectivo. Este será el significado dado a los símbolos y abreviaturas en las tablas y figuras subsecuentes.

TABLA 3

Incorporación de timidina tritiada por los linfocitos de HUMANO, cultivados a partir de sangre periférica completa en un medio que contiene CINETINA a diferentes concentraciones. Cultivo número 576. CON FITOHEMAGLUTININA.

CONCENTRACION ( $\mu$ M)	dpm promedio	$\bar{Sx}$	$\bar{Ex}$	$\% \bar{Ex}$
0.0	22,749.0	1,651.0	953.2	4.2
0.00046	15,206.0	3,424.0	1,976.8	13.0
0.23	16,408.0	4,113.0	2,374.6	14.5
0.46	16,514.0	2,364.0	1,364.9	8.3
2.3	22,415.0	4,270.0	2,465.3	11.0
4.6	23,869.0	4,748.0	2,741.3	11.5



TABLA 4

Incorporación de timidina tritiada por los linfocitos de BORREGO cultivados a partir de sangre periférica completa en un medio SIN FITOHEMA--GLUTININA que contiene CINETINA a diferentes concentraciones. Cultivo - número 581.

CONCENTRACION ( $\mu$ M)	cpm promedio	S $\bar{x}$	E $\bar{x}$	*E $\bar{x}$
0.0	330.4	41.2	23.8	7.2
0.35	222.9	16.1	9.3	4.2
0.46	194.7	6.4	3.7	2.0
1.2	227.6	30.8	17.6	7.8
3.5	218.6	21.6	12.5	5.7
4.6	248.9	28.9	16.7	6.7
23.0	218.9	49.3	26.5	13.0

TABLA 5

Incorporación de timidina tritiada por los linfocitos de HORREGO, cultivados a partir de sangre periférica completa en un medio que contiene -- CINETINA a diferentes concentraciones. Cultivo 581. CON FITOHEMAGLUTINI  
NA.

CONCENTRACION ( $\mu$ M)	dpm promedio	S $\bar{x}$	E $\bar{x}$	%E $\bar{x}$
0.0	7,754.4	2,079.1	1,200.4	15.5
0.35	7,479.7	1,597.7	922.4	12.3
0.46	7,700.6	709.5	409.6	5.3
1.2	7,779.7	1,452.7	839.7	10.6
3.5	9,727.9	4,391.3	2,847.1	29.3
4.6	8,819.7	125.7	72.6	0.8
23.0	7,540.1	889.8	513.7	6.8

TABLA 5

Incorporación de timidina tritiada por los linfocitos de BORRERO cultivados a partir de sangre periférica completa en un medio SIN FITOHEMA--GLUTININA que contiene ADEFINA a diferentes concentraciones. Cultivo -- número 582.

CONCENTRACION ( $\mu$ M)	dpm promedio	$\bar{Sx}$	$\bar{Ex}$	$\bar{SEX}$
0.0	143.0	21.4	12.4	8.7
0.18	164.1	10.5	5.9	3.6
0.37	173.3	22.1	12.6	7.4
0.55	179.6	25.1	14.5	8.1
5.5	187.6	15.0	8.7	4.6
7.4	150.9	17.7	10.2	6.8
37.0	148.9	14.4	8.3	5.6

TABLA 7

Incorporación de timidina tritiada por los linfocitos de BORREGO cultivados a partir de sangre periférica completa en un medio que contiene ADENINA a diferentes concentraciones. Cultivo número 582. CON FITOHEMA-GLUTININA.

CONCENTRACION ( $\mu$ M)	dpm promedio	$\bar{Sx}$	$\bar{Ex}$	$\% \bar{Ex}$
0.0	9,158.6	1,770.6	1,022.3	11.2
0.18	7,576.3	1,310.6	756.7	10.0
0.37	6,960.7	1,790.7	1,033.9	14.9
0.55	7,901.7	2,046.5	1,181.5	15.0
5.5	6,999.4	1,416.1	817.6	11.7
7.4	9,996.0	1,160.7	670.1	6.7
37.0	6,674.6	1,668.2	963.1	14.4

TABLA 8

Incorporación de timidina tritiada por los linfocitos de HUMANO cultivados a partir de sangre periférica completa en un medio que contiene ADE NINA a diferentes concentraciones. Cultivo 586. CON FITOHEMAGLUTININA.

CONCENTRACION ( $\mu$ M)	dpm promedio	S $\bar{x}$	E $\bar{x}$	%E $\bar{x}$
0.0	4,702.5	2,782.6	1,608.5	34.2
0.18	9,307.6	2,029.2	1,171.6	12.6
0.37	10,631.4	2,528.4	1,459.8	13.7
0.55	12,868.5	923.3	532.9	4.1
5.5	9,237.9	654.4	377.8	4.1
7.4	8,607.2	318.3	183.8	2.1
37.0	11,820.4	2,538.6	1,465.7	12.4

TABLA 9

Incorporación de timidina tritiada por los linfocitos de HUMANO cultivados a partir de sangre periférica completa en un medio que contiene CINETINA a diferentes concentraciones. Cultivo número 586. CON FITOHEMA--GLUTININA.

CONCENTRACION ( $\mu$ M)	dpm promedio	$\bar{Sx}$	$\bar{Ex}$	$\% \bar{Ex}$
0.0	4,702.5	2,782.6	1,606.5	34.2
0.35	8,500.0	2,904.2	1,676.7	19.7
0.46	10,734.0	1,369.7	790.8	7.4
1.2	10,440.0	2,439.1	1,406.2	13.5
3.5	8,426.4	1,733.2	1,000.7	11.9
4.6	8,047.1	4,365.5	2,520.4	31.3
23.0	9,283.2	1,728.8	998.1	10.8

40%, para considerar confiables los resultados, el hecho de estar tan cerca del nivel de rechazo no nos permitió aceptar la posibilidad de que en ambos experimentos, las moléculas añadidas hubieran provocado una estimulación en casi todas las concentraciones empleadas.

Así pues, aún cuando contábamos con datos de 3 experimentos, era imposible saber en claro cuál es el efecto de la cinetina sobre los linfocitos cultivados. Sin embargo, ya se contaba con ciertos datos que nos permitieron delinear los experimentos futuros.

En primer lugar, sabíamos que la cinetina, en las concentraciones empleadas, no provoca por ella misma un efecto sobre los linfocitos de borrego, y si lo tenía, ya fuera inhibiéndolos o estimulándolos, debería hacerlo en presencia de la fitohemaaglutinina y, en segundo lugar, todo parecía indicar que la adenina, inicialmente empleada como un segundo testigo, produce efectos similares a los de la cinetina, a las mismas concentraciones en mg/ml.

Dado que seguía siendo una incógnita el efecto de la cinetina, decidimos replantear las condiciones de experimentación desde un nuevo enfoque: el de encontrar una relación dosis respuesta en un rango amplio, desde  $1 \times 10^{-6}$  hasta  $1 \times 10^4$   $\mu$ N, en intervalos de 1 en escala logarítmica base 10.

Para esta nueva serie, consideramos más importante trabajar sólo con sangre completa de humano y únicamente con cinetina y, con la idea de que posteriormente los datos se pudieran comparar con los de otros posibles experimentos, comenzamos a manejar las concentraciones no en peso, es decir, miligramos de cinetina por mililitro de medio, sino en molaridad. Por razones de comodidad en la presentación de los datos, todas las ta

blas están reportadas con base a micromolaridad, -----  
 $1 \times 10^{-6}$  M.

En la tabla 10, se puede ver que las dosis por debajo de  $10 \mu\text{M}$ , no tienen ningún efecto a excepción de una respuesta de inhibición en la concentración  $0.001 \mu\text{M}$  y que a concentraciones superiores a  $10 \mu\text{M}$ , se obtiene inhibición significativa en prácticamente todas.

¿Cómo es ese efecto?, a  $10 \mu\text{M}$  no hay modificación de la respuesta comparada con el testigo; a  $100 \mu\text{M}$ , la inhibición es ya de un 80% y a  $1,000$  y  $10,000 \mu\text{M}$ , la respuesta es casi nula.

Nótese que el intervalo de las concentraciones, al incrementar en forma logarítmica, es muy amplio; lo que significa que aún cuando entre la primera y la segunda, la diferencia es de 10, la tercera es 100 veces mayor que la primera, la cuarta 1,000 etc. A pesar de ello, este experimento permitió encontrar que entre  $10$  y  $1,000 \mu\text{M}$  se tiene virtualmente una respuesta completa de inhibición.

Estos datos nos llevaron a realizar una repetición, en la que se fijó la atención solamente en las concentraciones de ese intervalo, tomando como concentración más baja la de  $10 \mu\text{M}$ .

La tabla 11 muestra las concentraciones de cinetina con las cuales se confirma que ocurre la inhibición de la respuesta de los linfocitos, y además, que el intervalo es más reducido, pues a  $500 \mu\text{M}$  la inhibición es completa.

En otra repetición, los resultados, que se encuentran en la tabla 12, fueron similares, confirmando así que son reproducibles en este sistema.

Para poder establecer una comparación entre la respuesta encontrada para linfocitos de sangre periférica completa de humano y la de linfocitos de otro animal, -



TABLA 10

Incorporación de timidina tritiada por los linfocitos de HUMANO cultivados a partir de sangre periférica completa en un medio que contiene CI-NETINA a diferentes concentraciones. Cultivo número 588. CON FITOHEMA--GLUTININA.

CONCENTRACION ( $\mu$ M)	dpm promedio	$\bar{Sx}$	$\bar{Ex}$	$\bar{tEx}$
0.0	43,907.9	9,611.6	5,549.4	12.6
0.000001	42,841.4	12,558.4	7,250.6	16.9
0.00001	42,531.7	7,641.3	4,411.7	10.4
0.0001	40,455.2	7,270.1	4,197.4	10.4
0.001	30,941.3	1,186.1	684.8	2.2
0.01	38,138.6	6,377.2	3,681.9	9.7
0.1	41,090.1	5,468.1	3,157.0	7.7
1.0	30,006.5	6,590.2	3,804.9	12.7
10.0	39,714.8	9,520.4	5,946.6	15.0
100.0	8,978.1	2,154.9	1,244.1	13.9
1,000.0	86.1	1.9	1.1	1.4
10,000.0	104.2	3.0	1.7	1.6

TABLA 11

Incorporación de timidina tritiada por los linfocitos de HUMANO cultivados a partir de sangre periférica completa en un medio que contiene CI-RETINA a diferentes concentraciones. Cultivo número 589. CON FITOHEMA--GLUTININA.

CONCENTRACION ( $\mu$ M)	cpm promedio	$\bar{Sx}$	$\bar{Ex}$	$\bar{Ex}$
0.0	34,626.2	9,888.5	5,709.1	16.5
10.0	29,412.4	6,578.3	3,798.0	12.9
50.0	18,762.6	7,921.8	4,573.7	24.4
100.0	9,991.2	4,989.8	2,880.9	28.8
500.0	69.1	7.9	4.6	6.7
1,000.0	88.9	3.6	2.1	2.4

TABLA 12

Incorporación de timidina tritiada por los linfocitos de HUMANO cultiva  
dos a partir de sangre periférica completa en un medio que contiene CI-  
NETINA a diferentes concentraciones. Cultivo número 590. CON FITOHEMA--  
GLUTININA.

CONCENTRACION ( $\mu$ M)	dpm promedio	$\bar{Sx}$	$\bar{Ex}$	$\bar{1Ex}$
0.0	33,724.6	9,932.7	5,734.6	17.0
10.0	24,858.5	5,016.8	2,896.5	11.7
50.0	14,212.2	2,416.4	1,395.1	9.8
100.0	7,441.0	1,377.8	795.5	10.7
500.0	69.2	8.3	4.8	6.9
1,000.0	83.5	20.3	11.7	14.0

se procedió a hacer un cultivo de linfocitos de borrego aislados con Ficoll-paque. Los resultados fueron muy vagos (tabla 13), pues las variaciones entre los 3 valores de cada tratamiento eran muy grandes, sugiriendo, a pesar de esto, que el efecto de la cimetina en este caso era el de estimulación.

Como ésta era la segunda vez que al usar linfocitos de borrego, teníamos respuestas diferentes a las de los linfocitos de humano, lo pertinente era repetir la experiencia. Se hicieron algunas modificaciones en cuanto a las concentraciones empleadas y se utilizó tanto sangre periférica completa, sembrada directamente, como linfocitos aislados a partir de sangre periférica completa, por medio de Ficoll-paque (tablas 14 y 15).

Esta vez, en ambos casos obtuvimos inhibición de la respuesta de los linfocitos, aunque los cultivos de los linfocitos aislados mostraron mayor variabilidad.

Fue evidente entonces, que la cimetina estaba afectando en la misma forma y a las mismas concentraciones, la respuesta de los linfocitos de borrego en cultivo, - pero quedaba todavía una duda.

A una concentración de cimetina de 10  $\mu$ M, la más baja que se estaba utilizando, parecía haber estimulación de la respuesta de los linfocitos aislados, 151% con -- respecto al testigo, sin ser significativa, que también se presentó en el cultivo de linfocitos de borrego aislados que se había realizado con anterioridad, donde se observó una incorporación del 256% comparada con el testigo (cultivo 591, tabla 13).

La posibilidad de un efecto enmascarado por la diferencia entre la concentración 10  $\mu$ M y la que le seguía en orden ascendente, 50  $\mu$ M, nos obligó a realizar 2 cultivos más, con linfocitos aislados y con sangre completa de borrego, probando concentraciones alrededor de 10

TABLA 13

Incorporación de timidina tritiada por los linfocitos de BORREGO aisla-  
dos a partir de sangre periférica completa, cultivados en un medio que  
contiene CINETINA a diferentes concentraciones. Cultivo número 591. CON  
FITOHEMAGLUTININA.

CONCENTRACION ( $\mu$ M)	dpm promedio	$S\bar{x}$	$F\bar{x}$	$\%E\bar{x}$
0.0	13,006.3	4,156.0	2,399.5	18.4
10.0	29,374.3	14,407.2	8,318.0	28.3
50.0	24,940.5	5,366.4	3,098.3	12.4
100.0	19,157.5	6,233.7	3,599.0	18.8
500.0	14,013.7	7,173.8	4,141.8	29.6
1,000.0	13,041.2	7,688.9	4,439.2	34.0

TABLA 14

Incorporación de timidina tritiada por los linfocitos de BORREGO cultivados a partir de sangre periférica completa en un medio que contiene CINETINA a diferentes concentraciones. Cultivo número 592. CON FITOHEMA GLUTININA.

CONCENTRACION ( $\mu$ M)	dpm promedio	$S\bar{x}$	$E\bar{x}$	$\%E\bar{x}$
0.0	5,061.9	254.1	146.7	2.9
10.0	4,587.6	1,683.3	971.9	21.2
50.0	4,329.0	2,727.3	1,574.6	36.4
100.0	3,151.6	1,249.6	721.5	22.9
150.0	2,085.3	376.2	217.2	10.4
200.0	1,409.3	374.7	216.3	15.3
250.0	1,147.6	893.4	515.8	44.9
300.0	698.7	110.9	64.0	9.2
350.0	190.6	54.7	31.6	16.6
400.0	93.7	11.8	6.8	7.3
450.0	111.5	14.2	8.2	7.4

TABLA 15

Incorporación de timidina tritiada por los linfocitos de BORREGO aisla-  
dos a partir de sangre periférica completa, cultivados en un medio que  
 contiene CINETINA a diferentes concentraciones. Cultivo número 593. CON  
 FITOHEMAGLUTININA.

CONCENTRACION ( $\mu$ M)	dpm promedio	$\bar{Sx}$	$\bar{Ex}$	% $\bar{Ex}$
0.0	28,042.1	8,168.2	4,715.9	10.8
10.0	42,318.7	24,153.8	13,945.2	33.0
50.0	24,437.3	1,501.0	866.6	3.5
100.0	24,314.3	1,980.8	1,102.0	4.5
150.0	21,463.9	4,069.4	2,349.5	10.9
200.0	30,788.3	7,362.3	4,250.6	13.8
250.0	19,989.0	10,423.0	6,017.7	30.1
300.0	549.7	26.0	15.0	2.7
350.0	1,330.0	468.0	270.2	20.3
400.0	2,243.8	1,859.3	1,073.5	47.8
450.0	684.8	351.6	203.0	29.6

$\mu\text{M}$ .

Las tablas 16 y 17 muestran esas concentraciones y los resultados obtenidos. No hubo en ningún caso estimulación por arriba de los testigos, aunque se presentaron valores individuales más altos, que sin embargo no son significativos y sólo contribuyen a aumentar la dispersión del promedio. Otra vez, los cultivos de linfocitos aislados proporcionaron datos con mucha variabilidad.

Para estos dos cultivos, 594 y 595, se realizó además, un conteo del número de células vivas a 24, 48 y 72 horas, utilizando el criterio de exclusión del Azul Tripán. Empleando una concentración 50  $\mu\text{M}$  de cinetina, que en los cultivos de linfocitos de humano producen inhibición de la incorporación de timidina tritiada en aproximadamente un 50%, se encontró que el porcentaje de células vivas entre los testigos y los tratamiento es similar, alrededor de un 70%. Este dato, sin embargo, proviene de un solo cultivo, por lo que es necesario repetir el conteo en un número conveniente de cultivos para tener valores con significado estadístico.

En la tabla 18 se presenta un resumen del efecto de la cinetina sobre los linfocitos de humano obtenidos de sangre periférica completa. Este se hizo promediando las respuestas encontradas en los cultivos números 588, 589 y 590, expresándolas como porcentaje del control. Además, se pueden ver los valores calculados a partir de los experimentales, por medio del método de mínimos cuadrados.

De acuerdo al ajuste, la mejor correlación, es decir, el grado con que las dos variables se relacionan, se tiene cuando la concentración se transforma a su logaritmo base 10. En esta forma se encontró que la respuesta de los linfocitos se describe por una curva don-



TABLA 16

Incorporación de timidina tritiada por los linfocitos de BORREGO cultivados a partir de sangre periférica completa en un medio que contiene CINETINA a diferentes concentraciones. Cultivo número 594. CON FITOHEMA GLUTININA.

CONCENTRACION ( $\mu$ M)	dpm promedio	$S\bar{x}$	$E\bar{x}$	$\%E\bar{x}$
0.0	41,628.1	10,942.5	6,317.7	15.2
6.0	28,944.6	3,363.4	1,941.9	6.7
8.0	24,924.0	5,158.3	2,978.1	11.9
10.0	30,618.0	8,170.4	4,717.2	15.4
12.0	15,167.2	4,176.1	2,411.1	15.9
14.0	12,865.8	8,090.2	4,618.9	35.9

TABLA 17

Incorporación de timidina tritiada por los linfocitos de BORREGO aisla-  
dos a partir de sangre periférica completa, cultivados en un medio que  
 contiene CINETINA a diferentes concentraciones. Cultivo 595. CON FITOHE  
 MAGLUTININA.

CONCENTRACION ( $\mu$ M)	dpm promedio	$S\bar{x}$	$E\bar{x}$	$\%E\bar{x}$
0.0	22,748.9	4,531.6	2,616.3	11.5
6.0	27,310.1	27,607.4	16,054.6	58.8
8.0	15,442.4	3,885.4	2,243.2	14.5
10.0	17,110.7	1,200.6	693.2	4.1
12.0	20,679.6	7,298.7	4,213.9	20.4
14.0	16,808.8	2,097.5	1,211.0	7.2

TABLA 18

Efecto de la CINETINA sobre la capacidad de respuesta de los linfocitos de HUMANO cultivados a partir de sangre periférica completa en un medio completo CON FITOHEMAGLUTININA. Resumen de 3 cultivos: 588, 589 y 590. Los valores experimentales y teóricos, están expresados en porcentaje del control y el logaritmo de la concentración, en escala logarítmica base 10. Los valores calculados ( $\hat{y}$ ) se obtuvieron por el método de mínimos cuadrados a partir de los experimentales.

CONCENTRACION ( $\mu$ M)	CONCENTRACION (log)	$\bar{y}$	$S\bar{y}$	$E\bar{y}$	$\Delta E\bar{y}$	$\hat{y}$
0.0	----	100.0	23.3	7.8	7.8	-
10.0	1.00	83.0	17.8	5.9	7.1	77.5
50.0	1.70	48.2	16.5	6.7	13.9	47.4
100.0	2.00	23.8	4.9	1.6	6.7	34.5
500.0	2.69	0.2	0.0	0.0	0.0	4.4
1,000.0	3.00	0.2	0.05	0.03	14.2	-8.5

CORRELACION = -0.98  
 PENDIENTE = -43.0  
 INTERCEPTO = 120.5

De acuerdo a la prueba de  $\chi^2$ , en este ajuste NO hay diferencias significativas entre los valores experimentales y los calculados, teniendo una probabilidad superior a 0.995 de que las diferencias sean debidas al azar.

de  $Y = -43.0 (\log X) + 120.5$  (figuras 6 y 7).

La prueba de bondad de ajuste nos indica que no hay diferencias significativas entre los valores experimentales y los calculados, con una probabilidad superior a 0.995 de que las diferencias sean debidas al azar.

En la tabla 19, se muestran los datos del cultivo 592, realizado con linfocitos de sangre periférica de borrego. Los valores se calcularon de la misma manera que en caso anterior, encontrando que la ecuación que describe el comportamiento de estos linfocitos es  $Y = -62.2 (\log X) + 171.1$  (figura 8). Aquí es claro que el ajuste no es bueno, pues los valores calculados se alejan mucho de los experimentales en la mayoría de los puntos graficados. Esto lo indica la prueba de  $\chi^2$ , ya que la probabilidad de que las diferencias sean debidas al azar es mínima, apenas del 0.005. Hay que tomar en cuenta que en este caso sólo son los datos de un cultivo y solamente se presentan como ejemplo de que el comportamiento posiblemente es semejante al de los linfocitos de humano.

Los linfocitos aislados de sangre completa de borrego, tienen también este patrón de comportamiento, tal como se muestra en la tabla 20. Al graficar estos valores (figura 9), lo podemos observar. La ecuación que describe esta relación es  $Y = -86.9 (\log X) + 249.9$ . Tampoco encontramos un ajuste satisfactorio, como lo indica la prueba de  $\chi^2$ , y nuevamente se debe a que son datos de un solo cultivo y además, a que como ya se ha dicho, la variabilidad interindividual es muy grande.

Solamente para el caso de los linfocitos de humano, mostramos los datos graficados como logaritmo de la concentración, donde se puede ver que la relación está bien descrita por la recta  $Y = -43.0 (X) + 120.5$  (figura 7).

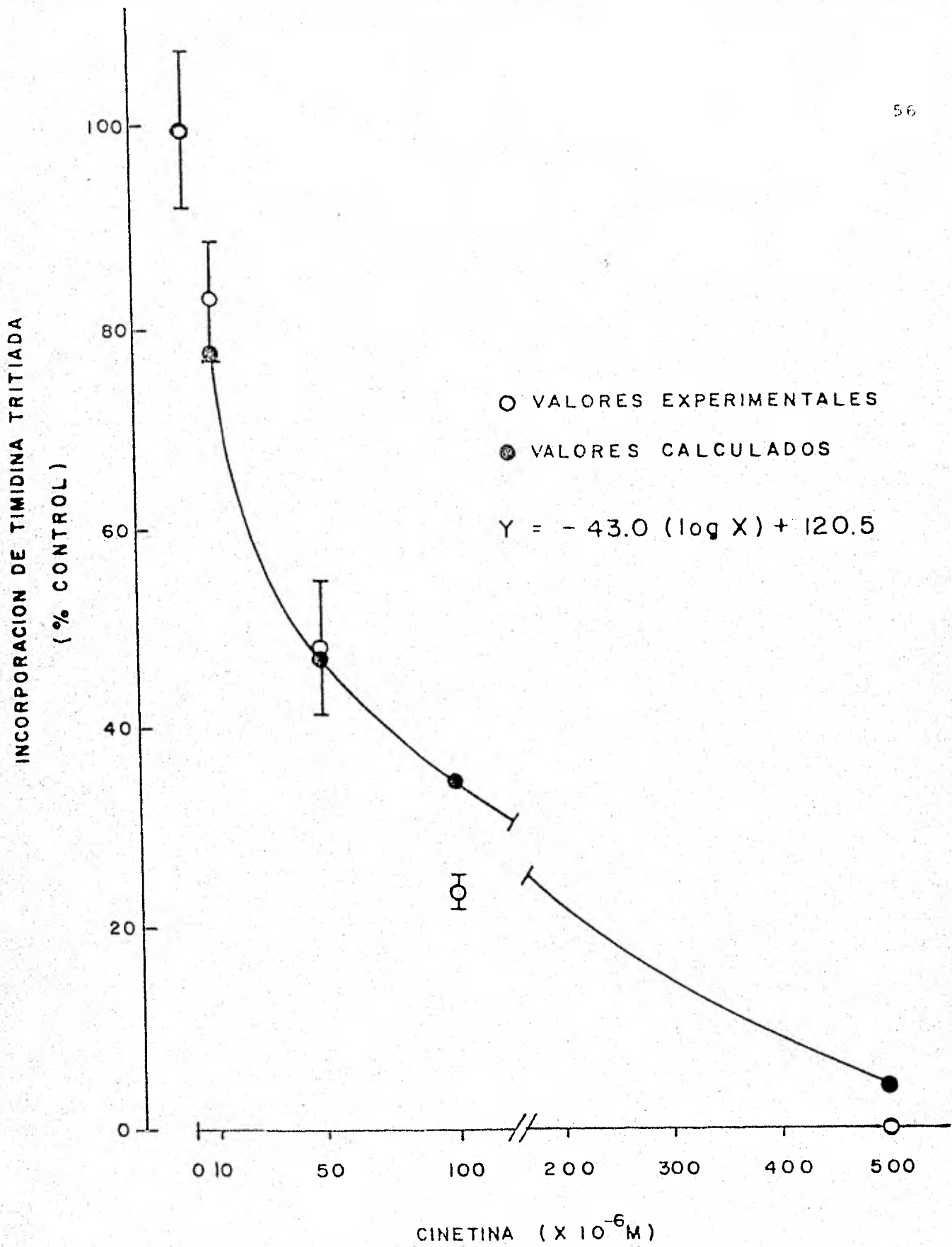


Figura 6. Resumen del efecto de la cinetina sobre los linfocitos de HUMANO.

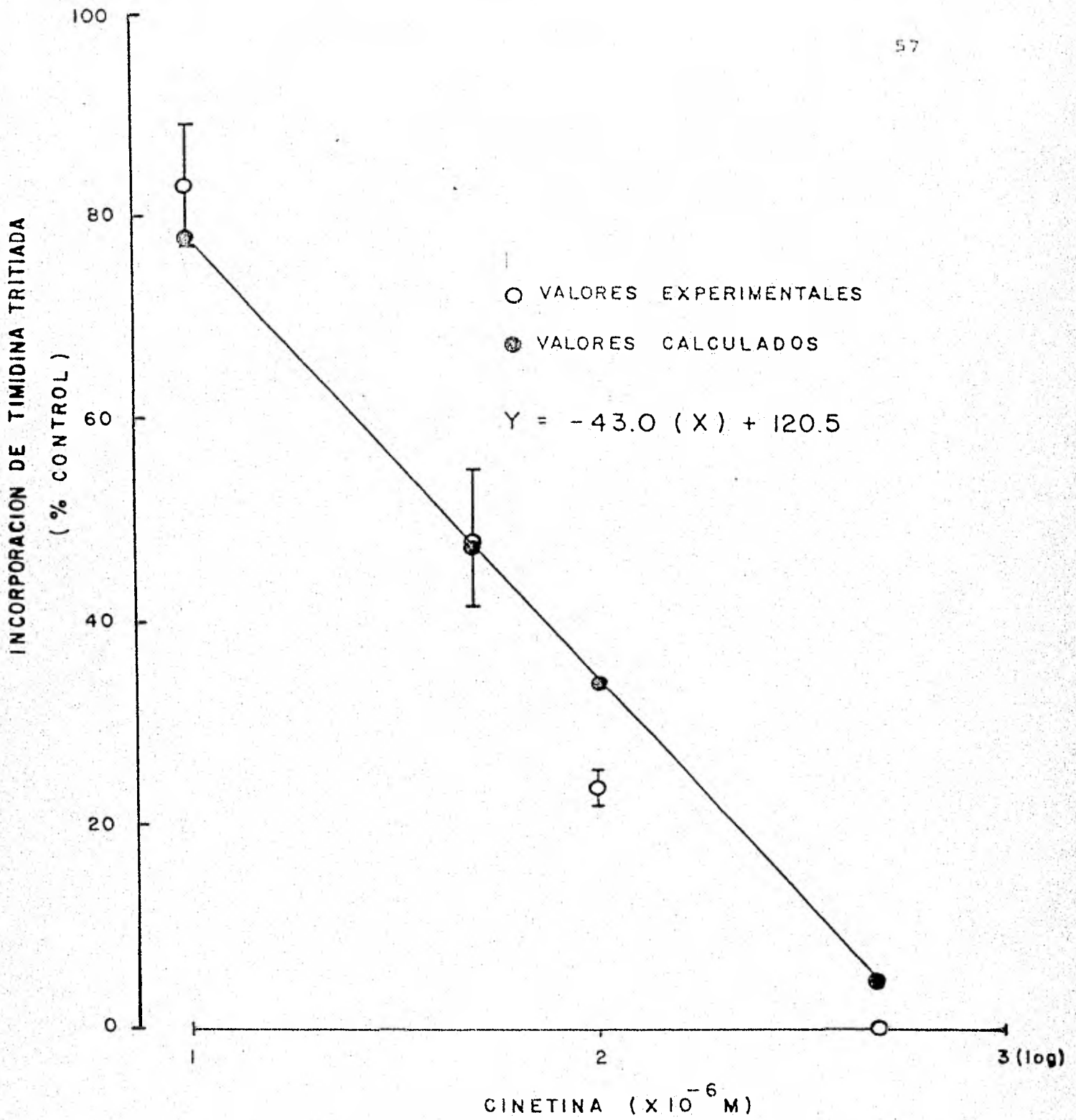


Figura 7. Resumen del efecto de la cinetina sobre los linfocitos de HUMANO.

TABLA 19

Efecto de la CINETINA sobre la capacidad de respuesta de los linfocitos de BORRIGO cultivados a partir de sangre periférica completa en un medio completo CON FITOHEMAGLUTININA. Cultivo número 592. Los valores experimentales y teóricos están expresados como porcentaje del control y el logaritmo de la concentración, en escala logarítmica base 10. Los valores calculados ( $\hat{y}$ ) se obtuvieron por el método de mínimos cuadrados a partir de los experimentales.

CONCENTRACION ( $\mu$ M)	CONCENTRACION (10 <sup>n</sup> )	$\bar{y}$	$S\bar{y}$	$E\bar{y}$	$\pm E\bar{y}$	$\hat{y}$
0.0	----	100.0	5.0	2.9	2.9	-
10.0	1.00	90.6	33.2	19.2	21.2	108.2
50.0	1.70	85.5	53.9	31.1	36.4	65.4
100.0	2.00	82.3	24.7	14.3	22.9	46.7
150.0	2.18	41.2	7.4	4.3	10.4	35.7
200.0	2.30	27.8	7.4	4.3	15.3	28.0
250.0	2.40	22.7	17.7	10.2	44.9	21.9
300.0	2.48	13.0	2.2	1.3	9.2	17.0
350.0	2.54	3.8	1.1	0.6	16.7	12.9
400.0	2.60	1.9	0.2	0.1	11.0	9.3
450.0	2.65	2.2	0.3	0.2	7.9	6.1

CORRELACION = -0.94  
 PENDIENTE = -62.2  
 INTERCEPTO = 171.1

De acuerdo a la prueba de  $\chi^2$ , hay diferencias significativas entre los valores experimentales y los calculados, teniendo una probabilidad inferior a 0.005 de que las diferencias sean debidas al azar.

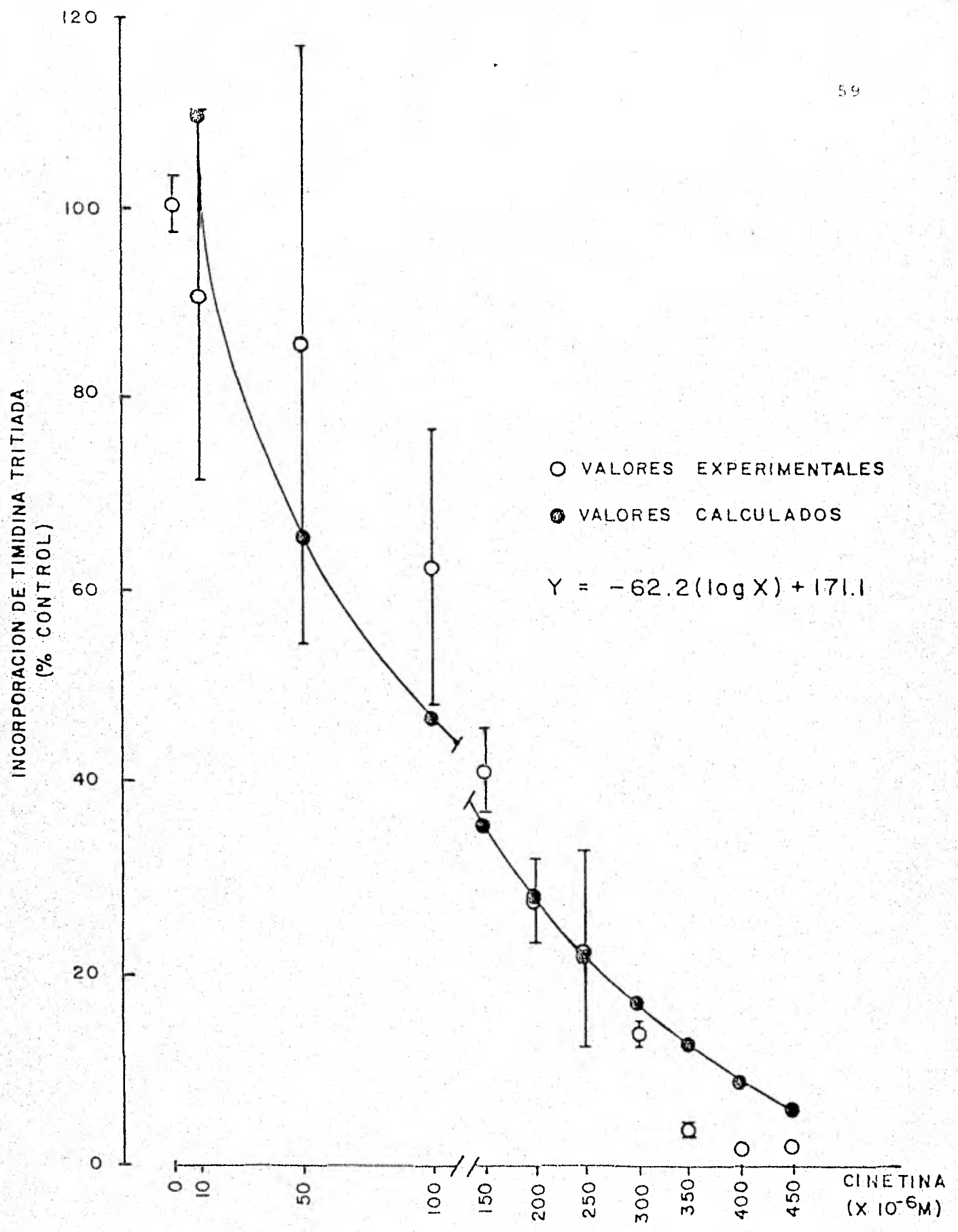


Figura 8. Efecto de la cinetina sobre los linfocitos de BORREGO.



TABLA 20

Efecto de la CINETINA sobre la capacidad de respuesta de los linfocitos aislados a partir de sangre periférica completa de BORNEGO y cultivados en un medio completo con FITOHEMAGLUTININA. Cultivo número 593. Los valores experimentales y teóricos están expresados como porcentaje del control y el logaritmo de la concentración, en escala logarítmica base 10. Los valores calculados ( $\hat{y}$ ) se obtuvieron -- por el método de mínimos cuadrados a partir de los experimentales.

CONCENTRACION ( $\mu$ M)	CONCENTRACION (log)	$\bar{y}$	$S\bar{y}$	$E\bar{y}$	$4E\bar{y}$	$\hat{y}$
0.0	----	100.0	29.1	16.8	16.8	-
10.0	1.00	150.9	86.1	49.7	31.0	163.0
50.0	1.70	87.1	5.4	3.1	3.5	102.0
100.0	2.00	87.8	7.9	4.6	5.2	76.1
150.0	2.18	76.5	14.5	8.4	10.9	60.8
200.0	2.30	109.2	23.2	14.6	13.3	49.9
250.0	2.40	71.3	37.2	21.5	30.1	41.5
300.0	2.48	2.0	0.1	0.1	3.3	34.6
350.0	2.54	4.4	2.2	1.3	28.5	28.8
400.0	2.60	8.0	6.6	3.8	47.9	24.0
450.0	2.65	2.4	1.3	0.7	30.1	19.3

CORRELACION = -0.84  
 PENDIENTE = -86.9  
 INTERCEPTO = 249.95

De acuerdo a la prueba de  $\chi^2$ , hay diferencias significativas entre los valores experimentales y los calculados, teniendo una probabilidad inferior a 0.005 de que las diferencias sean debidas al azar.

INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA  
(% CONTROL)

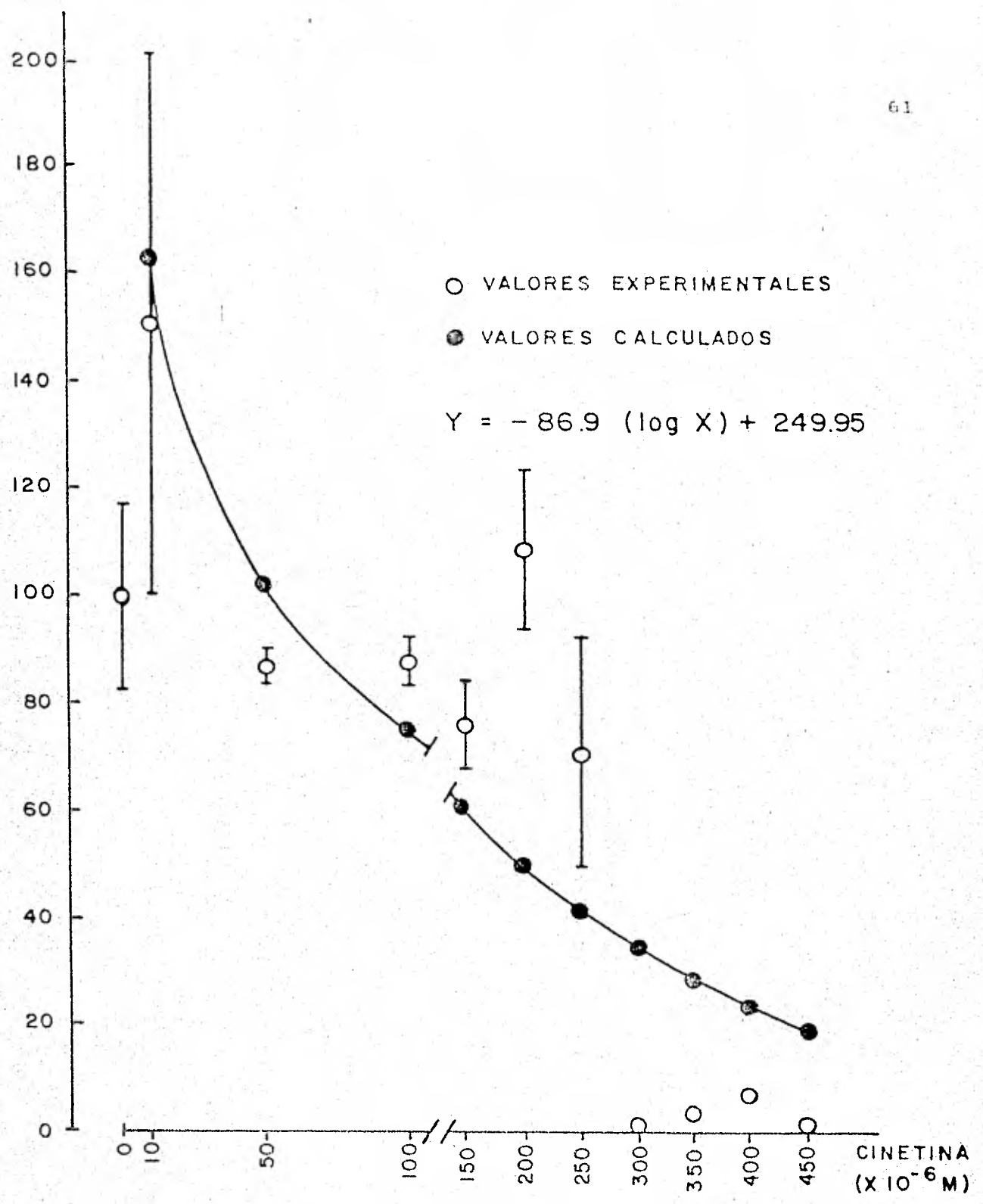


Figura 9. Efecto de la cinetina sobre los linfocitos de BORREGO aislados.

#### 4. DISCUSION.

Los procesos de comunicación se dan a niveles diversos. En este caso, el de interés es el de la relación establecida entre la célula y su medio. Un sistema para el que se requiere la presencia de estructuras celulares que le permitan reconocer a determinadas señales. Estas pueden proceder tanto de la parte abiótica como de la biótica de medio ambiente y son en general de dos tipos: físicas y químicas.

Para que una señal tenga efecto sobre la célula, ésta deberá poseer receptores adecuados o bien, la señal misma deberá ser capaz de interferir directamente con las actividades celulares.

Una molécula receptora es de naturaleza protéica (Kaplan, 1981) y dentro de su estructura posee sitios capaces de interactuar con otras moléculas portadoras del mensaje, llamadas mediadores. Por el reconocimiento preciso, las moléculas del receptor experimentan un cambio de conformación, que les hace posible intervenir en los procesos celulares (Kaplan, 1981) incluso a nivel génico (O'Malley y Schader, 1976). La vía puede ser directa, es decir, ya no hay otros intermediarios entre la señal y el efecto o bien, participar elementos tales como los nucleótidos cíclicos, reconocidos como mensajeros secundarios y aún otros, como algunas iones, el calcio por ejemplo (Rubenstein, 1980).

El resultado final es que la célula, de una u otra manera, en la mayoría de los casos responde a las señales, ajustando su actividad a las condiciones imperantes en el medio.

Por tal razón, es importante que la producción y estructura tanto de las señales como de los receptores sean correctas, pues alguna falla en estos aspectos, -llevan a la célula a una condición de "engaño", quedan

de imposibilidad de responder correctamente y en los más de los casos, en una posición desfavorable debido a que se rompen las posibilidades de comunicación.

Si bien es cierto que el concepto de hormona lleva implícita una acción a distancia, lo más importante de este tipo de reguladores no es la distancia que tienen que viajar para llevar su mensaje, sino que son capaces de desencadenar una respuesta concreta y proporcional a la intensidad de la señal.

Si se piensa en una molécula cuya acción sea la de disparar o bloquear alguna ruta metabólica general, sus células blanco se vuelven prácticamente infinitas; tantas como células realicen esa actividad.

Ahora bien, si una molécula funciona como portadora de un mensaje, sólo cuando es reconocida por otra y de esta forma desencadena una serie de procesos, entonces sí se tiene la posibilidad de tener la respuesta específica.

Esto solamente se da en sistemas cuyas células poseen receptores específicos para esas señales, y a su vez, es lo que determina a una célula blanco.

Planteado de esta forma, para considerar a una molécula como una hormona, debe tener posibilidades de ser reconocida específicamente por los receptores de una célula; de otra manera, sólo se le puede considerar un mero modulador de las actividades celulares.

Ahora bien, aunque no hayan sido aislados los receptores para las hormonas vegetales (Wareing y Phillips, 1978), o bien su identificación se haya dificultado, como en el caso de los receptores para las auxinas (Hanson y Trewavas, 1982), esto indica que cuando menos en algunos casos es posible pensar en la presencia de estos elementos en las células de las plantas. Como hemos mencionado anteriormente, en muchos de los

casos, la modificación de la estructura básica de una molécula considerada hormona, altera también sus posibilidades de acción, y esto tal vez sea el efecto de impedir el reconocimiento adecuado por parte del receptor. Por su forma de acción, es posible que las hormonas de los vegetales, en casos particulares, funcionen como tales, y en la mayoría como moduladores. Ejemplo de lo primero tal vez sería la inducción de la síntesis de alfa-amilasa, por parte de las giberelinas y la producción de elementos de la pared vegetal y el proceso mismo de la elongación promovida por las auxinas. De lo segundo, se pueden mencionar procesos como la floración, la vernalización, la dormancia, etc.

En cuanto a las citocininas, sólo en el proceso de envejecimiento de los órganos de los vegetales, parece claro su papel antagónico en condiciones experimentales; en otros, el de la división celular por ejemplo, parecería que su efecto es sinérgico con las auxinas, pues en los casos en que se requiere de ambas, ninguna por separado puede provocar el fenómeno. Baste recordar que la definición misma de las citocininas incluye la necesidad de una fuente de auxinas (Horgan, 1978).

Para nuestro trabajo, es necesario considerar a las citocininas como factores que pueden funcionar como señales específicas y, a la vez, por ellas mismas - modificar algunas de las actividades celulares.

A los linfocitos tal vez se les podría tomar como uno de los mejores ejemplos en donde una célula es capaz de reconocer a una molécula, en virtud de los receptores que posee y más aún, de producir una molécula que corresponde exactamente a la configuración química de la señal, el anticuerpo, o algunas menos específicas, las linfocinas.

Aquí, la comunicación se produce en dos fases: - el reconocimiento del antígeno por una inmunoglobulina y la producción en grandes cantidades del anticuerpo. Un defecto en alguno de estos dos pasos conduce, primero, a no reconocer un elemento extraño, generalmente - productor de algún daño al organismo y, segundo, a que aún cuando se pueda reconocer, no se tengan posibilidades de neutralizarlo.

Recordando siempre la gran distancia que existe entre un cultivo de células y lo que sucede in vivo, se pueden hacer algunas consideraciones sobre los efectos de determinadas moléculas, cuando se aplican a un cultivo de linfocitos que han sido estimulados por una lectina.

En algunos casos, se piensa que una sustancia - puede modificar varias de las funciones de estas células, como en el caso de la taurina, un aminoácido, que probablemente modifique el flujo de iones al través de la membrana, por actuar sobre alguna bomba iónica y de esta manera, perturbe el balance necesario para que la división celular se lleve a cabo, sucediendo por tanto la inhibición de la respuesta de los linfocitos ante - un antígeno (Pasantes-Morales y León-Cázares, 1981).

Ostrosky-Shejet (1972), observó que puede haber una estrecha relación entre la variación de los nive--les de las hormonas esteroideas, durante el ciclo mens--trual de la mujer y la imposibilidad práctica de provo--car la estimulación de los linfocitos in vitro con fitohemaglutinina. Al parecer, conforme avanza el ciclo, los linfocitos se van volviendo "indiferentes" a la --presencia de la lectina en el medio de cultivo.

Simulando en el cultivo las concentraciones de - estradiol y/o progesterona, con linfocitos de humano - de sexo masculino, Peña-Rangel (1982) ha observado un

comportamiento similar.

Todo esto nos demuestra que el proceso de comunicación no es simple, pues para que una señal funcione eficientemente como portadora de un mensaje, es necesario que el destinatario esté en posibilidades de recibirla, de otra forma, a final de cuentas, el efecto será igual tanto si hay mensaje como si no lo hay.

En general, cuando se habla de mediadores, lo anterior es muy importante, pues transforma el concepto de célula blanco en algo dinámico; en una entidad que no necesariamente siempre está dispuesta a recibir la señal, o bien, que su capacidad de respuesta varía, seguramente como el resultado de la interacción con otro tipo de mensajes y las condiciones medio-ambientales - en general.

Cuando en el estudio de los procesos biológicos se llega al nivel celular, aquellas diferencias que parecen tan obvias entre los organismos de los diferentes reinos ya no lo son tanto. Nos encontramos con una serie de actividades que las podríamos denominar como básicas e inherentes a la célula, sea cual sea su tipo, tal como el caso de las rutas de síntesis de esteroides por la vía de los terpenos, que aparentemente se da en todo tipo de células (Barksdale, 1969; Steward y Krikorian, 1971; Grunwald, 1975; Geuns, 1978, - 1982; Warcing y Phillips, 1978).

Igual sucede con la capacidad que tienen las membranas celulares, de mantener separadas a las cargas a uno y otro lado, teniendo por tanto una polarización - que es modificada por diversos estímulos, lo cual provoca una hiper o depolarización. Aún cuando este fenómeno es el que hace posible que las neuronas reciban y despachen mensajes, sucede en otras células, las de los vegetales por ejemplo, aunque no se pueda establecer una función específica (Scott, 1962).

Es claro entonces, que en este nivel son más los puntos que tienen en común las células, que las diferencias que las separan.

Dentro de esta idea, resulta lógico pensar que las moléculas que pueden modular la respuesta de una célula, lo pueden hacer en otras, independientemente del tipo que se trate; mas prever la respuesta que dará una célula cuando entra en contacto con un modulador de otro sistema, es algo prácticamente imposible, ya que en la mayoría de los casos no se conoce, ni siquiera aproximadamente el papel del mediador en el sistema original y las múltiples interacciones que una molécula puede tener en otros tantos procesos de la célula.

Por lo regular, se parte en estos casos de suponer un efecto parecido al observado en el sistema original, que en el caso nuestro, sería el esperar que la cinetina promoviera la división celular de los linfocitos.

De hacerlo así, habiéramos tenido que asumir 2 posibilidades: que la cinetina pudiera actuar como antígeno y así, estimular a los linfocitos, o bien, que sin necesidad de ser reconocida por las inmunoglobulinas, actuara modulando la serie de mecanismos que conducen a la célula a la fase de división dentro del ciclo celular.

Hay que dejar bien claro, que en este caso, la célula cultivada no es una célula que se divide simplemente por no haber una inhibición por contacto con otras. La respuesta es más compleja, pues no es la falta de una señal la que dispara el proceso de división, sino todo lo contrario. Dentro de su especialización, esta capacidad es definitivamente importante.

A este respecto, los resultados son contundentes.



La cinetina, en el sistema de cultivo de linfocitos de borrego, no produjo la división en ausencia de la fito hemaglutinina, lo que se observa en la baja incorporación de timidina tritiada, cercana a la radiactividad de fondo. En cambio, sí inhibió la capacidad de respuesta a la lectina de los linfocitos de humano y de borrego, aislados o no, en un intervalo de concentraciones que va de 10 a 500  $\mu$ M. Si bien es un rango amplio, encaja dentro de las características de las curvas de dosis-respuesta de las hormonas vegetales (Wareing y Phillips, 1978).

Es probable que el efecto sea similar al aplicar adenina como se observó en los experimentos iniciales.

Veamos ahora a cuantos niveles pudo haber actuado la cinetina:

- a) Interactuar directamente con el antígeno en el medio y evitar así la estimulación.
- b) Interactuar con los receptores de superficie de los linfocitos, e incapacitar así a las células en el reconocimiento del antígeno. Vogelstein y colaboradores -- (1982), proponen que para que una molécula actúe como antígeno, es necesario que por medio de sus grupos haptenos, provoque la concentración de los receptores de superficie hasta formar una unidad, llamada inmunón. Si se agregan grupos haptenos al medio donde crecen los linfocitos en cultivo, y posteriormente se añade la substancia antigénica, los receptores ya han sido ocupados, de una forma aislada, sin formarse el inmunón y por tanto, no hay respuesta de estimulación ante el antígeno.
- c) Modificar el balance de algunos iones, entre el interior y el exterior celular, como el calcio, del cual se sabe, es importante su concentración para iniciar la división (Berriège, 1975; Ponce-Díaz, 1979). Esto -

sería suponer una acción semejante a la de la taurina (Pasantes-Morales y León-Cázares, 1981) y estaría de acuerdo a la observación de que la cinetina altera el intercambio iónico de la membrana de las células de los vegetales (Baloue, 1978). Para las auxinas y probablemente otras hormonas vegetales, se ha encontrado que es en esta forma que promueven el crecimiento o realizan una actividad de regulación, como el ácido abscísico al regular el flujo de potasio en las células de los estomas (Wareing, 1978; Hanson y Trewavas, 1982).

d) Actuar en el interior como mensajero secundario, tal como el monofosfato de adenosina cíclico, alterando la concentración intracelular de éstos. Así, el manejo de las señales a nivel interno sería modificado y se impediría el inicio de las actividades disparadas por la estimulación. Para el caso de las células vegetales, se piensa que esta podría ser una forma de acción de las citocininas (Wareing y Phillips, 1978), ya sea funcionando como mensajero secundario o influyendo sobre su producción.

y e) Bloquear la síntesis de proteínas en la fase de crecimiento previa a la síntesis de ADN, tal vez por impedir el proceso de traducción, al interactuar con los ribosomas.

Esto evidentemente es especulativo y la única manera de obtener más información, es la de experimentar aún más, utilizando el cultivo de linfocitos, y tratar de encontrar las respuestas a estas conjeturas.

En este trabajo, se pudo observar que las concentraciones de citocininas que comúnmente se aplican a los cultivos de tejidos vegetales, no producen efecto alguno en los linfocitos, excepción hecha de las concentraciones superiores a 1 mg de cinetina por litro

de medio de cultivo, las cuales caen dentro del intervalo capaz de provocar la inhibición (tabla 18).

En cuanto a las concentraciones de citocinas - reportadas como productos de excreción por los humanos normales, tampoco producen efecto alguno. Sin embargo, de acuerdo a nuestros cálculos iniciales, la reportada para pacientes de cáncer,  $2.7 \mu\text{M}$ , sólo es ligeramente menor a las reportadas en este trabajo, como inhibidoras de la respuesta de los linfocitos por arriba de una concentración  $10 \mu\text{M}$  (tabla 18).

Comparando los efectos observados cuando se aplicó cinetina en concentraciones semejantes, a cultivos de linfocitos aislados y de sangre completa, es evidente que el efecto es sobre alguna de las actividades de los linfocitos, pues aún cuando la respuesta es inhibida más fuertemente en los cultivos donde se siembra -- sangre completa, el efecto definitivamente es perceptible en los linfocitos aislados. Muy probablemente la presencia de las demás células del tejido sanguíneo en el primer caso, hacen que el fenómeno sea más intenso.

Resulta importante resaltar dos cosas con respecto a los resultados obtenidos.

Los niveles de cinetina que hacen que la incorporación de timidina tritiada por los linfocitos disminuya, de un 100% a prácticamente 0%, son sólo ligeramente mayores a las cantidades reportadas por Borek *et al.* (1977) para la  $\text{N}_2, \text{N}_2$ - dimetilguanosina, que es excretada por personas que padecen de algún tipo de tumores y por ratas con tumores de vejiga inducidos.

Aunque las concentraciones pueden ser diferentes en el organismo, pues no necesariamente la cantidad excretada es semejante a la existente en los tejidos y puede haber in vivo alguna forma de inactivación de estas moléculas, resulta interesante que haya un tipo de

substancias, con las cuales los linfocitos se puedan encontrar en el organismo, que ya sea en el exterior de la membrana o hacia el interior de la célula, puedan impedir que las células encargadas de dar la respuesta inmune, respondan adecuadamente, ya sea por no percibir la señal, o por estar impedidas en responder a ésta.

Para finalizar, haremos la revisión de algunas ideas respecto a los organismos vegetales y animales, -partiendo para ello de lo planteado por Steward y Krikorian (1971):

"En contraste marcado con los animales de sangre caliente, las plantas superiores exponen sus células y hacen mayor uso de los cambios, mucho más amplios, del medio ambiente inmediato a ellas".

"No hay en el cuerpo de los vegetales nada comparable a la constancia del medio ambiente interno, la llamada homeostasis, representada por la composición de la sangre, por el estrecho control de la temperatura y el contenido de agua dentro de límites reducidos y por las herramientas protectoras rigurosas contra 'substancias extrañas' representada por la relación antígeno-anticuerpo. Estos hechos enfatizan que hay muchas diferencias inherentes y posibilidades aún no descubiertas de regulación química del crecimiento de las plantas".

Como lo hemos planteado a lo largo de este trabajo, nuestra posición es que si hién, en el nivel celular es imposible marcar grandes diferencias entre las células provenientes de organismos de reinos distintos, las relaciones establecidas entre los seres pluricelulares y su medio, de ninguna manera tendrían por qué ser idénticas en esencia.

Estamos seguros que el curso evolutivo de los or

ganismos, los ha llevado a establecer estrategias de contacto con el medio de diversas formas, que sin embargo pueden coincidir. Esto significa que cuando estudiemos los procesos que se llevan a cabo en los individuos, hemos de tratarlos necesariamente como casos diferentes, aún cuando veamos la ocurrencia de, por mencionar el caso dentro del marco de referencia de este estudio, moléculas semejantes. No podemos sencillamente asumir que tal o cual sustancia, cuyo papel en un sistema es conocido, tenga la misma función en otro. Se han encontrado moléculas como la serotonina y la acetilcolina en plantas como la sensible, Mimosa pudica (Roblin, 1979), que nos pueden hacer pensar que al igual que en los animales, funcionan como neurotransmisores en los vegetales, más si recordamos que esta planta responde a diversos estímulos con movimientos "animales" y, sin embargo, es probable que la posesión de estas moléculas no esté relacionada de ninguna manera con este fenómeno.

Estamos de acuerdo con Steward y Krikorian (1971), cuando plantean las muchas diferencias entre las plantas y los animales homeotermos y por tanto creemos necesario asentar que, desde nuestro punto de vista, la fisiología de los vegetales debe plantearse como una materia completamente independiente de la de los animales, tratando de encontrar de los procesos de las plantas, los mecanismos básicos, sin voltear la mirada hacia los mecanismos de la regulación fisiológica de los animales, buscando similitudes y diferencias.

La fisiología vegetal desde sus inicios, ha ido creciendo a la sombra de la fisiología de los animales. Hay que recordar que muchos de los fenómenos de los animales se estudiaban simultáneamente en los vegetales. Ejemplo de esto son los trabajos de Stephen Hales, que con un pensamiento netamente mecanicista, estudió los

procesos de circulación en ambos tipos de organismos - en el siglo XVIII (Cohen, 1976).

Tal vez sea una razón el hecho de que necesariamente el hombre se ha interesado más por comprender -- los aspectos de la fisiología de los animales, en vías de poder comprender la suya propia, lo que ha propiciado que el estudio de las funciones de las plantas se - haya visto relegado.

Esta materia realmente es muy joven, apenas el - siglo pasado se comienzan a estudiar las respuestas de los vegetales ante los estímulos (Darwin y Darwin, --- 1880) de una forma más o menos sistemática y sólo después de los 1920s se comienzan a acumular evidencias - de ciertas sustancias capaces de regular la respuesta de las plantas (Salisbury, 1957).

Una tendencia muy marcada ha sido la de buscar - comportamientos similares a los de los animales en estos organismos, es decir, que hay constantemente una - idea de relacionar los fenómenos de los vegetales con los que se han descrito para los animales.

Si bien es cierto que existen una serie de fun-- ciones análogas, lo más conveniente en el estudio de - la fisiología vegetal, es el desarrollar un marco teó-- rico independiente, estableciendo relaciones con otros campos, sólo después de haber estudiado los fenómenos de las plantas a la luz de conceptos propios, es decir, dentro del cúmulo de conocimientos obtenidos al través del análisis del funcionamiento de las plantas.

## 5. BIBLIOGRAFIA

- Absher, M. 1973. Hemocytometer Counting in Tissue Culture: Methods and Applications. Krusse, P.P. y M.E. Patterson, eds. Academic Press, Inc. Nueva York, N.Y. EUA.
- Adler, J. 1974. The Sensing of Chemicals by Bacteria. *Sci. Am.* 234 : 40-47.
- Arakaki, D.T. y R.S. Sparkes. 1963. Microtechnique for Culturing Leukocytes from Whole Blood. *Cytogenetics.* - 2: 57-60
- Baserga, R. y W.E. Kisielski. 1963. Autobiographies of Cells. *Sci. Am.* 209: 103-110.
- Barksdale, A.W. 1969. Sexual Hormones of Achlya and other Fungi. *Science.* 166: 831-837.
- Berridge, M.J. 1975. Control of Cell Division: a Unifying Hypothesis. *J. Cycl. Nucl. Res.* 1: 305-320.
- Borek, E., B.S. Baliga, C.W. Gehrke, C.W. Kuo, S. Belman, W. Troll y T.P. Waalkes. 1977. High Turnover Rate of Transfer RNA in Tumor Tissue. *Canc. Res.* 37: ----- 3362-3366.
- Bøyum, A. 1968. Separation of Leukocytes from Blood -- and Bone Marrow. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 21 Supl. 27.
- Brachet, J. 1961. The Living Cell. *Sci. Am.* 205: 50-61.

Bradley, L.M. 1980. Mitogen-Induced Responses in Selected Methods in Cellular Immunology. Mishell, B.E. y S. M. Shigli, ed. W.H. Freeman and Co. San Francisco, Cal. EUA.

Carrel, A. 1931. The New Cytology. Science. 73: 297-303.

Cohen, I.B. 1976. Stephen Hales. Sci. Am. 234: 98-107.

Darwin, C. y F. Darwin. 1880. Sensitiveness of Plants to Light: Its Transmitted Effects in Great Experiments in Biology. Gabriel, M.L. y S. Fogel, ed. 1955. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, N.J. EUA.

Dyer, M.I. 1980. Mammalian Epidermal Growth Factors -- Promotes Plant Growth. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77: 4836-4837.

Geuna, J.M.C. 1978. Steroid Hormones and Plant Growth and Development. Phytochemistry. 17: 1-14.

----- 1982. Plant Steroid Hormones - What are They and What do They do?. TIBS. 7: 7-9-.

Giese, A.C. 1973. Cell Physiology. 4<sup>a</sup> Edición. W.B. -- Saunders Co. Filadelfia, P.A. EUA.

Greulach, V.A. 1973. Plant Function and Structure. Collier-McMillan Int. Ed. Nueva York, N.Y. EUA.

Grunwald, C. 1975. Plant Sterols. Ann. Rev. Plant Physiol. 26: 209-236.



- Hanson, J.B. y A.J. Treuvas. 1982. Regulation of Plant Cell Growth: The Changing Perspective. *New Phytol.* 90: 1-18.
- Beath, G.V.S. 1977. *La Estadística en la Investigación Experimental*. Ed. Omega. Barcelona, España.
- Borgan, R. 1976. Nature and Distribution of Cytokinins. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 284: 435-447.
- Kaplan, J. 1981. Polypeptide-Binding Membrane Receptors. *Analysis and Classification*. *Science*. 212: 14-20.
- Laloue, M. 1978. Functions of Cytokinins. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 284: 449-457.
- Lehninger, A.L. 1978. *Biochemistry*. 2<sup>a</sup> Edición. Worth Publishers, Inc. Nueva York, N.Y. EUA.
- León-Cázares, J.M. 1977. *Curso Seminario de Biología - (Biología Celular II)*. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. UNAM.
- Lerner, A.R. y F.J. Dixon. 1973. The Human Lymphocyte as an Experimental Animal. *Sci. Am.* 228: 82-91.
- Ling, N.R. y J.E. Kay. 1975. *Lymphocyte Stimulation*. - North Holland Publishing Co. Amsterdam, Holanda.
- Luria, S.E. 1975. *36 Lectures in Biology*. MIT Press. - Massachusetts, M.A. EUA.
- Macieira-Coelho, A. 1973. Cell Cycle Analysis. A. Mammalian Cells in Tissue Culture: Methods and Applications. Krusse, P.F. y M.K. Patterson, ed. Academic Press, Inc. Nueva York, N.Y. EUA.

McEwen, B.S. 1976. Interactions Between Hormones and - Nerve Tissue. *Sci. Am.* 235: 44-58.

Moorhead, P. S. 1973. Human Blood Leukocytes in Tissue Culture: Methods and Applications. Krusse, P.F. y M.K. Patterson, ed. Academic Press, Inc. Nueva York, N.Y. - EUA.

O'Malley, B.W. y W.T. Schader. 1976. The Receptors of Steroid Hormones. *Sci. Am.* 234: 32-43.

Ongay-Larios, L.M. 1978. Modelo Experimental del Desarrollo de una Población de Linfocitos Humanos in vitro. Tesis Profesional. Fac. de Ciencias. Dpto de Biología. UNAM.

Ostrosky-Shejter, M.F. 1972. Reacción de Linfocitos Humanos en cultivo. Efecto del Ciclo Estral en la Producción de Mitosis. Tesis Profesional. Fac. de Ciencias. Dpto, de Biología. UNAM.

Parker, R.E. 1976. Estadística para Biólogos. Ed. Omega. Bracelona, España.

Fasantes-Morales, H. y J.M. León-Cázares. 1981. Effect of Taurine on Mitogen Response of Human Lymphocytes. - *Experientia*. 37: 993-995.

Peña-Rangel, M.T. 1982. Comunicación Personal.

Phillips, H.J. 1973. Dye Exclusion Test for Cell Viability in Tissue Culture: Methods and Applications. Krusse, P.F. y M.K. Patterson, ed. Academic Press, Inc. Nueva York, N.Y. EUA.

- Phinney, H.O., C.A. West, M. Bitzel y P.M. Neely. 1957. Evidence for "Gibberellin-Like" Substances from Flowering Plants. Proc. Natl. Acad. Sci. 43: 398-404.
- Pierce, J.K. 1972. Communication. Sci. Am. 227: 52-60.
- Ponce-díaz, P. 1979. El Efecto del Calcio sobre la División Mitótica de los Linfocitos Humanos in vitro. Tesis Profesional. Fac. de Ciencias. Dpto. de Biología. UNAM.
- Roblin, G. 1979. Mimosa pudica: A Model for the Study of the Excitability in Plants. Biol. Rev. 54: 135-153.
- Ruppel, H.G., M. Möller y H. Doetsch. 1981. The Effect of Tumor Sera on the Growth of Plant Tissues. Naturwissenschaften. 68: 271.
- Salisbury, F.B. 1957. Plant Growth Substances. Sci. Am. 196: 125-134.
- Schopf, W. 1979. The Evolution of Earliest Cells. Sci. Am. 239: 110-138.
- Scott, B.I.H. 1962. Electricity in plants. Sci. Am. -- 207: 107-117.
- Sharon, N. 1962. Lectins. Sci. Am. 236: 108-119.
- Snedecor, G.W. y W.G. Cochran. 1971. Métodos Estadísticos. C.E.C.S.A. México, D.F. México.
- Sokal, R.R. y F.J. Rohlf. 1969. Biometry. W.H. Freeman and Co. San Francisco, Cal. EUA.

Stent, G.S. 1972. Cellular Communication. Sci. Am. --  
227: 42-51.

Steward, F.C. y A.D. Erikorian. 1971. Plants, Chemicals  
and Growth. Academic Press, Inc, Nueva York, N.Y. EUA.

Thomas, L. 1974. The Lives of a Cell. Bantam Books, Inc.  
Nueva York, N.Y. EUA.

Wareing, P.F. 1976. Abscisic Acid as a Natural Growth  
Regulator. Phil. Trans. R. Soc. Lond. 284: 483-498.

----- y I.D.J. Phillips. 1976. The Control of  
Growth and Differentiation in Plants. 2<sup>a</sup> Edición. Perga-  
mon Press. Oxford, ON. Inglaterra.

Wilson, E.O. 1972. Animal Communication. Sci. Am. 227:  
52-60.

Van Overbeek, J. 1968. The Control of Plant Growth. --  
Sci. Am. 219: 75-81.

Vogelstein, B., R.S. Dintzis y M. Dintzis. 1982. Speci-  
fic Cellular Stimulation in the Primary Immune Respon-  
se: A Quantified Model. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79:  
395-399.