

2 ej 103

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA

EFFECTO DE HORMONAS ESTEROIDES EN LA
PROLIFERACION DE LINFOCITOS
EN CULTIVO.

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE

BIOLOGO
PRESENTA

LUIS ALONSO HERRERA MONTALVO

FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Planteamiento del Estudio	1
Introducción	3
Ciclo Celular	3
Control del Ciclo Celular en linfocitos estimulados.....	9
El Control del Ciclo Celular en los linfocitos T	10
Señales para la activación y proliferación de linfocitos B	13
Métodos para estudiar la cinética de proliferación celular	15
Factores que pueden influenciar la cinética de proliferación celular	19
Hormonas esteroideas	21
Hormonas sexuales y sistema Inmunológico	24
Material y Métodos	29
Resultados	33
Discusión	35
Referencias	42

PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO:

El cultivo de linfocitos de humanos ha sido ampliamente utilizado en la Genética Toxicológica para evaluar la actividad mutagénica de sustancias químicas y factores físicos como la radiación; se ha mostrado que es un sistema adecuado para detectar aberraciones cromosómicas (AC), intercambios de cromátidas hermanas (ICH) y micronúcleos (MN) (1,4). Asimismo, el cultivo de linfocitos se usa para la determinación de mutaciones somáticas puntuales en humanos a través de la cuantificación de modificaciones en el locus HGPRT (2,3).

Este sistema también puede ser utilizado en la determinación de la Cinética de Proliferación Celular (CPC) (5). Existen diferentes trabajos que muestran los efectos de diversos factores sobre la CPC. Tales estudios incluyen condiciones de cultivo (6-11), métodos de recolección de la sangre (12, 13) así como aquellos factores propios de cada donador: edad (14), estado nutricional (15), e infecciones (16). En dos investigaciones realizadas hace varios años, se encontró que las fluctuaciones hormonales ocurridas durante el ciclo menstrual pueden influir en la capacidad de los linfocitos para responder a la estimulación con fitohemaglutinina (PHA) (17, 18). Uno de ellos encontró el número máximo de linfocitos en metafase durante los días próximos a la ovulación y el mínimo en los primeros y últimos días del

ciclo menstrual (17), mientras que el segundo estudio (18) reporta la mayor respuesta de los linfocitos a la estimulación con PHA en los primeros días del ciclo misma que disminuye conforme el ciclo menstrual avanza.

Recientemente, Hill y Wolff (19) al usar dosis relativamente altas de esteroides sexuales encontraron que estas hormonas no afectan la CPC de linfocitos en cultivo.

El presente trabajo tuvo como objetivo determinar el grado de reproductibilidad de este sistema para medir la CPC y observar la influencia de los cambios hormonales ocurridos durante el ciclo menstrual sobre la capacidad de respuesta a la PHA de linfocitos en cultivo así como en su frecuencia de división.

Los objetivos particulares de este estudio fueron:

- A - Caracterizar el intervalo de la variabilidad temporal de la respuesta a la estimulación con PHA en linfocitos de diferentes individuos sanos, cuantificándose el índice mitótico y la cinética de proliferación celular.
- B - Determinar si existen o no diferencias significativas en la respuesta de los linfocitos de distintos donadores sanos a la estimulación in vitro con PHA.
- C - Determinar la influencia de las fluctuaciones hormonales ocurridas durante el ciclo menstrual en la capacidad de respuesta a la estimulación con PHA en

linfocitos de varias donadoras sanas.

INTRODUCCION

Ciclo Celular

El proceso de la formación de nuevas células se realiza a través de 3 acontecimientos: crecimiento, duplicación del ADN y división de las células madre; los cuales se integran en lo que comúnmente se define como ciclo celular. Podemos considerar al ciclo celular como una secuencia ordenada de fenómenos que llevan a una célula a dividirse y dar lugar a 2 células hijas.

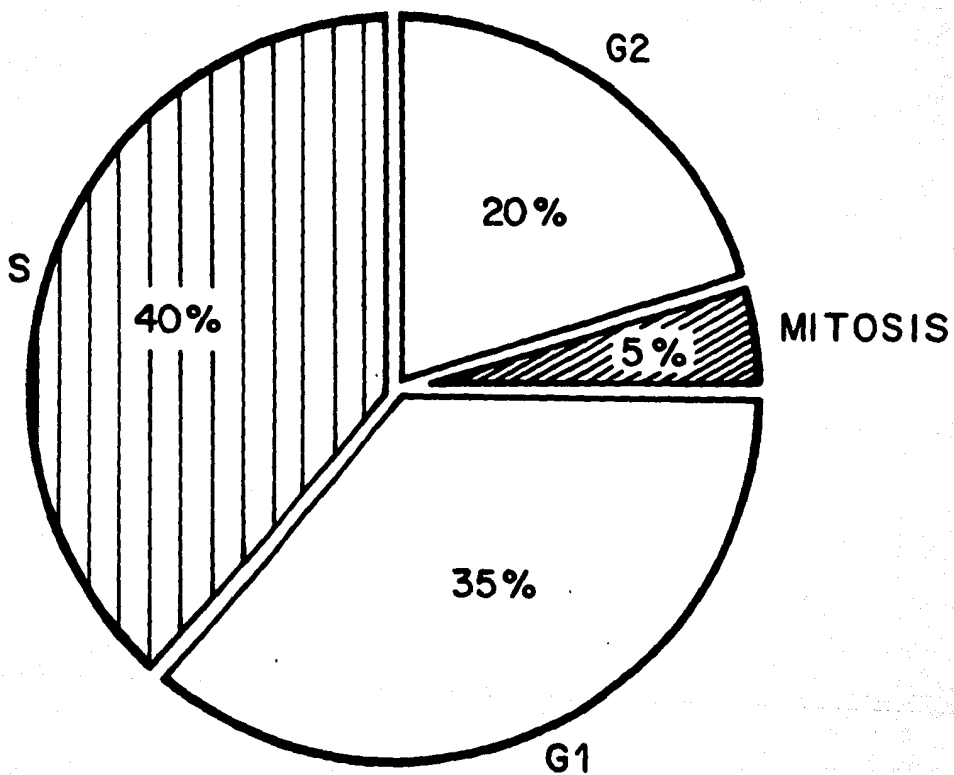
Las fases del ciclo celular fueron propuestas originalmente por Howard y Pelc en 1953 (20) quienes tomaron en cuenta los dos procesos más fácilmente reconocibles en las células cíclicas: la mitosis y la duplicación del ADN.

Antes de que una célula pueda dividirse, por lo general, debe duplicar su masa y todos los elementos que contiene. Sólo de esta forma es posible que las dos nuevas células hijas contengan todos los componentes que necesitan para iniciar su propio crecimiento después de la división. La mayor parte del trabajo necesario para la preparación del ciclo celular se produce durante la interfase. En un periodo limitado y muy concreto de ésta, el ADN del núcleo celular se duplica, esta etapa recibe el nombre de fase S (S = síntesis) del ciclo celular.

Otra fase concreta del ciclo es la división celular que incluye la división nuclear (cariocinesis) y la citoplásmica (citocinesis) que se produce a continuación. Todo este periodo recibe el nombre de fase M (M = mitótica). Quedan por lo tanto, la etapa comprendida entre la fase M y el comienzo de la síntesis de ADN, que recibe el nombre de G_1 (del inglés Gap: separación), y el periodo comprendido entre el final de la síntesis de ADN y la mitosis siguiente, que recibe el nombre de G_2 . Por consiguiente, la interfase está compuesta por sucesivas fases G_1 , S y G_2 , y normalmente abarca un 90 % o más del tiempo total del ciclo celular (figura 1) (21, 22), además se ha reportado la existencia de un punto dentro del ciclo celular en el cual se dice que las células se encuentran en un estado estable de "reposo" y al que se denominó G_0 (21, 23).

Los diferentes tipos celulares tienen distintas necesidades de renovación, de modo que se dividen sólo en la medida en que su número se pueda mantener al nivel que resulte óptimo para el organismo en conjunto. A consecuencia de ello, las aproximadamente 10^{13} células del cuerpo humano se dividen con frecuencias muy diferentes. Algunas, como las fibras del músculo esquelético y los eritrocitos, no se dividen en absoluto después de alcanzar la madurez. Otras células, como las epiteliales que revisten las superficies internas y externas del cuerpo, se dividen frecuentemente durante toda la vida del organismo.

CICLO CELULAR



La principal diferencia entre las células que se dividen constantemente y las que se dividen poco reside en el tiempo que pasan en la fase G_1 de su ciclo, algunas permanecen en G_1 durante días o incluso años. En cambio, el tiempo necesario para que una célula pase desde el inicio de la fase S hasta la mitosis es constante, independientemente de la frecuencia de división (21, 22). Diversos experimentos han demostrado plenamente que existe un punto, llamado punto de restricción ó R, al final de la fase G_1 a partir del cual, una vez sobrepasado, se completará el resto del ciclo a una velocidad independientemente de las condiciones externas (21, 24).

La frecuencia de división celular en los tejidos está controlada por mecanismos muy finos (de los que aun en la actualidad se sabe poco) a través de los cuales se mantendrá la proliferación sólo cuando ésta sea necesaria. Por ejemplo, si en cualquier parte de nuestro cuerpo la piel sufre una cortadura, en ese momento se desencadenan una serie de procesos que conducirán a la restauración del tejido deteriorado sin que la piel nueva crezca más allá de lo dañado. Sin este tipo de control por retroalimentación o servocontrol, la morfofisiología de un animal pluricelular se vería rápidamente destruida ya sea por una excesiva división celular (como ocurre en el cáncer) o por la no sustitución de las células muertas de los tejidos que normalmente experimentan pérdidas continuas de células (tales como los epitelios).

En un intento para explicar este fenómeno, se ha propuesto una hipótesis que plantea la existencia de cierta proteína de disparo, que por su inestabilidad ha sido denominada "U" (del inglés unstable), la cual alcanzaría una concentración suficientemente elevada, para que la célula pasara el punto de restricción R e iniciara su ciclo mitótico, sólo cuando fuera sintetizada con relativa rapidez (23, 24). Además, su concentración disminuiría bruscamente durante la fase M, momento en que la síntesis proteica es limitada y, aumentaría hasta el nivel mínimo necesario durante la fase G₁. De modo que cualquier hecho que redujera la velocidad de la síntesis proteica general debería retrasar la acumulación de la proteína U alargando así la duración de G₁ y reduciendo la duración del ciclo de división celular. De hecho, cuando las células se activan en presencia de un inhibidor de la síntesis proteica en concentraciones variables, sus tiempos de ciclo celular se alargan considerablemente sin que se produzca ninguna alteración sustancial del tiempo necesario para atravesar las fases S, G₂ o M. No obstante, la síntesis de esta proteína es una respuesta a la señal provista por una serie de factores regulados por mecanismos no del todo conocidos y que finalmente llevan al control de la proliferación celular. Es importante tener en cuenta que las células detenidas en R no sólo dejan de sintetizar ADN y de dividirse sino que también dejan de crecer. Esto no significa que detengan por completo la

biosíntesis de moléculas, concretamente: la degradación normal o recambio de las proteínas en una célula de mamífero es tan elevada que, una célula con crecimiento detenido en G_0 sólo para mantener tal estado debe presentar una velocidad de síntesis proteica de aproximadamente una quinta parte de la velocidad que presenta la célula en G_1 (23, 24).

Se han observado dos clases principales de fenómenos regulados cuando una célula se mueve del "reposo" a la proliferación:

1) Activación de síntesis de ARN.- La célula debe activar la producción de ARN y su maquinaria de síntesis proteica para incrementar las tasas de producción de esas macromoléculas y enzimas de novo así como mantener las ya existentes en cantidades adecuadas. En una célula en G_0 , la tasa de degradación de proteínas es igual a la tasa de síntesis así que no hay ganancia neta. En una célula en proliferación, la tasa de síntesis llega a ser cerca de 3 veces más alta que la de degradación así que tiene una ganancia neta tal que las proteínas se duplican durante la división. También aparecen nuevos ribosomas rápidamente después de que la división celular es estimulada. Todos estos fenómenos ocurren durante las primeras horas después de la estimulación.

2) Activación de la síntesis de ADN - Esto evidentemente requiere la disponibilidad de un metabolismo adecuado para la

Producción de precursores del ADN y una cantidad adecuada de enzimas y otras proteínas necesarias para este proceso. Este acontecimiento es clave para la regulación del crecimiento de las poblaciones celulares.

La mayoría de lo que ahora se sabe acerca de los factores que regulan la proliferación celular se ha encontrado, curiosamente, en estudios con células cancerosas. Así por ejemplo, hoy se conoce la existencia de genes llamados proto-oncogenes, que al ser modificados en su estructura cambia su expresión y provocan la proliferación excesiva característica de las células cancerosas (25). De la misma manera se ha reportado más recientemente (26, 27) la existencia de genes (llamados antioncogenes) cuyos productos limitan la división de las células y en el momento en que sufren una modificación éstas se dividen incontroladamente.

Pardee (28), en sus estudios con células transformadas de diversos tipos de cáncer, propone que existen unos cuantos fenómenos que controlan a nivel génico la proliferación celular. Sus argumentos son: I) después de la carcinogénesis, se ha observado que un número pequeño de pasos escapan de la regulación (30); II) se han detectado hasta el momento alrededor de 50 oncogenes independientes (25); y III) sólo unos cuantos mitógenos han podido ser ampliamente asociados con la regulación de la división celular (30). Así su hipótesis propone que deben

buscarse mecanismos bioquímicos comunes que controlen puntos regulatorios específicos en el ciclo de reproducción celular.

Ahora conocemos factores capaces de desencadenar la proliferación celular, a los cuales han llamado factores de crecimiento; a su vez cada día se va relacionando con mayor fuerza a los oncogenes como agentes que modifican o permiten la división de las células. No obstante aún quedan por contestar preguntas claves para poder descifrar el complejo fenómeno que conduce a una célula a la división. No sabemos: ¿cómo son regulados los factores de crecimiento?, ¿qué moléculas dentro de las células son alteradas cuando un factor de crecimiento es adicionado o cuando un oncogen es modificado y activado?, ¿cómo hacen esas moléculas para activar los pasos críticos a través de los cuales una célula debe pasar para duplicar sus componentes y producir una célula?

Control del ciclo celular en linfocitos estimulados.

Los linfocitos que no han sido estimulados y, supuestamente las células de memoria también, son ejemplos de células no cíclicas, en G_0 (considerado como una etapa de "reposo"). La estimulación de estas células las induce a entrar en ciclo mitótico, y a pasar a través de G_1 , S, G_2 y M. No obstante que en las células no linfoides el concepto de puntos de restricción, que ocurren en varios estadios del ciclo celular, está bien

establecido, relativamente hace poco que se han reconocido puntos de restricción similares (en particular en G_1) tanto en células T como en B estimuladas por varios agentes (31).

Si se examina la literatura acerca de la estimulación de los linfocitos es fácil quedarse con la impresión de que la mitogénesis es un proceso de todo o nada. Sin embargo, se ha propuesto un modelo de estimulación en dos fases para los linfocitos (Lafferty y cols (1980), citado en 31). Brevemente: un linfocito en G_0 necesita primero una señal activadora o de crecimiento la cual causa que entre a G_1 ; esto es normalmente aportado por el antígeno. La célula podrá iniciar la síntesis de ADN sólo si recibe una segunda señal de proliferación totalmente distinta, la cual puede ser aportada por factores de crecimiento no específicos. Aunque este modelo general puede ser utilizado para explicar a grandes rasgos el proceso de estimulación tanto en linfocitos T como B, quizá sería conveniente, por sus múltiples implicaciones tanto teóricas como prácticas, entender por separado los fenómenos que controlan la proliferación en cada subpoblación.

El control del ciclo celular en los linfocitos T.

Desde los primeros experimentos se sugirió que la estimulación de la proliferación por fitomitoógenos (PHA o Concanavalina-A (Con-A)) es un proceso complejo. Por ejemplo,

está bien establecido que los linfocitos, para sintetizar ADN requieren varias horas de exposición a la lectina (30). Las exposiciones cortas promueven la blastogénesis, pero las células regresan a su fase G₀ dentro de unas cuantas horas después de eliminar la lectina (Sell, S. y Shepard, H.W. (1974) citado por 31). Incluso, las dosis supraóptimas de Con-A, aunque inhiben la síntesis de ADN, preparan a las células T para llegar a S y las estimula para entrar en G₁. Así, estos trabajos sugieren que la "activación" de los linfocitos no compromete a la célula para sintetizar su ADN.

Existen básicamente 2 modelos para tratar de entender el proceso de estimulación en linfocitos T: uno de ellos postula que los T de ayuda (Lyt 2⁻ en el ratón) producen interleucina 2 (IL-2) en respuesta a la acción combinada del antígeno (o del mitógeno) y del factor derivado de macrófagos, la interleucina 1 (IL-1). La IL-2 induce la síntesis del ADN en las células precursoras de linfocitos T citotóxicos (Lyt 2⁺ en el ratón), las cuales han sido activadas por el antígeno para expresar receptores a la IL-2.

Un modelo alternativo (de señalamiento) para la estimulación de las células T elaborado por (Lafferty y cols (1980) citado por 31) propone que la estimulación, tanto de células Lyt 2⁺ como Lyt 2⁻, se da en dos fases:



La reacción (a) representa la estimulación de las células T en reposo por la acción combinada del antígeno "1" (asociado a la célula) y un co-estimulador "2", el cual es derivado de células accesorias, (ej. IL-1). Estas células sensibilizadas (T^1) pasan a (b) donde nuevamente el mismo antígeno "1" específico actúa, pero la señal "2" es proporcionada por la IL-2 y esto da como resultado la proliferación clonal (nT^1).

La conclusión importante de un buen número de estudios es que los mitógenos tradicionales como la PHA y la Con-A no son mitógenos per se, sino más bien inducen la producción de un factor de crecimiento fisiológico.

En otras palabras, una lectina estimulante o un antígeno debe tener dos propiedades. Primero, debe inducir la expresión de receptores para IL-2 en las células T que van a responder, y después, debe promover la secreción de IL-2 por las células que la producen. Ambos procesos ocurren en G_1 , mientras que el paso a través de S requiere el estímulo de la IL-2. La mayoría de las líneas de células T, a largo plazo requieren IL-2 exógena para continuar su proliferación. Sin embargo, aún no es claro qué tan significativo es lo anterior in vivo, ya que existen hoy varios ejemplos de clones de células T independientes de IL-2, los cuales crecen en respuesta al antígeno solamente y parece que sintetizan sus propios factores de crecimiento (32).

Hay autores (31) que proponen que la IL-2 actúa al controlar la síntesis de ARN durante G_1 más que al promover la síntesis del ADN, ya que algunos experimentos han demostrado que la PHA solamente causa en algunos timocitos su entrada a G_1 temprana (que se caracteriza por un nivel bajo de síntesis de ARN). La adición de IL-2 exógena a esas células provoca que pasen por G_1 tardía y entren a S.

En conclusión, la evidencia sugiere que la estimulación de las células T por antígenos o por lectinas puede dividirse en dos estadios. El primero se caracteriza por la expresión de receptores a IL-2 en membrana de las células T y la posterior producción de IL-2, en las células que respondieron; normalmente se requiere el antígeno específico y células accesorias como el macrófago y representa la transición del estado G_0 a G_1 . El segundo incluye a la IL-2, la cual provoca que las células pasen a través de S. Aún no es claro cuál es el papel que juega el antígeno en el control de esta segunda etapa y en los ciclos subsecuentes.

Señales para la activación y proliferación de linfocitos B.

Si muchos de los factores que conducen a la activación y proliferación de los linfocitos T son aún desconocidos, lo comprendido al respecto en linfocitos B es todavía menor; esto quizá es reflejo de la falta de conocimiento sobre las

subpoblaciones de células B funcionales (31). Los linfocitos B más estudiados han sido células de ratones de diferentes cepas que incluyen aquellos que acarrean genes que afectan la diferenciación de tales poblaciones linfocíticas.

En estos modelos se han estudiado los efectos de diversos agentes que activan la proliferación y diferenciación de los linfocitos B, y cuya acción requiere la interacción de otras subpoblaciones de linfocitos así como factores cuya acción es totalmente independiente del linfocito T. Se ha encontrado que en ratones las células B entran en ciclo 18 horas después de la estimulación mitogénica con agentes como el Lipopolisacárido (LPS), completándose una división cada 18 horas en presencia del mitógeno. Los blastocitos requieren además la presencia de éste durante G_1 para entrar al siguiente ciclo. El LPS induce que alrededor del 30 % de las células B en el bazo se dividan y diferencien en células formadoras de anticuerpos (Melchers y cols (1980) citado por 31). Los anticuerpos contra inmunoglobulinas (anti-Ig) pueden estimular a las células B de la misma manera que el LPS. Sin embargo, los anti-Ig estimulan a diferentes subpoblaciones de linfocitos e inducen solamente la síntesis del ADN. En ambos casos se requieren factores derivados de células T para la maduración de las células blasto en células formadoras de anticuerpos.

Las dosis bajas de anti-Ig y Con-A activan la transformación blástica de las células B pero no inducen la síntesis de su ADN. Esto implica que los requerimientos para activar las células B (de G₀ a G₁) son diferentes de aquellos que las hacen iniciar la síntesis de ADN (G₁ a S) (31).

Algunos investigadores (33, 34) han reportado también que la IL-2, un factor secretado por células T, actúa directamente sobre las células B como un factor de crecimiento de células B (FCCB). Sin embargo, algunos otros (35) han mencionado que el FCCB y la IL-2 son completamente distintos.

En un esquema de activación de células B de ratón que propusieron Howard y Paul (36), mencionan que los anti-Ig estimulan a células B en G₀ para entrar a G₁ temprana, donde pueden responder al estímulo del FCCB el cual conduce a las células a transcurrir por G₁ donde ahora requieren de otro factor: la IL-1 secretada por los macrófagos, para entrar a la fase S. Se supone que la acción de ambas citocinas es mediada por receptores específicos, sin embargo, no hay evidencia aún de su existencia.

Métodos para estudiar la cinética de proliferación celular

A partir de los experimentos llevados a cabo por Howard y Pelc en 1953 (20), se establecieron los primeros métodos confiables para entender la dinámica del ciclo celular. Con

todos los avances técnicos disponibles se ha evolucionado considerablemente en el conocimiento de la cinética celular y actualmente existen una serie de métodos para su estudio que han permitido entre otras cosas, determinar la duración del ciclo. De ellos, uno de los más utilizados es el marcaje con isótopos radiactivos. Este método tiene la ventaja de permitirnos estudiar la cinética celular en poblaciones asincrónicas, además de que puede aplicarse al estudio del ciclo celular *in vivo*, ya que una inyección del compuesto radiactivo es equivalente a un pulso en los cultivos celulares. La timidina tritiada es uno de los precursores radiactivos de más amplia utilización; no obstante su uso ha sido criticado (37, 38) porque no se toman en cuenta las alteraciones que puede sufrir la concentración de timidina intracelular no marcada, así como los cambios en la actividad de la enzima timidincinasa o de los acarreadores de timidina en la membrana celular.

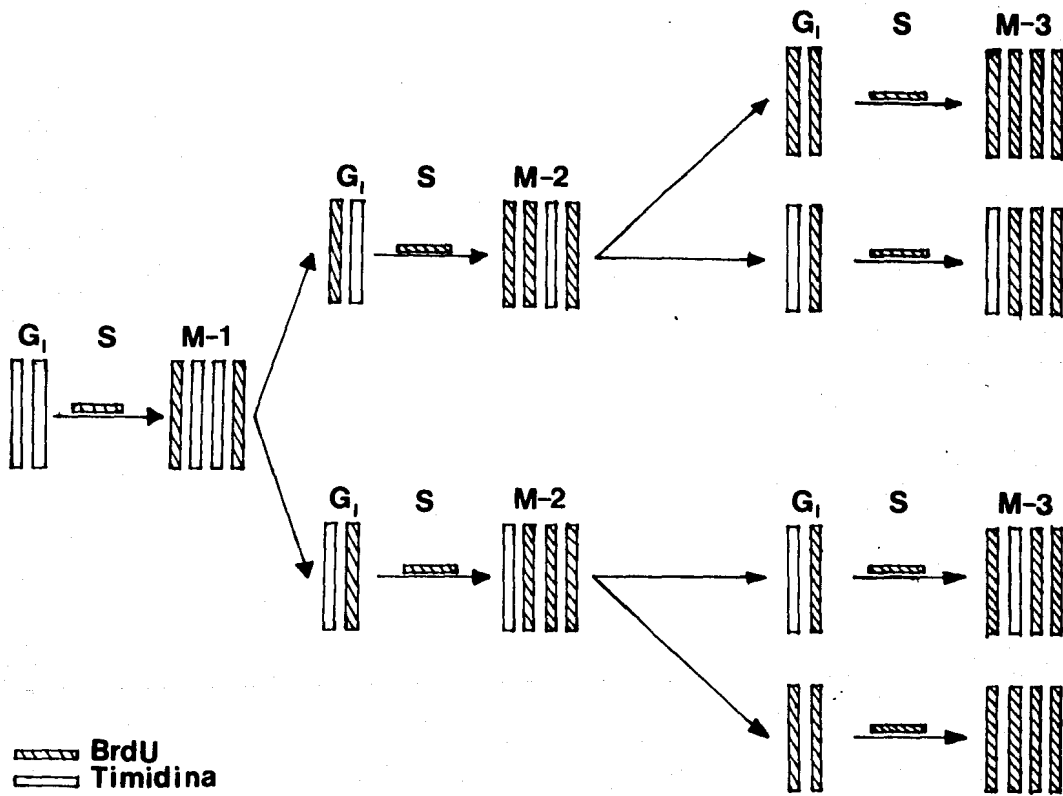
Otra forma de estudiar el ciclo celular fue introducida con el uso de la citofluorometría ya sea simple o de flujo. Ambas buscan principalmente detectar las variaciones en cantidad del ADN a lo largo del ciclo. De tal modo que una célula en G_1 tiene una cantidad diploide de ADN o $2n$, las que están en G_2 y principios de M tienen $4n$ y las que están en fase S tienen una cantidad intermedia, mayor de $2n$ pero menor de $4n$. Debido a que este tipo de estudios son transversales, la distribución del ADN en la población celular se puede hacer rápida y adecuadamente, se

detecta incluso la pérdida celular (39).

En 1973 Latt (40), consigue marcar el ADN celular con un análogo de timidina: la 5-Bromodesoxiuridina (BrdU) el cual al unirse con el fluorocromo Hoechst 33258 permitió diferenciar al microscopio las cromátidas hermanas de los cromosomas en metafase. Posteriormente, en 1974 Perry y Wolff (41) desarrollaron una innovación a la técnica anterior, que consistió en teñir con el colorante Giemsa después del tratamiento con el fluorocromo. De esta manera las preparaciones pueden ser observadas al microscopio de campo claro obteniendo los mismos resultados, pero se logra así obtener preparaciones permanentes.

Originalmente esta técnica se utilizó para estudiar el fenómeno de intercambios de cromátidas hermanas; sin embargo, poco tiempo después varios autores la usaron para examinar la cinética proliferativa de diversas poblaciones celulares tanto in vivo como in vitro (42-44). De tal manera que cuando una población celular crece en presencia de BrdU, las células que han duplicado una vez su ADN incorporan el análogo en una de las hebras de la molécula en ambas cromátidas (sustitución monofilar). Después de teñirse por fluorescencia más Giemsa, se observa al microscopio un patrón de coloración oscuro en ambas cromátidas de todos los cromosomas (M-1 en la figura 2). Cuando las células han pasado por un segundo ciclo de duplicación, una cromátida de cada cromosoma ha incorporado en sus dos hebras el

Figura 2.- Incorporación diferencial de BrdU.



análogo (sustitución bifilar), mientras la otra sólo lo ha hecho en una. En el microscopio se ve entonces una cromátida más clara que la otra en todos los cromosomas metafásicos (M-2 en la figura 2). Finalmente cuando las células han duplicado su ADN tres veces o más, presentan cromosomas de dos tipos: con ambas cromátidas sustituidas bifilarmente que por lo tanto se ven ambas claras al microscopio y, aquellas que tienen una sustituida monofilamente (obscura) y una bifilarmente sustituida y por lo tanto clara (M-3 en la figura 2).

De esta forma, se puede evaluar en un cultivo el porcentaje de células que se han dividido una, dos y tres o más veces; con esto se pueden calcular algunos índices que nos dan información acerca de la historia duplicativa de las poblaciones celulares. Ivette y Tice (45) han propuesto una fórmula con la que se calcula el índice de replicación (I.R.) el cual es un parámetro que nos puede dar una idea muy precisa de la cinética de proliferación celular. Los mismos autores han extendido el uso del I.R. para calcular el Tiempo de Generación Promedio (TGP = tiempo desde que se agregó BrdU al cultivo/I.R.). Sin embargo, para que este cálculo sea preciso, es necesario que por un lado la población celular recuperada no tenga exclusivamente células en primera división y por otro que la determinación de metafases en tercera división no se vea incrementada por células que se han dividido más de tres veces.

Factores que pueden influir sobre la Cinética de Proliferación Celular.

En diversos trabajos se han estudiado algunos de los factores tanto ambientales como aquellos propios de cada donador, que pueden producir cambios en la CPC; se ha encontrado, por ejemplo, que el medio de cultivo utilizado influye sobre la duración del ciclo celular (CC) (6). En algunos trabajos se ha reportado que la presencia de suero en los cultivos puede retardar el ciclo celular (7, 8), aunque en otro no se encontró tal efecto (6).

Los valores del pH tanto intra como extracelular también afectan la proliferación de linfocitos en cultivo. Así, con valores de pH extracelular arriba de 6.8 se mantiene el crecimiento exponencial y además se induce la proliferación de las células en G_0 , mientras que si el pH extracelular se mantiene entre 6.7 y 6.4, la tasa de división se reduce; por último, si el pH baja más de 6.4, el crecimiento se inhibe casi por completo (9).

Por otro lado se ha observado que cuando los linfocitos proliferan, frecuentemente el pH intracelular es más alcalino que en aquellas células que se encuentran en reposo (Gerson, D.F. (1982) citado por 10).

Las variaciones en la temperatura de cultivo también afectan la duración del CC, sobre todo si ésta es menor de 35 °C, reducción que produce el alargamiento del C.C. (11).

Las condiciones de colecta de la sangre influyen en la proliferación de los linfocitos en cultivo, por ejemplo, si se obtiene la muestra durante la mañana, la proliferación de linfocitos de humanos es más rápida que si la venopunción se realiza durante el medio día o la noche (12). De igual forma, si como anticoagulante es usado el ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) o el citrato ácido de dextrosa (ACD), el CC se hace más prolongado que en aquellas muestras tomadas con heparina (13).

Por lo que respecta a las variaciones en la cinética de proliferación de linfocitos en cultivo, producidas por factores propios de los donadores, se ha detectado que ésta es más lenta en las personas viejas que en las jóvenes (14). El estado nutricional de los donadores también parece ser un factor que influye en la proliferación linfocítica (15), al igual que las condiciones de salud, ya que en personas parasitadas la CPC es más lenta que en los individuos sanos (16). Como se mencionó anteriormente las hormonas esteroides sexuales pueden afectar la proliferación linfocítica. A continuación se desglosan algunos de los estudios realizados al respecto; se incluye inicialmente una descripción breve de estas hormonas y sus efectos biológicos más relevantes.

Hormonas esteroideas:

Este tipo de hormonas son moléculas liposolubles que tienen un precursor en común: el colesterol, con el que comparten una estructura básica, el ciclopentanoperhidrofenantreno; de estas, los estrógenos y los progestágenos participan en la regulación de los fenómenos biológicos que ocurren durante el ciclo menstrual.

Los estrógenos recibieron tal nombre en 1929 cuando Deisy y sus colaboradores (citados por 46) encontraron que los extractos de orina de mujeres embarazadas producían la entrada al ciclo reproductor o estró en hembras inmaduras de distintas especies. Los principales estrógenos producidos por la mujer son el 17β -estradiol, la estrona y el estriol. El primero de ellos es secretado por los ovarios mientras que la estrona y el estriol se forman en el hígado a partir del estradiol o por conversión de la androstenodiona y otros andrógenos en tejidos no endócrinos (47).

En las mujeres normales, los niveles de 17β -estradiol se elevan durante la fase folicular del ciclo menstrual a aproximadamente 200 pg/ml, y declinan posteriormente (48). A pesar de que casi todo el 17β -estradiol que entra al torrente sanguíneo, se une a proteínas como la α -globulina o la globulina acarreadora de andrógenos, la cantidad libre se eleva y decae de

acuerdo con la cantidad total producida a lo largo del ciclo menstrual. Esta hormona libre junto con aquella que se une a otras proteínas con menor afinidad, producen los efectos biológicos del estradiol durante el ciclo menstrual (49).

La progesterona en la mujer no embarazada se produce principalmente en el cuerpo lúteo, aunque la corteza suprarrenal incrementa su síntesis durante la fase folicular del ciclo menstrual (48). Durante la segunda parte del ciclo, después de la ovulación, la progesterona es la hormona sexual dominante ya que en promedio su concentración se eleva a más de 20 ng por ml de plasma.

Esta hormona es inactivada en el hígado y excretada en la orina. En el tubo digestivo también es inactivada por completo de modo que clínicamente debe ser administrada por inyección o bien recurrir al producto sintético pregnenolona por vía oral el cual no se inactiva en el tracto digestivo.

Uno de los efectos biológicos más interesantes de estas hormonas es la participación en la regulación de los ciclos reproductivos en los mamíferos que en el humano recibe el nombre de ciclo menstrual (gráfica 8). Al comienzo de cada ciclo un número variable de folículos, que contienen cada uno un óvulo, comienzan a desarrollarse en respuesta a una hormona llamada Hormona Estimulante del Folículo (FSH). Después de 5 ó 6 días,

uno de ellos empieza a desarrollarse más rápidamente. Las células de la granulosa de este folículo se multiplican y, bajo la influencia de otra hormona adenohipofisiaria: la luteinizante, (LH) así como factores intrínsecos del propio ovario, sintetizan estrógenos y los liberan de una manera creciente. La secreción de estos llega al máximo justo antes de la mitad de cada ciclo lo que estimula retroactivamente una liberación rápida y masiva de FSH y LH causantes de la ovulación. Cuando el folículo se rompe, el óvulo es expulsado a la cavidad abdominal cerca de la trompa de Falopio. La estructura remanente del folículo sufre una transformación metabólica (luteinización) cuya consecuencia endócrina es la síntesis de progesterona, la cual tiene como principal función la estimulación del endometrio uterino. Las células de esta estructura producen estrógenos y progesterona por el resto del ciclo o durante más tiempo si ocurre el embarazo. Si este no ocurre, el cuerpo amarillo degenera y cesa la producción hormonal. En el endometrio, la falta de estimulación con progesterona provoca que en las arterias de esta estructura se produzca constricción, y los tejidos externos que éstas irrigan no reciban sangre y mueran; mientras tanto se producen pequeñas hemorragias en las arterias más profundas. La presencia de sangre y tejidos necrosados en el interior del útero estimula la contracción de los músculos uterinos y la expulsión de estas estructuras hacia la vagina lo que forma parte del flujo menstrual (49).

Hormonas Sexuales y el Sistema Inmunológico

El punto de partida de las investigaciones que relacionan a estas hormonas con el sistema inmunológico se basó en las observaciones hechas por distintos científicos en las cuales se hacía resaltar una diferencia entre la respuesta inmunológica de las hembras con respecto a la de los machos; en general las hembras de distintas especies incluyendo la humana, tenían una respuesta celular y humoral más elevada. Simultáneamente los datos clínicos mostraban que las mujeres eran más resistentes a una variedad de infecciones. En años subsecuentes se reportó que las mujeres son más susceptibles a contraer enfermedades autoinmunes aparentemente debido a una exagerada respuesta a autoantígenos (50).

Existen varios trabajos (51-54) que tratan de explicar el papel que juegan las hormonas sexuales en la aparición y/o agravamiento de algunas enfermedades autoinmunes como: lupus eritematoso sistémico, tiroiditis autoinmune, artritis reumatoide, etc.

Se ha encontrado que la orquidectomía realizada en ratones incrementa la protección contra diversas enfermedades causadas por virus (virus de Coxsackie B), bacterias (*Streptococcus*), y hongos como la candidiasis (50, 55-57) a la vez que causa un aumento en la transformación de linfoblastos en cultivo (58,59) y acelera la reacción de rechazo a injertos de piel en ratones (60, 61).

Durante el embarazo se considera que las hormonas esteroides sexuales causan un cierto grado de inmunosupresión suficiente para prevenir el rechazo del feto. En particular la respuesta inmune celular es la afectada, incluso se ha reportado (62) la inversión de las proporciones de linfocitos circulantes en mujeres durante el primer trimestre del embarazo las cuales se reestablecen a rangos normales (70 % de linfocitos T y 30 % de linfocitos B) después de la vigésima semana. También se ha propuesto (54, 63) que aparte de las hormonas sexuales existen otros factores que causan inmunosupresión en las mujeres embarazadas, algunos de los cuales son secretados incluso por el propio feto.

Por lo que se refiere a los estudios realizados in vivo en animales de experimentación, sobre todo en roedores, los resultados son difíciles de interpretar. En algunos trabajos (56, 64) se reporta que los animales ovariectomizados tienen mayor protección contra una variedad de infecciones, así como una mayor predisposición a la inducción de ciertos tumores. Mientras que otros reportan que la ovariectomía deprime la respuesta humoral a heteroantígenos (50, 64) y otras investigaciones no encuentran que la gonadectomía proporcione una defensa suficiente contra agentes infecciosos (50, 65).

La naturaleza conflictiva de estos datos podría ser consecuencia de distintas variables:

a) Dosis:

Esta es una de las principales fuentes de variación en los resultados de las investigaciones con hormonas en general. En algunos estudios se ha reportado que dosis bajas de estradiol, progesterona y testosterona causan efectos opuestos a los provocados por concentraciones altas (66, 67).

b) Edad:

La edad de los individuos puede resultar crucial en experimentos donde se realice una gonadectomía; por ejemplo, la orquidectomía llevada a cabo en etapas previas a la pubertad, es más efectiva que si se hace después de la maduración sexual. Cuando se administran exógenamente las hormonas sexuales, también debe tomarse en cuenta este factor ya que si se administran inmediatamente después del nacimiento tienen efectos mucho más pronunciados en el sistema inmune que cuando se hace en animales destetados o adultos (50).

c) Vía de administración:

Se ha demostrado que las hormonas en implantes tienen un mejor efecto que las inyecciones repetidas (50). Recientemente se ha propuesto a la inyección directa de la hormona en una base de aceite como la mejor forma de administración debido a que la concentración hormonal puede ser controlada con mayor precisión.

d) Conversión:

Las hormonas sexuales masculinas, como la testosterona pueden ser convertidas en las hembras en estrógenos en los tejidos adiposo, muscular, hepático, así como en la placenta y en los machos en las glándulas suprarrenales (68).

Estudios in vitro:

En ciertos trabajos se ha demostrado que los estrógenos, al igual que la progesterona, inhiben tanto la incorporación de timidina tritiada como la transformación blástica de linfocitos humanos estimulados con PHA, Con-A y PPD (53, 69). Sin embargo, otros estudios no han confirmado este hecho (70, 71).

Los datos obtenidos al usar concentraciones bajas (0.01 a 0.1 ug/ml) indican que estas hormonas incrementan la incorporación de timidina tritiada en linfocitos estimulados con PPD, mientras que a concentraciones mayores (10 a 30 ug/ml) el efecto es el contrario (69).

En otro trabajo (59), en el cual se midió la respuesta humoral en linfocitos estimulados con el mitógeno Pokeweed (PWM), se ha observado que a concentraciones fisiológicas el estradiol estimula la acumulación de células secretoras de inmunoglobulinas (Ig) y el porcentaje de plasmablastos con Ig intracitoplásmicas,

mientras que la testosterona se comportó de forma inversa (59). En estos mismos estudios se propone que el efecto de las hormonas sexuales tal vez no sea directo sobre células B sino más bien sobre células T supresoras y citotóxicas, con base en el hecho de que al eliminar del cultivo estas últimas células los efectos antes mencionados desaparecen. Estas observaciones se ven respaldadas con otras investigaciones en las cuales han sido demostrados receptores para hormonas sexuales en linfocitos T, en tanto que en linfocitos B no se han encontrado (72).

Otros investigadores han sugerido que la síntesis de prostaglandinas es un paso importante para la aparición de los efectos inhibitorios causados por las hormonas sexuales, específicamente el Dietilestilbestrol (DES) en las células NK, ya que al agregarse Indometacina y ácido acetilsalicílico a los cultivos -ambos supresores de síntesis de prostaglandinas- junto con el DES desaparece el efecto inhibitorio. También se observó que al estar presentes las prostaglandinas en bajas concentraciones, en vez de tener un efecto supresor sobre las células NK éstas se ven estimuladas (73).

MATERIAL Y METODOS

El cultivo de linfocitos se llevo a cabo de acuerdo con la técnica de Moorhead y cols., (74) modificada de la siguiente manera: Se sembró sangre heparinizada (0.5 ml) en 6 ml de medio de cultivo RPMI 1640 (GIBCO). A cada cultivo se le adicionaron 0.2 ml de fitohemaglutinina (Microlab) y 30 μ g de 5-bromodesoxiuridina (Sigma). Se incubaron a 37 ° en la oscuridad, durante 72 hs. Dos horas antes de la cosecha se adicionaron 2 μ g de colcemid (Microlab).

A) Cosecha. Los cultivos se centrifugaron durante 8 minutos a 1,200 rpm (300xg), se eliminó el sobrenadante y se dejó un volumen de éste igual al del paquete celular; se agitaron suavemente y se agregaron 7 ml de KCl (0.075 M) se resuspendieron con ayuda de un agitador vórtex. Después de 30 minutos de incubación a 37 °C, se centrifugaron durante 8 min a 1,200 rpm (300xg) y se descartó el sobrenadante dejándose un volumen igual al del botón para resuspender las células antes de agregar 7 ml de fijador, se dejaron las células reposar durante 20 min. Se repitió esta operación hasta observar que el botón se encontrara limpio de eritrocitos, lo que generalmente ocurrió en el tercer cambio. La fijación se mantuvo durante 24 h a 4 °C. Al día siguiente se realizaron las preparaciones después de centrifugar

8 minutos a 1 200 rpm (300xg), eliminando el sobrenadante, se adicionaron 0.4 ml de fijador y se gotó en un portaobjetos la suspensión celular. Una vez hechas las laminillas, se pasaron por la flama.

B) Proceso de tinción. A las 24 horas de elaboradas las laminillas, se procedió a teñir con la técnica de fluorescencia más Giemsa derivada de la descrita por Perry y Wolff (38). Esta consistió en introducir las laminillas en una solución de tincura de Hoechst 33258 durante 30 minutos, después se lavaron con agua corriente y se secaron al aire, se cubrieron con amortiguador de fosfatos PH 6.8 y cubreobjetos; se expusieron a luz negra durante 2 a 2.5 horas y finalmente fueron teñidos con una solución al 2 % de Giemsa-amortiguador fosfatos durante 4 a 8 minutos y se eliminó el exceso de colorante con agua corriente.

C) Analisis de Metafases. La cinética de la proliferación celular fue cuantificada en las 100 primeras células consecutivas, se determinó el número de metafases en primera, segunda y tercera o sucesiva división. El índice de replicación (IR) se determinó con la fórmula propuesta por Ivette y Tice (45) $IR = 1(1^{**}) + 2(2^{**}) + 3(3^{**})/100$. Asimismo, se determinó el índice mitótico (IM), por conteo del número células en metafase en un total de 2,000 células por cultivo.

DONADORES:

A) En el estudio in vivo se obtuvieron muestras de 7 donadores de nuestro laboratorio: 6 mujeres (edad: 30.7 ± 5.5 años, media \pm D.E.) y 1 hombre (22 años); el muestreo se realizó semanalmente a lo largo de 3 meses durante la mañana. Posteriormente, se incluyeron también a 2 donadores hombres (edades: 12 y 20 años), de los cuales se tomaron muestras cada semana durante 1 mes.

B) Para investigar el efecto in vitro de las hormonas sexuales en la proliferación linfocítica, utilizamos sangre de 2 individuos sanos (1 hombre y 1 mujer) para realizar las curvas dosis respuesta de cada hormona; mientras que cuando se adicionaron las proporciones de ambas hormonas simultáneamente, se usó sangre de 4 donadores (2 hombres y 2 mujeres). En ambos casos se buscó que el día de muestreo coincidiera con el primer día de menstruación en las donadoras ya que es en este día cuando la menor cantidad de estas hormonas está circulando (gráfica 8).

Hormonas

En el estudio in vitro se utilizaron 17 β - Estradiol (PM 272.37; Schering) y Progesterona (PM 314.45; Schering). Ambas fueron diluidas en etanol puro (Merck) en el momento de iniciar cada experimento; se agregaron a los cultivos 40 μ l de las hormonas

para obtener cada una de las siguientes concentraciones finales:

A) 17 β -Estradiol 1.47×10^{-10} M, 4.41×10^{-10} M y, 6.06×10^{-10} M;

B) Progesterona 1.59×10^{-8} M, 4.73×10^{-8} M y, 7.95×10^{-8} M. Al

mismo tiempo ambas hormonas se adicionaron simultáneamente en las siguientes proporciones (17 β Estradiol/progesterona):

1) fase menstrual 1.47×10^{-10} M/0.00; 2) fase pre-

ovulatoria 6.06×10^{-10} M/ 1.59×10^{-8} M; 3) fase lútea:

4.41×10^{-10} M/ 7.95×10^{-8} M; el volumen final en el cual se agregaron

fue en todos los casos 40 μ l. Como control negativo se

adicionaron 40 μ l de etanol puro (Merck). Todos los tratamientos

se llevaron a cabo 2 horas después de iniciada la estimulación

con PHA.

Análisis estadístico:

A los datos del estudio longitudinal con distintos

donadores se les aplicó un análisis de varianza mientras que

los resultados de los estudios in vitro con hormonas esteroides

se analizaron estadísticamente por medio de la prueba "t" de

Student con valores de p menores de 0.025 y 0.05.

RESULTADOS

En la respuesta a la estimulación in vitro con PHA existe una gran variabilidad entre individuos así como entre diferentes muestras de un mismo donador, lo cual se observa tanto en el I.M. (gráfica 1) como en la CPC (gráfica 2). Sin embargo, en la tabla I se puede ver que el promedio de los valores para ambos parámetros obtenidos en cada individuo fue homogéneo entre los donadores, excepto por la respuesta encontrada en uno de ellos la cual fue estadísticamente diferente a la del resto del grupo.

Tratando de explicar las variaciones individuales observadas, se consideró la influencia de los cambios hormonales ocurridos a lo largo del ciclo menstrual sobre la proliferación linfocítica. Los resultados obtenidos tanto en el IM como en la CPC de las 6 donadoras se analizaron contra el día menstrual en que se encontraban al momento de tomar la muestra de sangre, sin embargo, no se detectó ninguna correlación estadísticamente significativa (gráficas 3 y 4). Es importante hacer notar que el comportamiento del donador número 5 en nuestro estudio es muy parecido a los resultados que se encontraron en 1972 (17) con este mismo individuo (gráficas 3 y 5). En los donadores hombres también se detectaron cambios en la respuesta a lo largo del tiempo (gráficas 6 y 7) con intervalos promedio de 0.024 ± 0.007 a 0.046 ± 0.005 y 1.96 ± 0.10 a 2.49 ± 0.13 para el IM y el IR respectivamente.

TABLA 1

CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR E INDICE MITOTICO
EN 7 INDIVIDUOS SANOS.

DONADOR	1 ^{AS} ($\bar{X} \pm D.E.$)	2 ^{AS} ($\bar{X} \pm D.E.$)	3 ^{AS} ($\bar{X} \pm D.E.$)	I.R. ($\bar{X} \pm D.E.$)	I.M. ($\bar{X} \pm D.E.$)
1	24 \pm 7.4	18 \pm 6.4	58 \pm 9.7	2.3 \pm 0.16	0.0296 \pm 0.011
2	21 \pm 7.6	19 \pm 7.6	60 \pm 9.1	2.39 \pm 0.14	0.0347 \pm 0.012
3	20 \pm 9.7	18 \pm 7.4	62 \pm 9.6	2.43 \pm 0.17	0.0328 \pm 0.011
4	21 \pm 9.9	15 \pm 8.2	64 \pm 13.2	2.39 \pm 0.39	0.0305 \pm 0.018
5	22 \pm 11.4	19 \pm 9.4	59 \pm 14.4	2.37 \pm 0.23	0.0306 \pm 0.014
6	27 \pm 9.2	20 \pm 7.6	53 \pm 14.3	2.25 \pm 0.23	0.0260 \pm 0.012
7	36 \pm 3.5*	17 \pm 7.4	47 \pm 16.5*	2.10 \pm 0.32*	0.0195 \pm 0.011*
PROMEDIO	24.4 \pm 5.2	18 \pm 1.5	57.6 \pm 5.4	2.32 \pm 0.11	0.0291 \pm 0.005

* DIFERENCIA SIGNIFICATIVA CON RESPECTO AL PROMEDIO $P < 0.05$

1^{AS}: % DE CELULAS EN SU PRIMERA DIVISION MITOTICA.

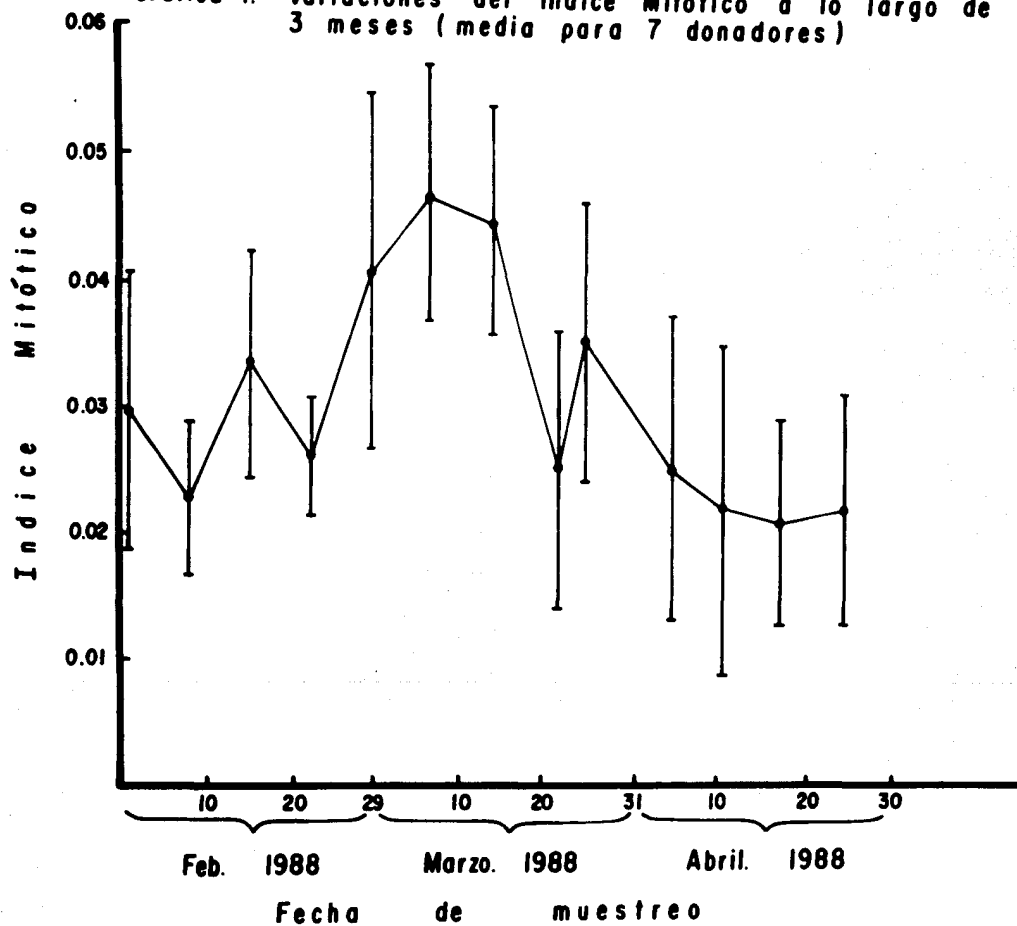
2^{AS}: % DE CELULAS EN SU SEGUNDA DIVISION MITOTICA.

3^{AS}: % DE CELULAS EN SU TERCERA DIVISION MITOTICA.

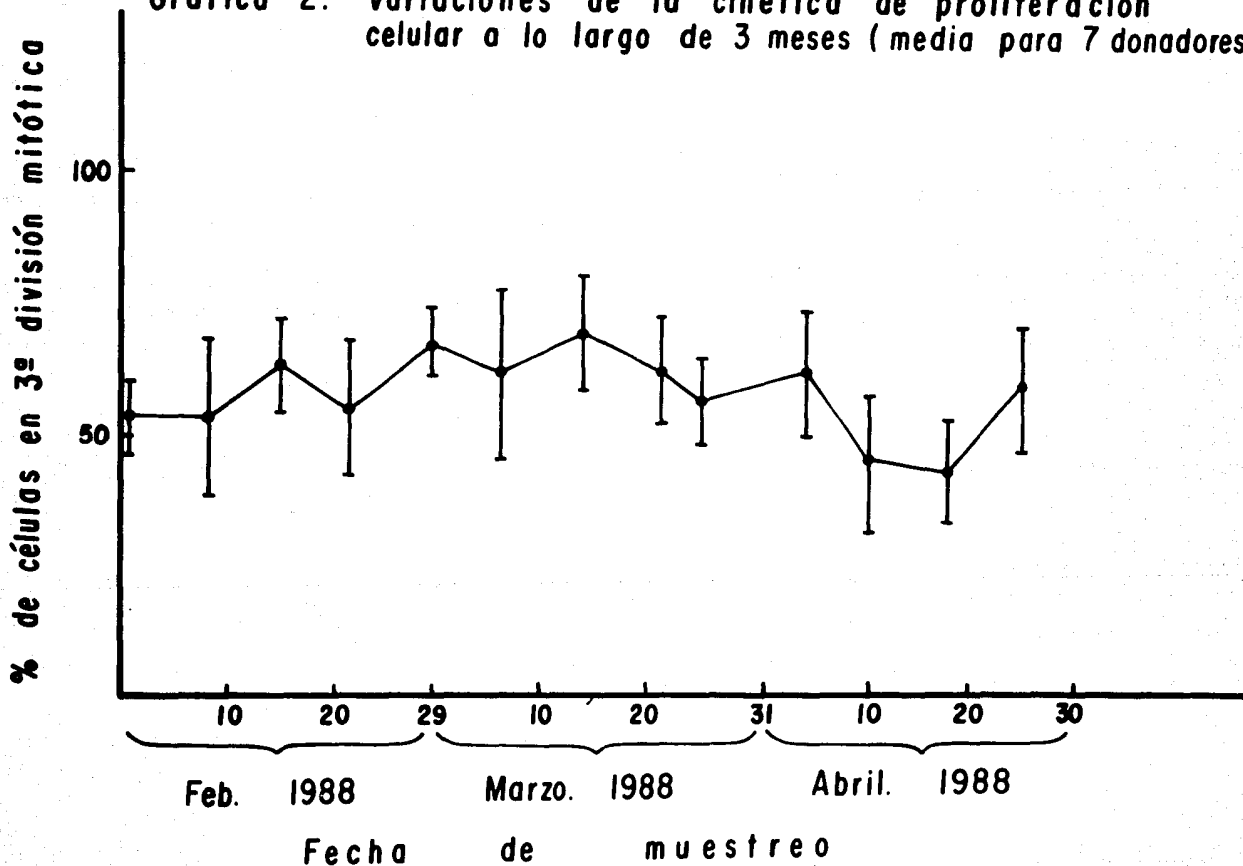
I.R.: INDICE DE REPLICACION.

I.M.: INDICE MITOTICO.

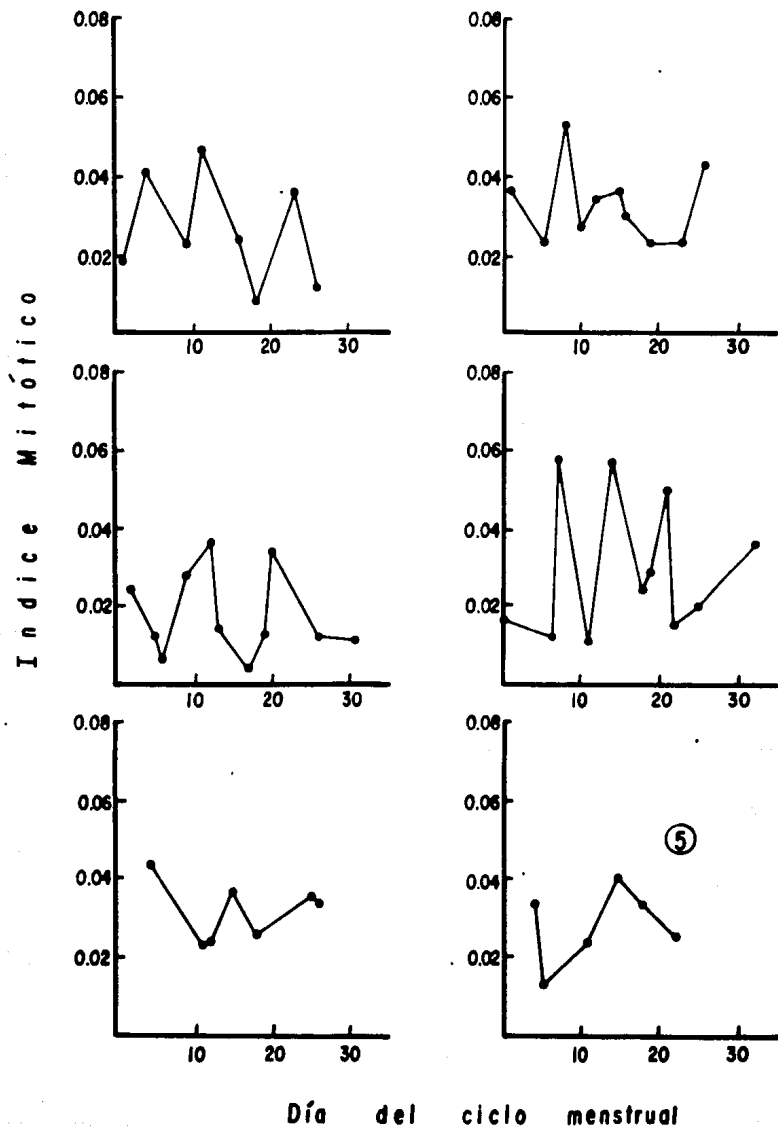
Gráfica 1.- Variaciones del Índice Mitótico a lo largo de 3 meses (media para 7 donadores)



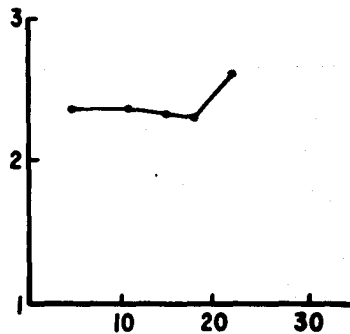
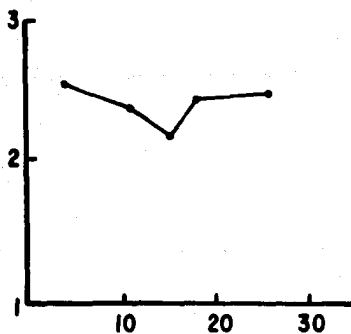
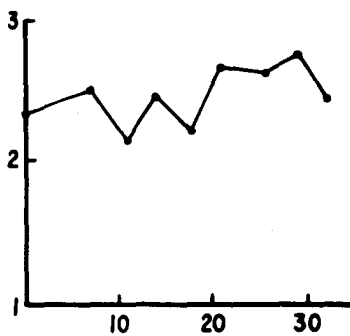
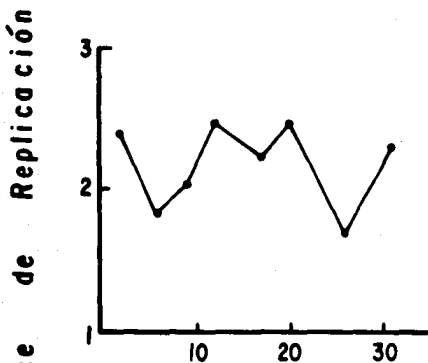
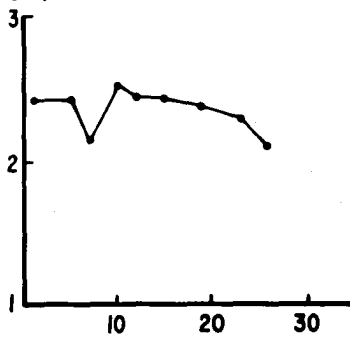
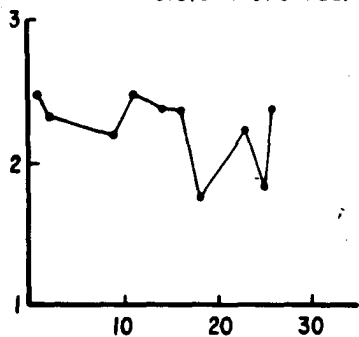
Gráfica 2.- Variaciones de la cinética de proliferación celular a lo largo de 3 meses (media para 7 donadores)



Gráfica 3.- Variaciones del índice mitótico a lo largo del ciclo menstrual (6 donadores)



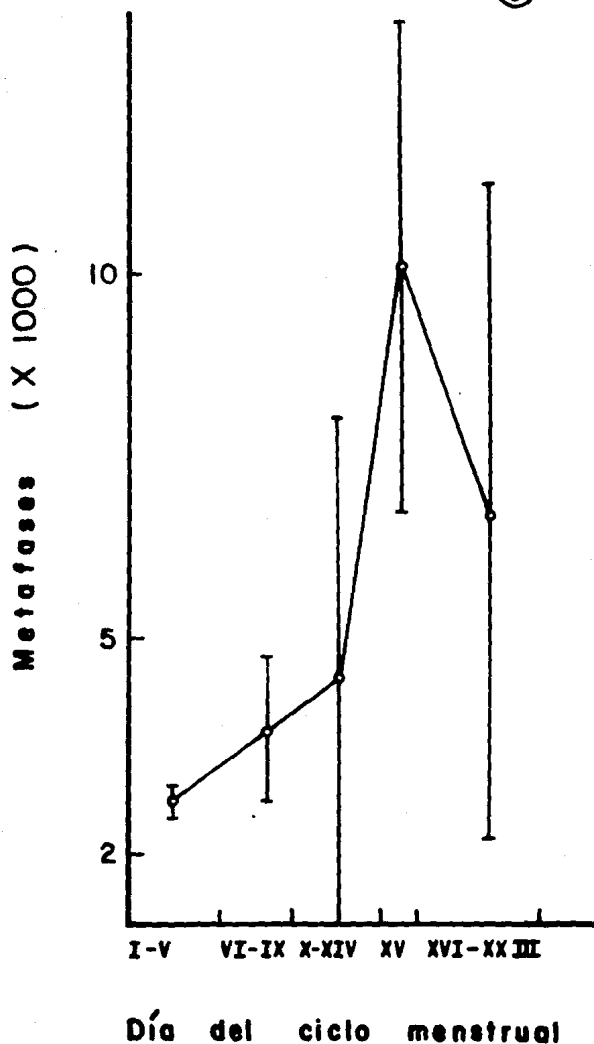
Gráfica 4.-Variaciones del Índice de replicación a lo largo del ciclo menstrual (6 donadores)



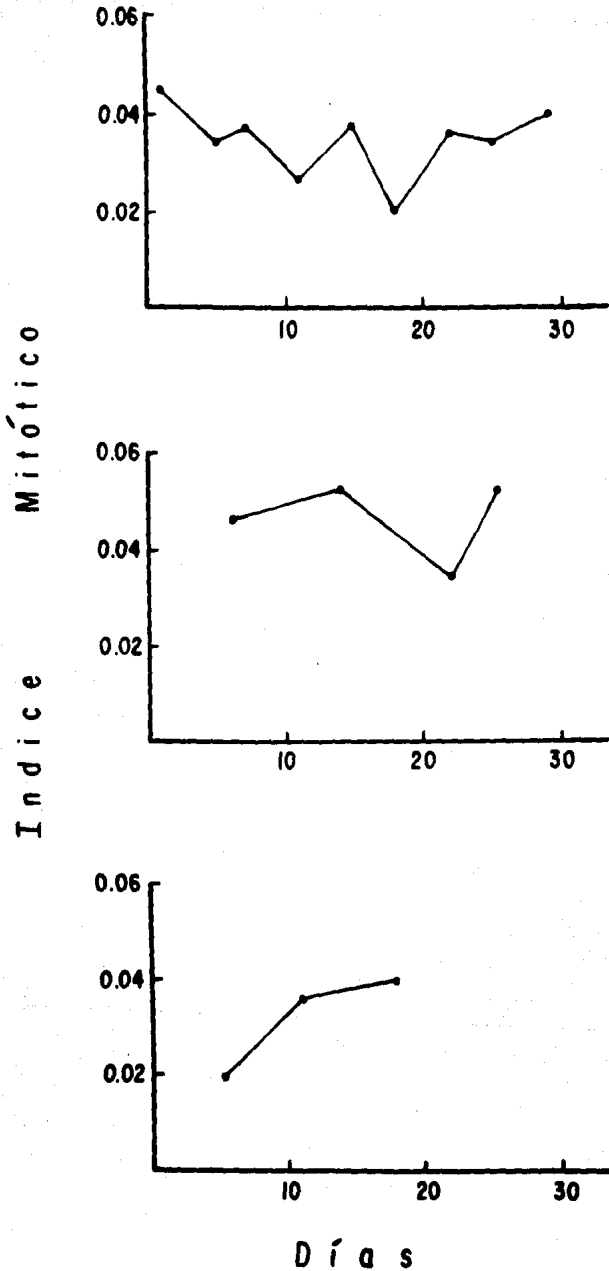
Día del ciclo menstrual

Índice de Replicación

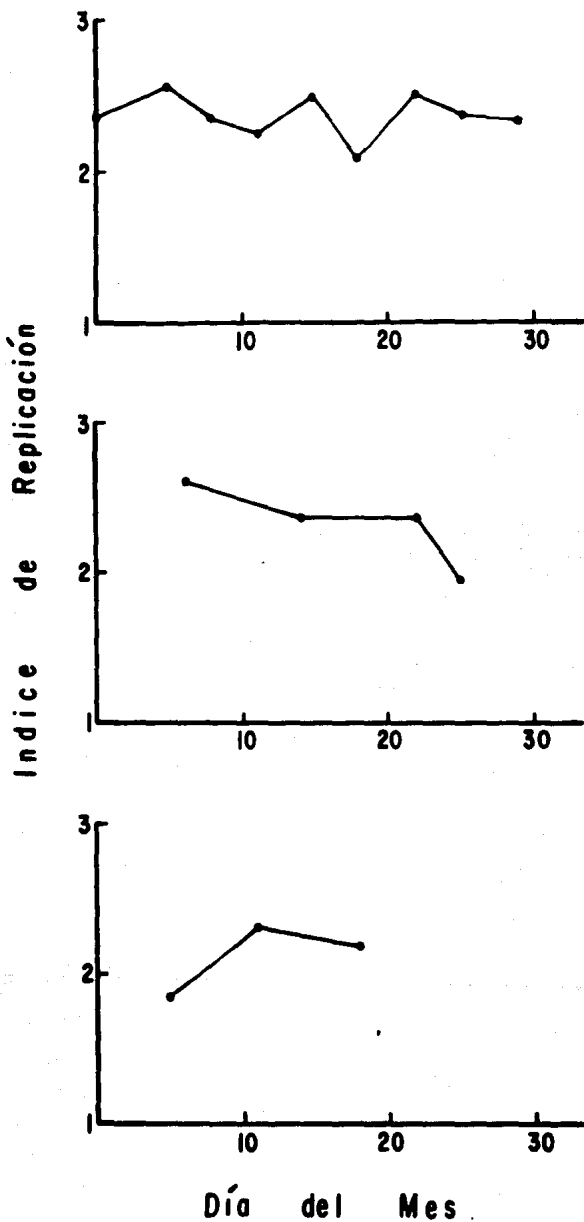
Gráfica 5.- Variaciones del Índice mitótico a lo largo del ciclo menstrual del donador ⑤ hace 18 años



Gráfica 6.- Variaciones del Índice Mitótico en 3 donadores hombres



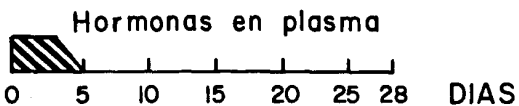
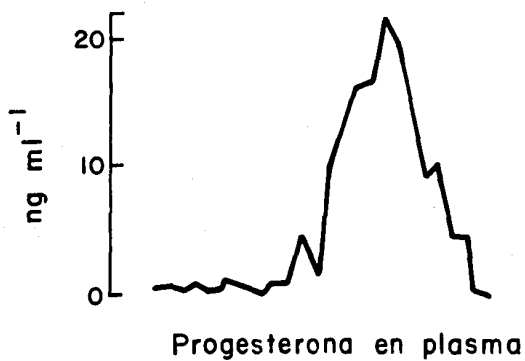
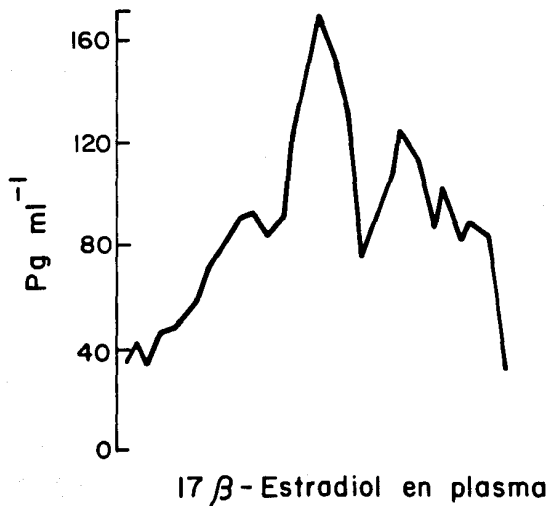
Gráfica 7.- Variaciones del Índice de Replicación en 3 donadores hombres.



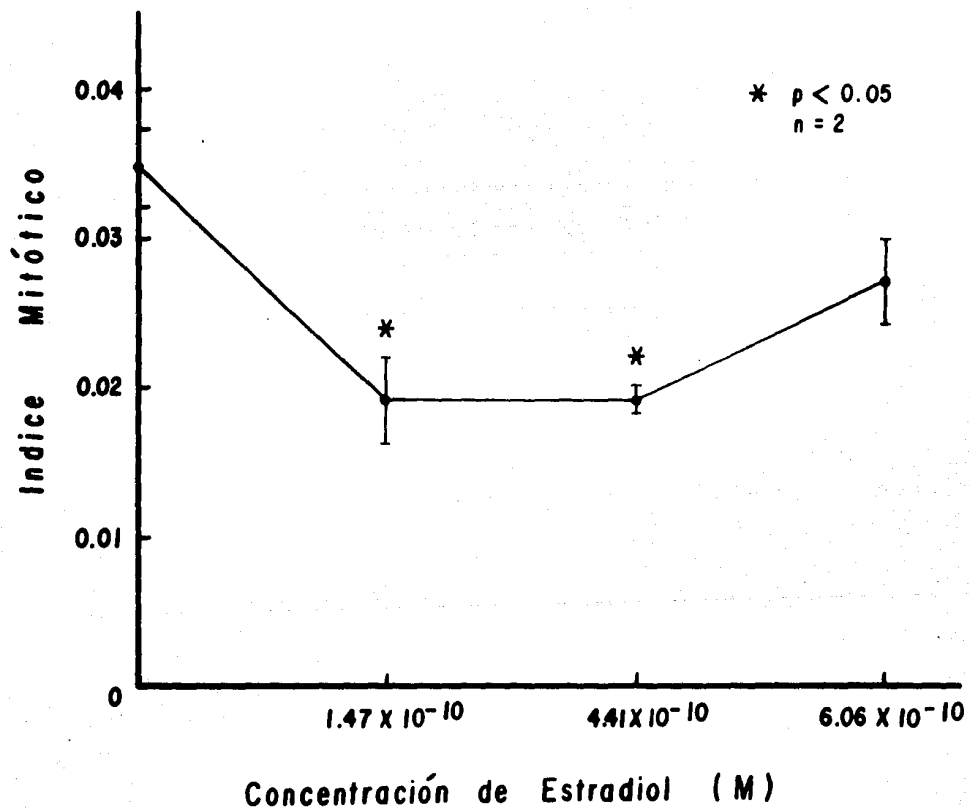
Al evaluar los efectos del 17β -Estradiol y la Progesterona adicionados *in vitro* a los linfocitos en concentraciones que trataron de simular a las encontradas en 3 puntos del ciclo menstrual (gráfica 8), se encontró que ambas hormonas, al estar en contacto con las células durante 70 horas inhibieron la proliferación retardando la CPC en las dosis más bajas, pero curiosamente no en la dosis más alta (gráficas 9, 10, 11 y 12). Mientras que al adicionarse simultáneamente las dos hormonas a los cultivos de linfocitos, se encontró una inhibición del IM con las concentraciones hormonales similares a las registradas durante las fases menstrual y pre-ovulatoria, pero no hubo cambios significativos en este parámetro con la dosis que simuló un punto de la fase lútea (gráfica 13). Cabe señalar que los resultados mostraron una mayor sensibilidad de las células de mujer a estas hormonas y aún en la última concentración hubo un efecto significativamente inhibitorio del IM (gráfica 14).

En cuanto a la CPC en la gráfica 15 puede verse como ésta se hace más lenta en cultivos que fueron tratados con ambas hormonas en las concentraciones similares a las encontradas durante las fases menstrual y lútea; no se detectó ningún efecto significativo en aquéllos a los cuales se les agregaron dosis similares a las encontradas en la fase preovulatoria del ciclo menstrual. No se observaron diferencias en relación al sexo de los donadores.

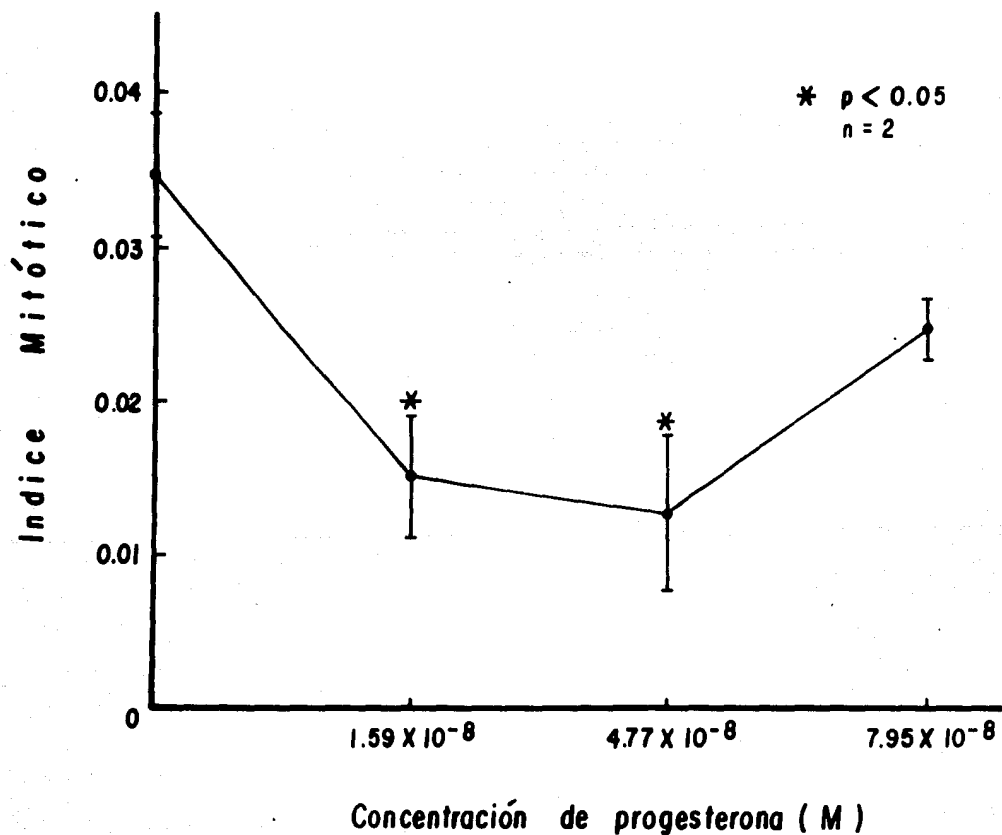
Gráfica 8.- Variaciones promedio del 17β -Estradiol y la Progesterona en plasma de mujeres durante el ciclo menstrual.



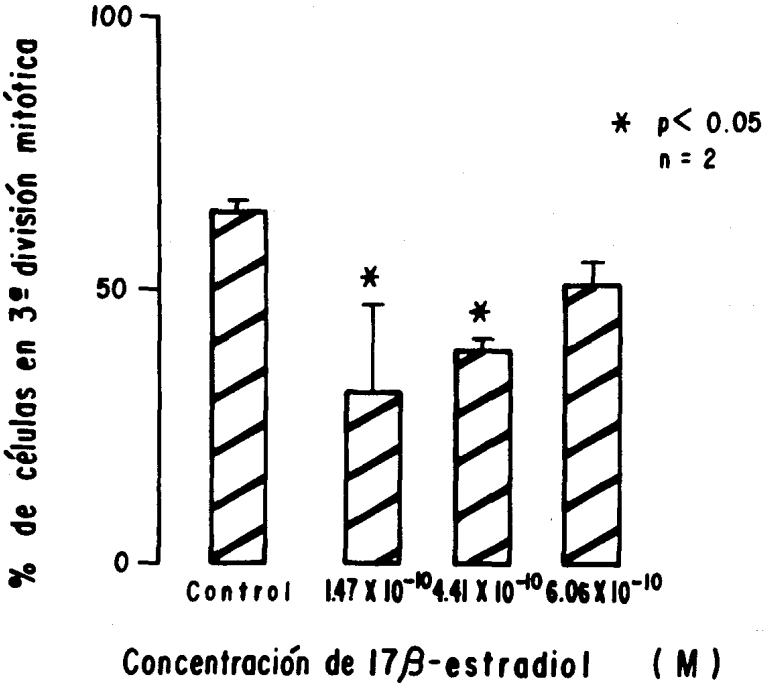
Gráfica 9.- Efectos del estradiol en el índice mitótico de linfocitos humanos



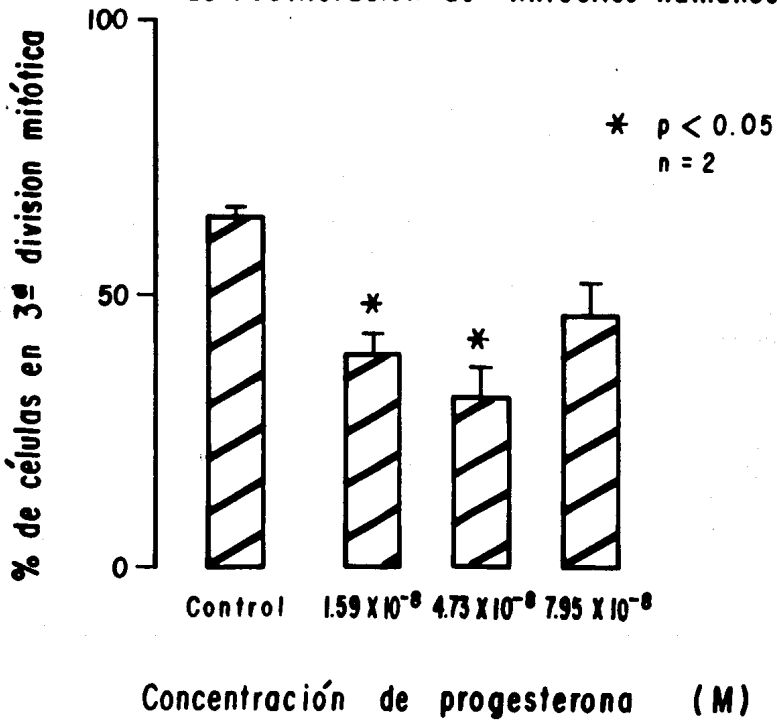
Gráfica 10.- Efectos de la progesterona en el índice mitótico de linfocitos humanos



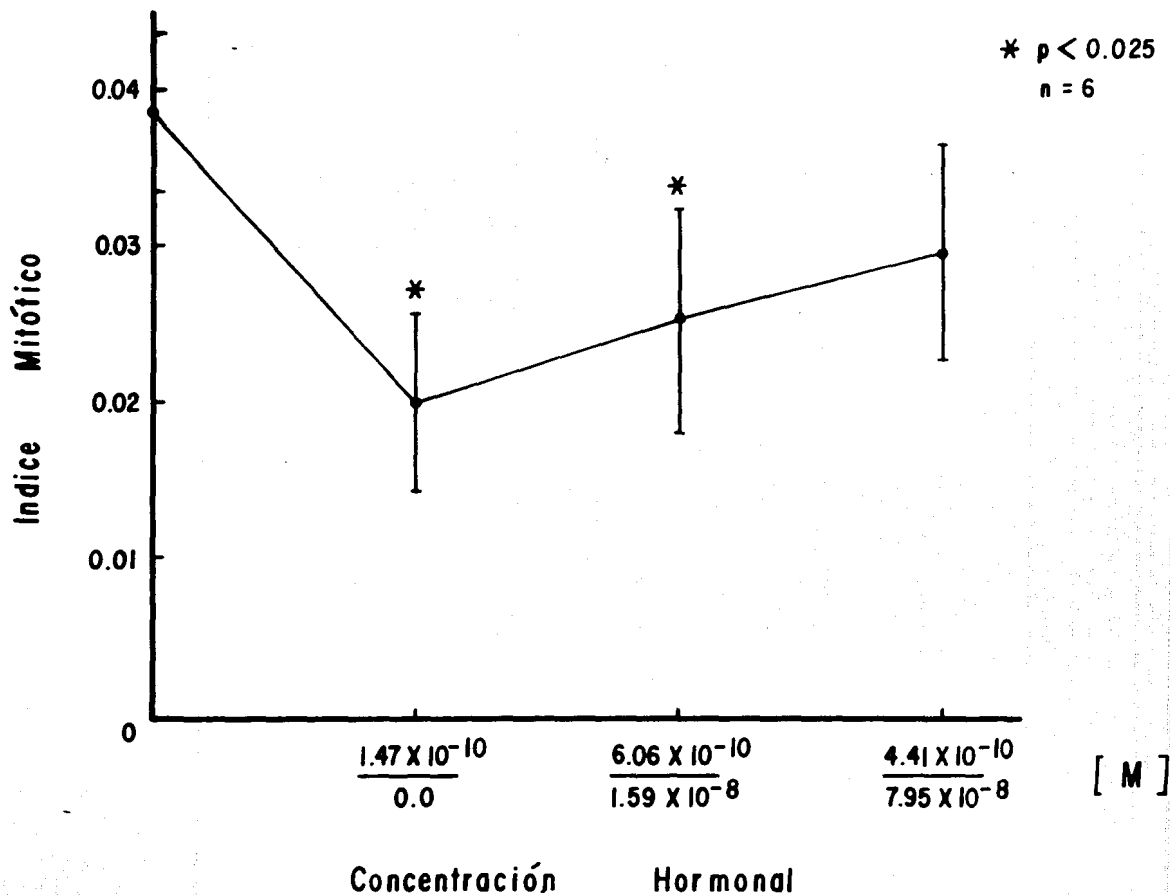
Gráfica II.- Efectos del 17β -estradiol en la cinética de proliferación de linfocitos humanos



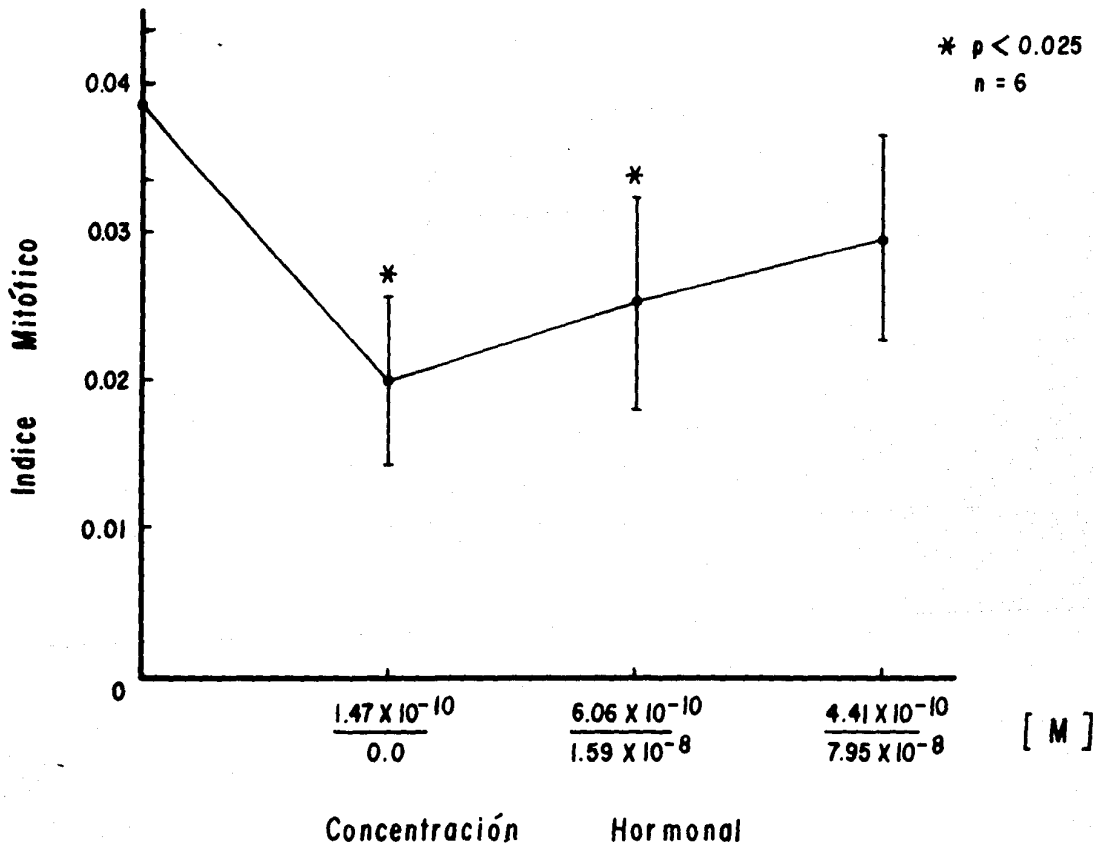
Gráfica 12.- Efectos de la progesterona en la cinética de Proliferación de linfocitos humanos



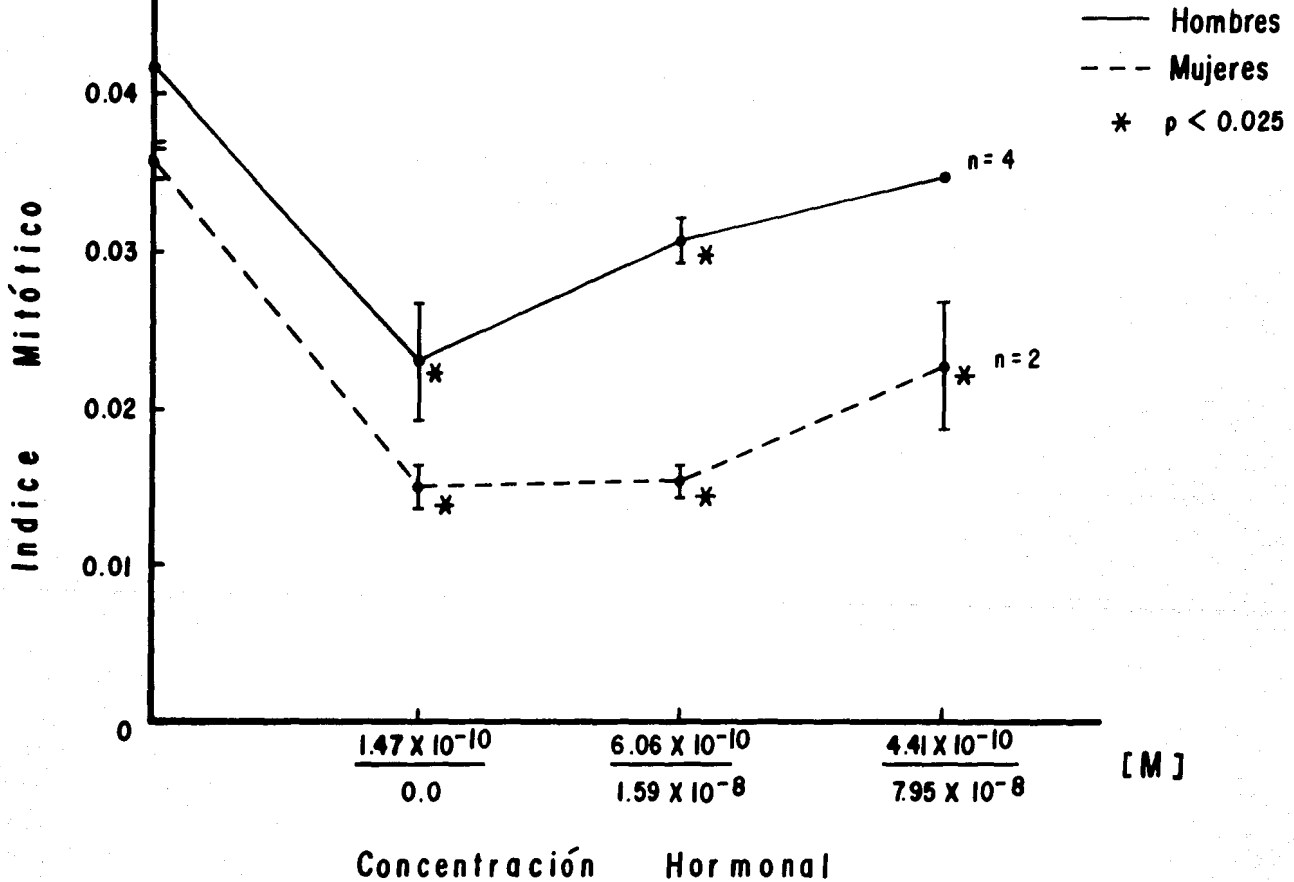
Gráfica 13.- Efectos de 17 β -Estradiol/Progesterona en el índice mitótico de linfocitos humanos



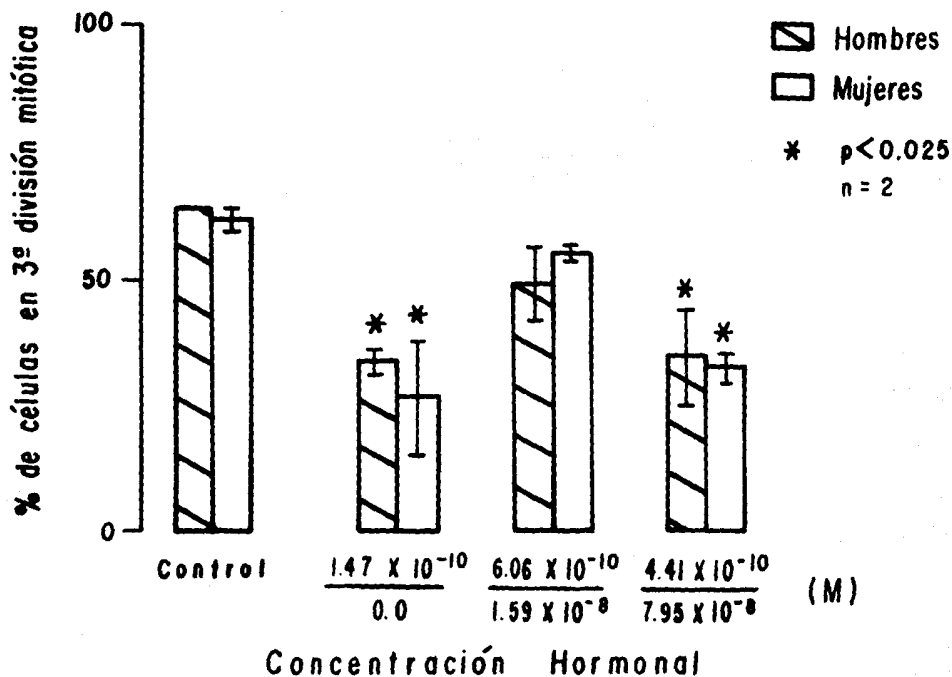
Gráfica 13.- Efectos de 17β -Estradiol/Progesterona en el índice mitótico de linfocitos humanos



Gráfica 14.- Efectos de 17β -Estradiol / Progesterona en el Índice Mitótico de Linfocitos Humanos



Gráfica 15.- Efectos de 17β -Estradiol / Progesterona en la cinética de proliferación de linfocitos en hombres y mujeres



DISCUSION

El análisis de la cinética de proliferación celular y el índice mitótico permitió comprobar la variabilidad interindividual e intermuestral en la proliferación de linfocitos estimulados in vitro con PHA, reportada por otros (75). Sin embargo, los promedios tanto del IM como de la CPC individuales mostraron homogeneidad, excepto en uno de los donadores cuya respuesta fue estadísticamente diferente al resto. A este individuo posteriormente se le diagnosticó una infección parasitaria (con Entamoeba histolytica y Giardia lamblia), condición que pudo haber afectado su capacidad de respuesta al estímulo mitogénico. Existen datos que apoyan esta observación, ya que se ha encontrado que algunos pacientes neurocisticercosos tienen una cinética de proliferación linfocítica más lenta que los donadores sanos (76).

En relación con la posible influencia de los cambios hormonales ocurridos in vivo durante el ciclo menstrual sobre la CPC y el IM de nuestras donadoras, no se encontró alguna correlación estadísticamente positiva.

Es probable que debido a la influencia de otros factores, sea difícil desentrañar el efecto in vivo que las hormonas sexuales tienen en la proliferación del linfocito. No obstante nuestros estudios in vitro indican que tanto el 17β -Estradiol

como la progesterona tienen la capacidad de modificar la respuesta de los linfocitos a la estimulación mitogénica al retrasar la cinética de proliferación de estas células.

Al trabajar con dosis de ambas hormonas similares a las detectadas durante el ciclo menstrual, Peña Rangel (18) encontró que la progesterona, pero no el estradiol, inhibe la incorporación de ^3H -timidina, el porcentaje de células vivas y el número de células en metafase en cultivos de linfocitos de hombre. Al adicionar simultáneamente estas moléculas detectó efectos parecidos a los anteriores y postuló que la progesterona es la hormona que tiene una influencia más directa sobre la capacidad de respuesta de los linfocitos ante la PHA. En el estudio que nosotros realizamos se observó que tanto el estradiol como la progesterona modifican la proliferación celular inhibiendo la CPC y el IM de linfocitos de hombre y mujer, ya sea que hayan sido adicionadas por separado o simultáneamente. Lo anterior nos indica que los cambios observados en la CPC y el IM durante el ciclo menstrual pueden ser inducidos por la acción de ambas hormonas (gráficas 9 a 12).

La mayor sensibilidad a la progesterona y el estradiol de los linfocitos de mujer encontrada en uno de nuestros experimentos (gráfica 13), puede ser explicada de la siguiente manera: los linfocitos de mujer al estar en contacto previo con sus propios estrógenos pueden tener un número mayor de receptores

disponibles y por lo tanto responder mas intensamente al efecto de estas hormonas. ya que por un lado se piensa que los efectos de estas hormonas son mediados por la union de la hormona a receptores especificos localizados en el citoplasma y la posterior translocación del complejo hormona-receptor al nucleo donde induce la transcripcion de información genética (46, 48, 68). Por otro lado, en el linfocito ya han sido caracterizados receptores para estradiol (72). Además se sabe que la síntesis de nuevos receptores puede ser estimulada por la acción de ciertos esteroides; por ejemplo, el 17β -Estradiol estimula en algunas células la producción de receptores tanto para estrógenos como para progesterona (68).

Es importante hacer notar que tal efecto se observó sólo en el IM y no en la CPC; lo anterior nos puede indicar que si bien el número de células que responden a estas hormonas es menor en los hombres que en las mujeres, aquellas células que si interactúan con estas moléculas muestran el mismo comportamiento en su cinética de proliferación (gráfica 14).

A la fecha se han encontrado receptores para diversas hormonas (peptídicas y esteroides), tanto en la membrana como en el interior de células de diferentes órganos del sistema inmune. La búsqueda de tales receptores en el linfocito ha sido de particular interés: se ha encontrado que la distribución de estas moléculas es diferente entre las subpoblaciones linfocíticas en

las cuales pueden alterarse tanto el número de receptores como la respuesta a las hormonas esteroideas sexuales después de la activación de estas células o durante enfermedades inmunológicas y no inmunológicas (77).

El efecto de las hormonas esteroideas sobre el sistema inmunológico depende mucho de la concentración utilizada experimentalmente. Por ejemplo, trabajos que han usado dosis altas de progesterona y estradiol (10^{-6} - 10^{-8} M) reportan que no existe ningún efecto de estas hormonas sobre la proliferación de linfocitos estimulados *in vitro* con PHA, mientras que concentraciones mayores (10^{-4} M) inhiben su división (19). En otros estudios se ha encontrado que las dosis bajas de progesterona (10^{-7} M) aumentan la respuesta de los linfocitos estimulados con PPD más no la de los cultivos estimulados con PHA; concentraciones cercanas al orden de 10^{-4} M tanto de estradiol como de progesterona inhiben la incorporación de ^3H -timidina en linfocitos estimulados con PHA o PPD (69). Nuestros resultados muestran que las concentraciones fisiológicas de progesterona y estradiol (10^{-9} M y 10^{-10} M respectivamente) inhiben la proliferación de los linfocitos en cultivo (gráficas 10 a 15).

Los diferentes efectos que estas hormonas pueden causar sobre el sistema inmune dependen de la concentración en que se adicionen, y esto parece ser un fenómeno generalizado de las hormonas sean esteroideas o no (77). Así por ejemplo, se sabe que

la adenosina a bajas concentraciones activa un tipo de receptores que median una acción inhibitoria del sistema inmune mientras que dosis mayores activan receptores que incrementan la respuesta inmunológica. Se sabe también que la insulina a bajas concentraciones actúa sobre los receptores para insulina y estimula la proliferación de linfocitos T y B; por el contrario, dosis altas de esta hormona activan receptores para somatomedina C los cuales provocan una inhibición de la proliferación de estas células (77).

Algunos trabajos reportan que las dosis altas (10^{-8} - 10^{-6} M) de estradiol y dietilestilbestrol (DES), detienen el ciclo celular de linfocitos y células HeLa específicamente entre las fases S y G₂; se propuso incluso un mecanismo de acción semejante al de la colchicina, es decir, un bloqueo de la metafase (19, 78). Recientemente se reportó que el DES se une covalentemente al dominio carboxi-terminal de la β -tubulina y provoca anomalías en el aparato mitótico en células de hamster sirio en concentraciones del orden de 10^{-8} M (79, 80); sin embargo, no se han encontrado resultados semejantes con 17 β -Estradiol.

Los datos experimentales aunados a lo anterior, nos llevan a plantear que tanto el estradiol como la progesterona en dosis fisiológicas como las usadas en nuestro trabajo podrían estar actuando sobre receptores que inhiben la proliferación de los linfocitos estimulados in vitro con PHA, mientras que en concen-

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

traciones mayores (10^{-8} - 10^{-4} M) estas moléculas son capaces de unirse a otra clase de estructuras celulares como el citoesqueleto. Este último es uno de los mecanismos propuestos para explicar la acción carcinogénica de la exposición crónica a algunos estrógenos (79, 80).

Las fluctuaciones en la CPC observadas en los linfocitos de hombres pueden deberse a otros factores que también tengan un comportamiento cíclico. Se sabe que en los mamíferos ocurren cambios periódicos significativos en la función de sus órganos y sistemas. Especialmente en los sistemas inmune y hematopoyético se ha detectado cierta ciclicidad en la proliferación y función celulares durante diferentes horas del día (circadiano), semanas (circaseptal), meses (circamensual) ó años (circanual); se ha encontrado que no solo cambia el número sino la actividad de los linfocitos circulantes como función del tiempo, mostrando una respuesta *in vitro* distinta a la estimulación mitogénica (81). Esto puede ser debido a cambios en las proporciones de las diferentes subpoblaciones de linfocitos, dado que han sido reportadas variaciones de la CPC entre linfocitos T de ayuda y T citotóxicos (10, 73).

El cultivo de linfocitos ha sido utilizado recientemente como un sistema para la evaluación de la CPC y los cambios ocurridos en ella a consecuencia de condiciones patológicas como parasitosis, desnutrición y síndromes cromosómicos (15, 16, 82).

Nuestro estudio confirmó que existe variabilidad entre la cinética de proliferación de distintos individuos, así como entre la detectada en muestras diferentes de un mismo donador. Tales variaciones pueden ser resultado de la acción de un número indeterminado de factores entre los cuales se encuentran los cambios hormonales durante el ciclo menstrual. No obstante, también se pudo observar a través de nuestros resultados que las variaciones temporales entre distintos donadores sanos se mueven dentro de un intervalo fuera del cual es posible detectar alteraciones en la proliferación de los linfocitos producidas por modificaciones en las condiciones fisiológicas normales.

REFERENCIAS

- 1.- Obe, G; Beek, B; Dudin, G. (1975). The human leukocyte test system. Humangenetik 28: 205-302.
- 2.- Albertini, R.J. (1985). Somatic gene mutations in vivo as indicated by the 6-thioguanine-resistant T-lymphocytes in human blood. Mutation Res. 150: 411-422.
- 3.- Ostrosky-Wegman, F; Montero, R; Cortinas de Nava, C; Tice, R; Albertini, R. (1987). The use of bromodeoxyuridine labeling in the human lymphocyte HGPRT somatic mutation assay. Mutation Res. 191: 211-214.
- 4.- Högsted, B. (1984). Micronuclei in lymphocytes with preserved cytoplasm. A method for assesment of cytogenetic damage in man. Mutation Res. 130: 63-72.
- 5.- Tice, R; Thorne, P; Schneider, E.L. (1979). BISACK analysis of the phytohaemagglutinin-induced proliferation of human peripheral lymphocytes. Cell. Tissue Kinet 12: 1-9.
- 6.- Mutchinick, G; Ruz, L; Casas, L. (1980). Time of first-generation metaphases. I. The effect of various culture media and of fetal calf serum in human lymphocyte cultures. Mutation Res. 72: 127-134.
- 7.- Wolff, S; Afzal, V; Brown, L.P. (1984). Cultured human lymphocytes proliferate faster in medium lacking fetal calf serum and antibiotics. Mutation Res. 129: 207-213.
- 8.- Auf der Maur, P; Berlincourt-Bohni, K. (1979). Human lymphocyte cell cycle: studies with the use of BrUdr. Hum. Genet. 49: 209-215.
- 9.- Taylor, I.W.; Hodson, P.J. (1984). Cell cycle regulation by environmental pH. J. Cell Physiol. 121: 517-525.
- 10.- Sánchez Aguirre, F. (1987). Intercambio de cromátidas hermanas y ciclo celular en diferentes subpoblaciones de linfocitos T humanos. Tesis de Maestría Fac. de Medicina, UNAM.
- 11.- Abdel-Fadil, M.R.; Palmer, C.G; Heerema, N. (1982). Effect of temperature variation on sister-chromatid exchange and cell-cycle duration in cultured human lymphocytes. Mutation Res. 104: 267-263.

- 12.- Tavadia, H.B.; Fleming, K.A.; Hume, P.D.; Simpson, H.W. (1975). Circadian rhythmicity of human plasma cortisol and PHA-induced lymphocyte transformation Clin. Exp. Immunol. 22: 190-193.
- 13.- Tucker, J.D., Christensen, M.L. (1987). Effects of anticoagulants upon sister-chromatid exchanges, cell-cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes. Mutation Res. 190: 225-228.
- 14.- Wen, W.N; Liew, T.L. (1983). The effect of age and cell proliferation on the frequency of sister chromatid exchange in human lymphocytes cultured in vitro. Mech. Ageing Dev. 21: 377.
- 15.- Ortiz, R; Betancourt, M. (1984). Cell proliferation in bone marrow cells of severely malnourished animals. J. Nutr. 114: 472-476.
- 16.- Montero, R; Valencia, D; Moreno, F; Sandoval, M; Ostrosky-Wegman, P. (1989). Point mutation and cytogenetic analysis on lymphocytes from neurocysticercotic patients treated with praziquantel. Env. Mol. Mut. 14 supplement 15: 132. (Resumen).
- 17.- Ostrosky-Shejet, M.P. (1972). Reacción de linfocitos humanos en cultivo. Efecto del ciclo menstrual en la producción de mitosis. Tesis profesional. Facultad de Ciencias, Departamento de Biología U.N.A.M.
- 18.- Peña Rangel, M.T. (1983). Efecto de algunas hormonas esteroides sobre la estimulación por fitohemaglutinina (PHA), en linfocitos de humano en cultivo. Tesis profesional. Facultad de Ciencias, Departamento de Biología U.N.A.M.
- 19.- Hill, A; Wolff, S. (1983). Sister chromatid exchanges and cell division delays induced by diethylstilbestrol, estradiol and estriol in human lymphocytes. Cancer Res. 43: 4114-4118.
- 20.- Howard, A. y Pelc, S.R. (1953). Synthesis of desoxiribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. Heredity, London (supplemento). 6: 261-273.
- 21.- Pardee, A.B; Dubrow, R; Hamlin, J.L.; Kletzien, R.F. (1978). Animal cell cycle. Annu. Rev. Biochem. 47: 715-750.
- 22.- Yanishersky, R.M; Stein, G.H. (1981). Regulation of the cell cycle in eukaryotic cells. Int. Rev. Cytol. 69: 223-259.

- 23.- Rossow, P.W; Riddle, V.G.H; Pardee, A.B. (1979). Synthesis of labile, serum-dependent protein in early G₁ controls animal growth. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 4446-4450.
- 24.- Pardee, A.B. (1974). A restriction point for control of normal animal cell proliferation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71: 1286-1290.
- 25.- Bishop, J.M. (1987). The molecular genetics of cancer. Science 235: 305-311.
- 26.- Knudson, A.G. Jr. (1983). Hereditary cancers of man. Cancer Invest. 1: 187-193.
- 27.- Knudson, A.G. Jr. (1985). Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. Cancer Res. 45: 1437-1443.
- 28.- Pardee, A. (1986). Biochemical and Molecular events regulating Cell Proliferation. J. Pathol. 149: 1-2.
- 29.- Heim, S; Mitelman, F. (1987). Cancer Cytogenetics. Alan R. Liss, Inc., N.Y. pp. 283-293.
- 30.- Bettger, W.J; Boyce, S.T; Walthall, B. J; Ham, R. G. (1981) Rapid clonal growth and serial passage of human diploid fibroblast in a lipid-enriched synthetic medium supplemented with epidermal growth factor, insulin, and dexamethasone. Proc. Natl. Acad. Sci. 78: 5588.
- 31.- Klaus, C.G.B; Hawrylowicz, C.M. (1984). Cell-cycle control in lymphocyte stimulation. Immunol. Today 5(1): 15-19.
- 32.- Widmer, M.B; Bach, F.H. (1981) Nature (London) 294: 750-752.
- 33.- Swain, S.L; Dennert, G; Warner, J; Dutton, R. (1981). Culture supernatants of a stimulated T-cell line have helper activity that acts synergistically with interleukin 2 in the response of B cells to antigens. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 2517-2521.
- 34.- Leibson, H; Marrack, P; Kappler, J. (1981). B cell helper factors I. Requirement for both Interleukin 2 and another 40,000 Mol. Wt. factor J. Exp. Med. 154:1 1681-1693.
- 35.- Lernhardt, W; Corbel, C; Wall, R; Melchers, F. (1982). T-cell hybridomas which produce B lymphocyte replication factors only. Nature (London) 300: 355-357.
- 36.- Howard, M; Paul, W.E. (1983). Regulation of B-cell growth and differentiation by soluble factors. Annu. Rev. Immunol. 1: 307-333.

- 37.- Hume, D.A; Weidemann, M.J. (1980). Mitogenic Lymphocyte Transformation. Elsevier/North-Holland Biomedical Press. Netherlands, pp. 77-79.
- 38.- Morimoto, K; Sato, M; Koizumi, A. (1983). Proliferative kinetics of human lymphocytes in culture measured by autoradiography and S.C.E. staining. Exp. Cell. Res. 145: 349-356.
- 39.- Gray, J.M; Dolbeare, F; Pallavicini, M.G; Beisker, W; Woldman, F. (1986). Cell cycle analysis using flow cytometry. Int. J. Radiat. Biol. 49: 237-255.
- 40.- Latt, S.A. (1973). Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 3395-3399.
- 41.- Perry, P; Wolff, S. (1974). New Giemsa method for differential staining of sister chromatids. Nature 251: 156-158.
- 42.- Crossen, P.E; Morgan, W.F. (1977). Analysis of human lymphocyte cell cycle time in culture measured by sister chromatid differential staining. Exp. Cell. Res. 104: 453-457.
- 43.- Craig-Holmes, A.P; Shaw, M.W. (1976). Cell cycle analysis in asynchronous cultures using the BUdR-Hoechst technique. Exp. Cell. Res. 99: 79-87.
- 44.- Tice, R.R; Rary, J; Schneider, F.I. (1976). The utilization of BUdR incorporation in to DNA for the analysis of cellular kinetics Exp. Cell. Res. 102: 232-239.
- 45.- Ivett, J.L; Tice, R.R. (1982). Average generation time: a new method of analysis and quantitation of cellular proliferation kinetics. Environ. Mutagen. 4: 358 (Resumen).
- 46.- Strand, F.L. (1982). Fisiología Humana. Nueva Editorial Panamericana, México, D.F. pp. 694.
- 47.- Katzung, (1986). Farmacología Básica y Clínica. Manual Moderno México pp. 482
- 48.- Edwards, R.G. (1980). Conception in the Human Female. Academic Press, NY. pp. 270-415.
- 49.- Vessey, M; Doll, R; Peto, R; Johnson, B; Wiggins, P. (1979). J. Biosocial Sci. 8: 373-427.

- 50.- Ansar Ahmed, S; Penhale, W.J; Talal, N. (1985). Sex hormones, immune response, and autoimmune diseases. Am. J. Pathol. 121 (3): 531-551.
- 51.- Barbabe1, V.M; Sakamoto, k; Seeley, J.K; Purticulo, D.T. (1982). Chromosomal breakage and sister chromatid exchange in peripheral blood lymphocytes and lymphoblastoid cell lines in the x-linked lymphoproliferative syndrome. Cancer Genet. Cytogen. 6: 313-321.
- 52.- Barnes, E.W; MacQuish, A.C; London, A.C; Jordan, J; Irvine, I.J. (1974). Phytohaemagglutinin-induced lymphocyte transformation and circulating autoantibodies in woman taking oral contraceptives. Lancet I: 898-900.
- 53.- Mendelson, J; Multer, M.M; Bernheim, J.L. (1977). Inhibition of human lymphocyte stimulation by steroid hormones: cytokinetic mechanisms. Clin. Exp. Immunol. 278: 127-132.
- 54.- Toder, V; Blank, M; Nebel, L. (1982). Immunoregulatory mechanisms in pregnancy. Transplantation, 33: 41-63.
- 55.- Huber, S.A; Job, P.L; Auld, J.K; Woodroff, J.F. Sex related differences in the rapid production of cytotoxic spleen cells against uninfected myofibers during coxsackievirus-B infection. J. Immunol., 126: 1336-1340.
- 56.- Rifkind, D. (1972). Influence of gonadectomy on Candida albicans, urinary tract infection in CFW mice. Infect. Immun., 5: 363-369.
- 57.- Rifkind, D; Frey, J. (1972). Sex differences in antibody response of CFW mice to Candida albicans. Infect. Immun. 5: 695-698.
- 58.- Paavonen, T; Anderson, L.C; Adlercreutz, H. (1981). Sex hormone regulation of in vitro immune responses. J. Exp. Med., 154: 1935-1945.
- 59.- Stoeger, Z; Chiorazzi, N; Lahita, R. (1988). Regulation of the immune response by sex hormones. I. In vitro effects of estradiol and testosterone on PWM-induced human B cell differentiation. J. Immunol. 141: 91-98.
- 60.- Graff, R.J; Lappe, M.A; Snell, G.D. (1969). The influence of the gonads and adrenal glands on the immune response to skin grafts. Transplantation, 7: 105-111.
- 61.- Kongshavn, P.A.L; Bliss, J.R. (1969). Sex differences in survival of H-2 incompatible skin grafts in mice treated with antithymocyte serum. Nature (London) 226-451.

- 62.- Streikauskas, A.T; Wilson, B.S; Dray, S. (1975). Inversion of levels of human T and B cells in early pregnancy. Nature (London), 258: 331-332.
- 63.- Lillehoj, H; Beisel, K; rose, N.R. (1981). Genetic control of experimental autoimmune thyroiditis in rats. J. Immunol., 127: 654-660.
- 64.- Kittas, C; Henery, L. (1979). Effect of sex hormones on the immune system of guinea-pigs and on the development of toxoplasmic lesions in nonlymphoid organs. Clin. Exp. Immunol., 36: 16-23.
- 65.- Andersen, A.A; Hanson, R.P. (1974). Influence of sex and age on natural resistance to St. Louis encephalitis virus infection in mice. Infect. Immun., 9: 1123-1125.
- 66.- Ansar Ahmed, S; Penhale, W.J. (1982). The influence of testosterone on the development of autoimmune thyroiditis in thymectomized and irradiated rats. Clin. Exp. Immunol. 48: 367-374.
- 67.- Ansar Ahmed, S; Young, P.R; Penhale, W.J. (1983). The effects of females sex steroids on the development of autoimmune thyroiditis in thymectomized and irradiated rats. Clin. Exp. Immunol. 54: 351-358.
- 68.- Liao, S. (1975). Cellular receptors and mechanism of action of steroid hormones. Int. Rev. Cytol., 41: 87-172.
- 69.- Wyle, F.A; Kent, J.R. (1977). Immunosuppression by sex steroid hormones. Clin. Exp. Immunol., 27: 407-415.
- 70.- Mori, T; Kobayashi, H; Nishimoto, H; Suzuki, A; Nishimura, T; Mori, T.S. (1977). Inhibitory effect of progesterone and 20-hydroxypreg-4-en-3-one on the phytohaemagglutinin-induced transformation of human lymphocytes. Am. J. Obstet. Gynaecol., 127: 151-159.
- 71.- Skinnider, L.F; Laxdal, V. (1981). The effect of progesterone, oestrogens and hydrocortisones on the mitogenic response of lymphocytes to phytohaemagglutinin in pregnant women. Br. J. Obstet. Gynaecol., 88: 1110-1117.
- 72.- Cohen, J.H.M; Danel L; Cordier, G; Saez, S; Revillard, J.P. (1983). Sex steroid receptors in peripheral T cells: absence of androgen receptors and restriction of estrogen receptors to OKT8-positive cells. J. Immunol. 131 (6): 2767-2771.

- 73.- Ablin, R.J; Kalland, T (1984). Immunomodulatory effects of oestrogen. J. Immunol. 132: 3229.
- 74.- Moorhead, P.S; Nowell, P.C; Meilman, W.J; Battips, D.M; Hungerford, D.A. (1960). Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. Exp. Cell. Res. 42: 125-130.
- 75.- Hsud, E; Halberg, F; Kuhl, J.F.W; Lakatua, D.J. (1974). Chronopharmacology in animals. Chronobiologia 1: 122.
- 76.- Dewdney, R.S; Lowell, D.P; Jenkinson, P.C; Anderson, D. (1986). Variation in sister chromatid exchange among 106 members of the general U.K. population. Mut. Res. 171: 43.
- 77.- Plaut, M. (1987). Lymphocyte hormone receptors. Ann. Rev. Immunol. 5: 621-669.
- 78.- Rao, P.N. (1969). Estradiol-Induced mitotic delay in HeLa Cells reversal by calcium and putrescine. Exp. Cell. Res. 57: 230-234.
- 79.- Epe, B; Harttig, U.H; Schiffmann, D; Metzler, M. (1989). Covalent binding to microtubular proteins as a possible cause of the aneuploidy and micronucleus formation induced by carcinogenic estrogens and other carcinogens. Env. Mol. Mutagen. 14: 57 (Abstract).
- 80.- Schnitzler, R; Schiffmann, D; Metzler, M (1989). Diethylstilbestrol (DES) induces chromosome stickiness in Syrian Hamster Fibroblasts. Env. Mol. Mutagen. 14: 175 (Resumen).
- 81.- D'Souza, D; Thomas, I.M; Das, B.C. (1988). Variation in spontaneous chromosomal damage as a function of biologic rhythms in women Hum. Genet. 79: 83-85.
- 82.- Frias, S. (1988). Ciclo celular en pacientes con alteraciones cromosómicas. Tesis de Doctorado, Fac. de Ciencias, U.N.A.M.