

112024
1
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA
División de Estudios Superiores
INSTITUTO NACIONAL DE LA NUTRICION
"SALVADOR ZUBIRAN"

SINCRONIZACION DE FIBROBLASTOS HUMANOS
MANTENIDOS EN CULTIVO, POR EL USO DE
TIMIDINA ³H.

(COMO UN METODO DE LABORATORIO PARA
DETECTAR VIAS METABOLICAS HORMONALES).

T E S I S

ESPECIALIDAD EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION HUMANA

DRA. SUSANA BASSOL MAYAGOITIA

V. B.
[Signature]

MEXICO, D.F.

V. B.
[Signature]

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MARZO DE
1986



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.

I N D I C E

	Página
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	1
MATERIAL Y METODOS	9
RESULTADOS	10
DISCUSION	11
TABLAS Y GRAFICAS	13
BIBLIOGRAFIA	21

SINCRONIZACION DE FIBROBLASTOS HUMANOS
MANTENIDOS EN CULTIVO, POR EL USO DE -
TIMIDINA H.

INTRODUCCION

Dado que el Departamento de Biología de la Reproducción Humana del Instituto Nacional de la Nutrición, cuenta con una clínica para el estudio de pacientes con diferentes alteraciones en la Diferenciación Sexual y que la afluencia de éstos es considerable, se ha formado un laboratorio de cultivo de células en donde se cuenta con un banco de células mantenidas en cultivo o en congelación y que abarcan desde líneas celulares normales, hasta líneas celulares de pacientes con diferentes diagnósticos de alteraciones en la diferenciación sexual, - éstas líneas de fibroblastos permiten estudiar entre otras cosas; cariotipos, receptores y sistemas enzimáticos, ya que es una célula relativamente fácil de obtener y mantener en cultivo sin que pierda sus características normales de vida.

En vista de la importancia que significa el fibroblasto como método de diagnóstico y de investigación básica, es preciso conocer lo mejor posible sus eventos en su ciclo de vida o ciclo celular y desarrollar técnicas de sincronización para mapear en mejores condiciones algunas vías metabólicas hormonales.

Así pues, es la finalidad de este trabajo el describir algunas generalidades del ciclo celular del fibroblasto y de señalar un método de laboratorio para su sincronización.

ANTECEDENTES

EL CICLO CELULAR.

Las células vivas se caracterizan por presentar en forma cíclica eventos metabólicos y de reproducción, fenómeno conocido con el nombre de Ciclo Celular, que constituye el proceso básico en la génesis de nuevas células. La principal característica del proceso es su naturaleza cíclica, y todo ciclo teórico se cierra sobre sí mismo y puede cursarse indefinidamente, es decir constituye una situación de equilibrio fluido. Así el crecimiento y la división celular deben compensarse de tal modo que el ciclo de duplicación-reparto permita un equilibrio con el mantenimiento de las características celulares -

esenciales, tanto cualitativa como cuantitativamente.

El estudio clásico de la división celular estableció dos amplias etapas del ciclo celular, por una parte aquella en que la célula se divide originando 2 células descendientes caracterizada por la división del núcleo o mitosis y la división del citoplasma o citocinesis y aquella en que la célula no tiene aparentes cambios morfológicos y comprende el espacio entre dos divisiones celulares sucesivas denominada interfase. Interfase y división celular corresponden a las dos grandes zonas del ciclo. Aunque la mitosis constituye la etapa más espectacular morfológicamente, la interfase envuelve la mayor complejidad fisiológica al suponer la gestación celular con la duplicación de los componentes de la célula madre, este proceso puede ser estudiado mediante el empleo de precursores radioactivos utilizando métodos bioquímicos o autorradiográficos o bien mediante citofotometría en poblaciones sincrónicas. El empleo de precursores radioactivos ha permitido demostrar que la duplicación del ácido desoxirribonucléico (DNA) en las células eucarióticas está situada en un período discreto de la interfase. Este descubrimiento permitió compartimentar la interfase en tres períodos llamados G_1 , S, y G_2 (de gap, intervalo en el idioma inglés y S de síntesis.).

La secuencia de estas fases y su duración media se ilustra en la Figura 1. Durante el período S, ocurre la síntesis de DNA que conduce a su duplicación. El período G_1 es el intervalo post-mitótico y presintético, mientras que el período, G_2 es el intervalo carente de síntesis de DNA es pre-mitótico y postsintético.^{1,2,3,4}

Cada tejido normal o anormal consiste de una mezcla de 3 diferentes poblaciones celulares. Un buen ejemplo es la médula ósea que desde el punto de vista de la proliferación celular consiste en 3 diferentes poblaciones celulares. El primero de estos grupos está en continua división, después de la mitosis pasan a la fase G_1 , fase S y fase G_2 regresando hacia la mitosis, son células que proliferan rápidamente. La segunda población contiene células que dejan el ciclo celular después de un cierto número de diferenciaciones, estas células están destinadas a morir sin llegar a dividirse otra vez. Los granulocitos son ejemplos de estas células, y en el último grupo salen del ciclo temporalmente y permanecen en un estado dormante hasta que las condiciones ambientales estimulan su re-entrada hacia el ciclo celular, algunos llaman a estas células en estadio G_0 . Con estas bases el crecimiento normal y anormal depende de 3 funciones que pueden describirse así:

- 1.- Tiempo del ciclo celular
- 2.- Fracción de crecimiento
- 3.- Frecuencia de pérdida de células

Tiempo del ciclo celular se define, como el intervalo - entre mitosis, fracción de células ciclando corresponde a la fracción de crecimiento y la frecuencia de pérdida de células se refiere a células que migran a otros tejidos o mueren. El tiempo del ciclo celular y la fracción de crecimiento, determina el número de células producidas por unidad de tiempo. El crecimiento de ambas normales y neoplásicas involucra un incremento neto en el número de células resultando más células que nacen que las que mueren.

FASES DEL CICLO CELULAR:

La célula normal selecciona si entra en G₁ o permanece en un estado de quietud o G₀, estado caracterizado por una actividad transcripcional muy reducida, la selección es de acuerdo a diversas condiciones que incluyen:

- alta densidad celular
- limitación sérica o de otros nutrientes (aminoácidos, fosfato, glucosa o lípidos).

El mecanismo de inhibición por densidad no está aún bien explicado, los factores propuestos incluyen depleción del medio, limitación de la superficie de crecimiento, formación de un factor inhibitor liberado por la célula y la cantidad de superficie celular expuesta al medio de crecimiento. La limitación de aminoácidos en el medio simultáneamente o de isoleucina, histidina más glutamina o arginina han reportado que arrestan a las células en G₀. Las drogas que permiten que la célula este en G₀ incluyen:

- a) estreptomicina A
- b) cafeína
- c) concanavalina A
- d) ácido picolínico
- e) metil glicol bis

Existen algunas controversias si las células en G₀ están en estados fisiológicos idénticos del ciclo y esto se debe a las controversias en los diferentes reportes en relación a esto, lo que permitió que se originara la idea de lo que se llamó punto de restricción entre G₀-G₁ y S_{5,6,7}, después de este punto la célula inicia la síntesis de DNA en ausencia de un estímulo. Para los fibroblastos del embrión de pollo confluentes este punto de restricción se localiza a la mitad de G₁, 4 hrs antes de S₁ cuando el suero se utilizó como estímulo de crecimiento. En células de la glia humana el punto de restricción se encontró en la parte final de

G1 5 horas antes de S cuando se utilizó como estímulo el suero.

El punto de restricción se define como, el punto en el cual la droga no es ya efectiva para prevenir que las células entren a S. Su naturaleza bioquímica se desconoce. Pudiendo ser probabilístico o determinístico, un evento probabilístico podría resultar de un fenómeno oscilatorio, los cambios cinéticos en el momento de entrar al período S, indican que éste podría controlar por lo menos 2 distintos procesos que determinan la probabilidad de transición. Un evento determinístico podría ser el aprovechar un proceso crucial en la célula como la acumulación de proteína o de una proteína específica como el RNA.8,9,10,11,12,13

MUTANTES EN EL CICLO CELULAR:

Los mutantes que son sensitivos a la temperatura para crecer y que son bloqueados en puntos específicos en el ciclo celular, pueden tener eventos bioquímicos de control. Algunos mutantes se bloquean en G1 a temperaturas no permitidas. Unas células mutantes de Hamster chino se bloquean en G1 a 40 C y se encontró un defecto en la síntesis de glicoproteínas a 40°C. Unas células mutantes CHO sensibles al frío se arrestan en G0 a 33°C. A 39°C las células tuvieron morfología de fibroblastos donde 33°C las hace redondas y epitelioides.14

FACTORES QUE SE HAN ASOCIADO AL PUNTO DE RESTRICCIÓN:

Son 4 factores:

1.- Factores de crecimiento: El suero es una mezcla compleja de substancias y el cual ha sido utilizado rutinariamente en el cultivo celular proveiendo factores necesarios para el crecimiento. Se han estudiado algunos otros factores de crecimiento siendo el principal para fibroblastos dérmicos, células del músculo liso y células de la glia, un factor derivado de plaquetas humanas, de naturaleza polipeptídica con peso molecular de 13,000 pudiendo extraerse por calentamiento a 110°C durante dos minutos.15,16,17,18.

Otro factor identificado es una proteína con peso molecular de 18,000 liberado por células SV40 transformados de los BHK.19,20. Se ha identificado otro en plasma de la rata que estimula la confluencia e inicia la síntesis de DNA, y se aisló otro que promueve la multiplicación celular.21

Un polipeptido de 11,000-13,000 p.m. de condrocitos ha sido purificado de cartilagos.22 La iniciación de la proliferación celular por prostaglandinas F2 fue potenciada por insulina e inhibida por hidrocortisona.23,24.

Ciertas hormonas como insulina, proinsulina, somatomedina A se unen al receptor denominado MSA (estimulador de la actividad de multiplicación) en el fibroblasto correlaciona con la estimulación de la síntesis de DNA en células Go. 25,26. Dos tipos de sitios de insulina existen fibroblastos de embrión de pollo, una de alta densidad y afinidad y baja capacidad y uno de baja afinidad y alta capacidad 27. Pudiendo ser equivalente al receptor para MSA. Las células pueden ser estimuladas a proliferar por un tratamiento con proteasa, éstas potencian la acción de otros factores de crecimiento incluyendo el suero, quizás por incrementar la eficiencia de su utilización.

Una proteasa celular, el activador del plasminógeno, disminuye cerca de 10 veces en células 3T3 inhibidas por densidad 28.

2.- Cationes divalentes: El Ca^{2+} induce la transición de G0 a S en células Balb/3T3 y células cardíacas de rata, 29, 30. Las células Balb estimuladas con suero en un medio deficiente de Ca^{2+} no inician la síntesis de DNA, por otro lado al agregar Ca^{2+} 10 horas después de agregar el suero se inicia la síntesis de DNA como en un cultivo sincronizado, 31.

La privación de Mg^{2+} causa la entrada a G0 de los fibroblastos, éste catión se ha propuesto como un regulador del crecimiento, 32. El Mg^{2+} podría regular vías metabólicas tal como transfosforilación. Concentraciones subtóxicas de ciertos metales divalentes como Zn^{2+} , Cd^{2+} , Hg^{2+} estimulan la síntesis de DNA en fibroblastos 33.

3.- Superficie Celular: Algunos estudios sugieren que la superficie celular puede estar involucrada en la inhibición del crecimiento por densidad, 34. Una suspensión enriquecida de membranas de células 3T3 puede hacer que se inhiba su entrada a S, esto depende de tiempo y de concentración, no se ve este efecto en células Balb/3T3. El efecto es reversible. Los datos sugieren que esta preparación puede mimetizar el efecto inhibitorio por aumento en la densidad celular, 35.

Se ha propuesto por otro lado la existencia de ensamblajes moduladores que coexisten con receptores de membrana y de estructuras submembranosas, microtubulos, microfilamentos y proteínas contráctiles, 36. La colchicina inhibe los movimientos de este ensamblaje y tiene un efecto directo sobre microtubulos de tal forma que bloquea el paso de G0-G1 a S en el fibroblasto, 37. La concanavalina A en dosis que inhibe la movilidad del receptor de superficie también inhibe la entrada a S, 38.

4.- Transporte: El transporte de nutrientes de poco peso molecular a través de la membrana celular ha sido propuesto como un regulador del punto de restricción. Las células en estado de quietud tienen una frecuencia muy reducida de intercambio de fosfatos, uridina, hexosas y algunos aminoácidos. Cuando se estimula la célula se incrementa el transporte de fosfatos, uridina y hexosas. Los cambios en

el transporte son específicos y no representan una alteración generalizada en la permeabilidad de la membrana. Por ejemplo el transporte de adenosina y muchos aminoácidos no cambian con el estado de crecimiento de la célula 39,40.

SINTESIS DE PROTEINAS Y DEGRADACION:

La síntesis de proteínas no unidas a DNA fué baja en células en descanso y aumentó 4 veces durante las primeras 4 horas después de estimular las células, por otro lado, la degradación de proteínas es mayor en estas fases, el mecanismo aún no es claro, se han estudiado enzimas lisosomales (catepsina D) reportándose 2 veces más alta en células en descanso pudiendo ser responsables de la degradación, se ha observado en fibroblastos de embriones de rata en donde hay una correlación inversa entre la frecuencia de degradación y la cantidad de síntesis de DNA después de inducir estimulación.42

RNA:

El RNA ribosomal y el RNA de transferencia incrementa cuando la célula se estimula a G1, se ha encontrado de 2 a 4 veces más en citoplasma de estos dos tipos de RNA que del mensajero.43 (mRNA)

En la mayoría de las células eucarióticas el mRNA es covalentemente atacado a ácido poliadenílico (poli A) en 3' al final de la molécula. Esto ha permitido poder determinar los niveles del mRNA en células que proliferan y en células que están en quietud. El aumento del mRNA en células que proliferan parece no ser resultado del aumento de la transcripción ya que no hubo cambio en la síntesis del RNA heterogéneo, el precursor del mRNA. Una alteración en la eficiencia de un post-transcripcional evento podría ser responsable de un aumento en el mRNA.44

Algunos estudios empleando marcajes en RNA y midiendo el poli A más el RNA ha probado la eficiencia de transcribir el mRNA del núcleo al citoplasma. Estos estudios suponen la hipótesis de que el aumento del mRNA se observa en las células proliferando.45

Al estimularse las células adicionando suero al cultivo resulta de un reordenamiento del del mRNA en los polirribosomas.46 El aumento a un 80% por 4 a 6 horas se ha visto después de estimular el crecimiento, debido a un aumento en la síntesis de proteínas.47,48.

NUCLEOTIDOS CICLICOS Y ENZIMAS:

La importancia de la relación cAMP/ cGMP en la regulación del ciclo celular se ha enfatizado mucho recientemente. el cAMP regula los estados específicos en el ciclo espe-

cialmente G₁, y el cGMP (guanidil monofosfato) es menos clara.⁴⁹

La adenilciclase y la fosfodiesterasa del cAMP son responsables de la síntesis del cAMP, la actividad de la ciclase fluctúa durante el ciclo,⁵⁰. Incluso las dos subunidades que componen el cAMP dependiente de la protein-kinasa tipo I o subunidad catalítica y tipo II o subunidad reguladora, ambas se encuentran fluctuando durante el ciclo celular,⁵¹. En un reporte reciente se estableció que la protein-kinasa inhibe la división meiótica en el *Xenopus* oocyte inducido por progesterona. En este sistema la incubación de oocitos con progesterona en la primera profase meiótica causa progresión a la segunda metafase meiótica. Esta división estimulada por progesterona fué inhibida por la subunidad catalítica.⁵²

CAMBIOS NUCLEARES:

Cambios durante G₀-G₁ (período transicional), se han descrito tales como dispersión progresiva de la cromatina a medida que la célula avanza a S estos cambios pudieran representar una activación génica o preparación para la síntesis de DNA, las proteínas no histonas pueden ser las responsables ya que su síntesis aumenta tempranamente después de la mitosis alcanza su máximo en la parte última de G₁. Sitios de baja afinidad para proteínas reguladoras se llenan en G₁ y los de alta afinidad durante S. La fosforilación de las no histonas comienza después de la estimulación con un aumento en la fase más tardía de G₁, quedan aún muchos puntos por investigar.⁵³.

EL PERIODO S:

En la mayoría de las células eucarióticas en cultivo el período S es de 6-8 hrs., pero su rango in vivo es desde 10 minutos en el *Schizosaccharomyces Pombe* hasta 35 hrs en la piel de la oreja del ratón, ⁵⁴. En organismos eucarióticos el genoma se distribuye en cromosomas, cada fibra de DNA se divide en muchas unidades denominadas replicones, cada replicón tiene un centro de origen del cual parten pequeñas porciones denominadas puas, y aparentemente cada pua se fusiona con otra del replicón vecino,⁵⁵. La duplicación del DNA en embriones de algunas especies se duplica aproximadamente 100 veces más rápido que en células somáticas de adultos de la misma especie, por un mecanismo que involucra un gran número de pequeños replicones posiblemente todos funcionando simultáneamente,⁵⁶.

INICIACION DE LA REPLICACION DEL DNA:

En células eucarióticas el evento que marca la iniciación de la replicación es un misterio, podría ser la presencia de un punto específico en donde algunos han reportado endonucleasas que atacan ambas cadenas sencillas y dobles del DNA.⁵⁷

Una vez que la célula ha seleccionado un locus para la síntesis de DNA a través de algún evento desconocido, ahora se procede a la polimerización del DNA en ambas direcciones. Como en procariotes las polimerasas del DNA - en eucariotes funcionan unicamente en dirección 5' a 3'. 58. Las proteínas y enzimas responsables de la polimerización de DNA durante el período S en células eucarióticas no han sido identificadas, se han descrito algunas - proteínas desdobladoras con pesos moleculares de 30 a 35 mil, también se han descrito proteínas de bajo peso molecular que se encuentran en el núcleo como la denominada polimerasa B o II y la polimerasa I, ambas enzimas - son capaces de extender las cadenas de DNA en 3'-hidroxil pero la polimerasa I se ha relacionado con el incremento de síntesis de DNA en linfocitos estimulados con fitohemaglutinina.59

La conversión de piezas de 4S a fragmentos más grandes de DNA durante S sugieren la existencia de ligasas y enzimas analogas, se han reportado 2 enzimas diferentes, ambas requieren ATP, ambas se encuentran en el núcleo y - citoplasma una de alto peso molecular y otra de bajo peso molecular.60

HISTONAS Y PERIODO S:

La síntesis de histonas ocurre predominantemente en el período S. Los compuestos que inhiben la síntesis de DNA tales como la hidroxiaurea y altos niveles de timidina, - bloquean la producción de histonas.61

REPLICACION DEL DNA MITOCONDRIAL:

El DNA mitocondrial es aparentemente replicado durante - todo el ciclo celular, algunos autores sugieren que la - síntesis del DNA nuclear y mitocondrial son independientes, cuando células 3t3 fueron estimuladas, la cicloheximida previene la replicación del DNA nuclear pero no el mitocondrial y la infección con el virus Ad2 cambia el - modelo de replicación pero no la síntesis de DNA mitocondrial.62

G2, M y DIVISION:

La célula entra a G2 después de completar su período S. Un daño al DNA puede prevenir el progreso hacia la mitosis. Varias condiciones arrestan a la célula en G2: cAMP dibutilil, algunas drogas utilizadas en quimioterapia etc. Durante G2 ocurre la preparación para la mitosis, como - reorganización de filamentos de actina, la tubulina, componente del aparato mitótico se hace durante S y G2. El evento que inicia la mitosis es desconocido pudiendo depender de los niveles de factores citoplasmáticos inhibidores, fusión S/G2, fusión G2 temprana/G2 tardía, la - fusión de células mitóticas con células interfásicas pro

voca condensación prematura de cromosomas. Entonces durante el período S la célula se transforma de diploide en tetraploide pues duplica su contenido de - DNA.

MITOSIS:

La división celular se compone de la división o reparto del material nuclear denominado en sentido estricto mitosis y de la división citoplásmica o citocinesis; (mitosis del griego mitos- filamento; citocinesis del griego citos- célula y cinesis- movimiento). Sin embargo, en sentido amplio suele identificarse mitosis con división celular. Este proceso consiste esencialmente en la distribución a dos células hijas de los materiales celulares duplicados en la interfase previa. La mitosis, tanto por motivos de análisis citológico como de exposición didáctica es subdividida en etapas, aunque el proceso natural es continuo evidentemente.

Únicamente se citan las etapas sin extenderse en su explicación amplia, estas son: Profase, telofase, a su vez la profase se subdivide en: metafase y anafase.

SINCRONIZACIÓN:

La sincronización de células en un cultivo in vitro ha facilitado el estudio de los eventos moleculares que ocurren durante el ciclo celular, esto se consiguió colocando el cultivo a una temperatura tal o en presencia de un tratamiento químico que bloqueara el ciclo celular en una determinada fase, por medio de estos artificios es posible conseguir que un cultivo cuyas células se encuentren a lo largo de los diferentes períodos (G1, S, G2 o mitosis) prosiga en ciclo hasta acumular sus células en la fase bloqueada. Al eliminar las condiciones de inhibición restaurando las condiciones normales de cultivo, todas las células continúan el ciclo a partir de la misma fase. Por lo tanto, en estos cultivos es posible estudiar los fenómenos bioquímicos que ocurren en cada período. Los agentes bloqueadores más utilizados son: Timidina, ameptoterina, adenosina y fluorodeoxy uridina y - la variación en la concentración de nutrientes en los medios de cultivo.

MATERIAL Y METODOS:

Las líneas celulares de fibroblastos se derivaron de explantes primarios de piel procedente de prepucios obtenidos al tiempo de la circuncisión de 10 sujetos normales, estos fibroblastos en monocapa se encontraban cubiertos con medio esencial mínimo de Eagle (MEM), adicionado de 10% de suero fetal de ternera en una atmósfera -

de 95% de oxígeno y 5% de CO₂. Se sembraron 10 botellas de 8 onzas con 1.5×10^6 células en cada botella, las células estaban a 37°C en las condiciones antes mencionadas durante 48 horas. Al finalizar las 48 hrs. se bloquearon con timidina fría a una concentración 6mM durante 16 hrs. tiempo en el cual se retiró el bloqueo para analizar a intervalos de 2 hrs. la duración del período S, para lo cual se realizó en una alicuota de células la purificación de núcleos para la cuantificación de DNA, y otra alicuota se sometió a estudio de citofluorografía. En un procedimiento experimental separado al finalizar las 16 hrs. de bloqueo con timidina fría se hizo la incorporación de timidina tritiada a las diferentes preparaciones celulares para estudio de incorporación de este precursor radioactivo al DNA de acuerdo a la fase del ciclo celular en que los fibroblastos se encontraban.

Incorporación de timidina 3H al DNA. - La incorporación de timidina 3H a las células en monocapa se realizó una vez terminado el bloqueo con timidina fría. Dicha incorporación se estudió cada 2 horas; hasta cubrir un período de 12 hrs. utilizando una concentración de .1 uCi/ml (1 pm/ml) de medio de incubación al finalizar cada tiempo de incorporación de timidina, las células se lavaron con PBS, se tripsinizaron y se hizo un precipitado de células que fueron sometidas a lavado por centrifugación 2 veces más. La suspensión de células lavadas fueron sometidas a ultrasonido para su ruptura, sometiendo los sonificados celulares a conteo.

Cuantificación de DNA. - La cuantificación de DNA se realizó en preparaciones de núcleos limpios obtenidos de células intactas sometidas a choque hipotónico para producir su ruptura por medios mecánicos, asegurándonos de mantener la integridad anatómica del núcleo, el procedimiento que se utilizó para la cuantificación de DNA, fue la de Santoianni y Ayala 64.

La citofluorometría se realizó mediante la tinción de células con bromuro de etidio utilizando un aparato que se denomina citofluorómetro equipado con un rayo laser de argón-helio y que permite el análisis de las células através de la medición de la cantidad de fluorescencia emitida por cada núcleo de la célula, esta información se colecta en un analizador de multicanales lo que da como resultado la formación de un histograma, la proporción de células distribuidas através de las diferentes fases del ciclo celular queda integrando el histograma. 65, 66 y 67.

RESULTADOS.

En la tabla No. 1 se resumen los porcentajes obtenidos en los diferentes períodos de incubación, observándose -

un máximo de 91% en G1 a las 6 horas y su desplazamiento a 30.5% a las 8 hrs. de incubación. En las gráficas A, B, C, y D se señalan los histogramas de la citofluorografía observándose los picos de las poblaciones celulares en cada una de las fases del ciclo celular.

El aumento en la incorporación de timidina ^3H al DNA durante el período S del ciclo celular alcanza un máximo a las 8 hrs. y a partir de este tiempo comienza el paso a G2, gráfica E.

Utilizando las degradaciones por minuto promedio de 2 experimentos se transformó matemáticamente a fentomolas por hora de incubación de DNA, observándose un pico entre las seis y ocho horas con 117.6 fm hora de incubación, gráfica F.

DISCUSION.-

Ha sido demostrado que las células mesenquimatosas sincronizadas tienen la capacidad de producir sistemas enzimáticos similares a las células endocrinas parenquimatosas, mientras que éstas mismas actividades enzimáticas no es posible detectarlas en células mesenquimatosas asíncronas, de aquí la necesidad de desarrollar técnicas de sincronización que faciliten el estudio de vías metabólicas hormonales y la detección óptima de sistemas enzimáticos y de otras proteínas.

Dado que la afluencia de pacientes con estados intersexuales ocasionados por diferentes deficiencias enzimáticas que repercuten en grados variables de ambigüedad genital es considerable, 68, y contando además con la facilidad de mantener congeladas las líneas celulares obtenidas a partir de éstos pacientes, se vuelve más necesario y provechoso a nivel diagnóstico y de investigación el desarrollo de la manera más correcta ésta metodología para la precisa localización de éstas enzimas, en vista de que se logró la sincronización del 90% de las células en fase S, no sólo se puede mapear la vía metabólica deseada sino que además se pueden estudiar las características de cinética enzimática en los fibroblastos sincronizados derivados de piel humana normal, para posteriormente compararlos con los portadores de deficiencias enzimáticas. El estudio de una enzima es muy complejo, - representa aproximadamente 7 factores: a) especificidad del sustrato, b) concentración molar del sustrato - a la cual se encuentra la máxima actividad de la enzima c) el tiempo en el que se logra la máxima actividad de la enzima, d) los productos que inhiben la actividad de la enzima f) actividad específica de la enzima, g) peso molecular, constante de equilibrio, etc.

Hasta la actualidad muy pocas enzimas han sido estudia-

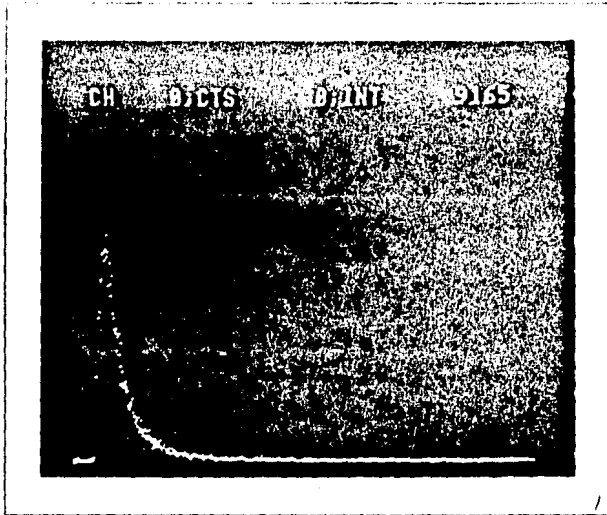
das en forma completa, conociéndose únicamente en la mayoría de ellas algunos de los primeros parámetros mencionados lo que abre un horizonte muy amplio en esta área de la investigación básica, prometiendo diagnósticos tempranos y por lo tanto tratamientos que logren buenos pronósticos.

TABLA I

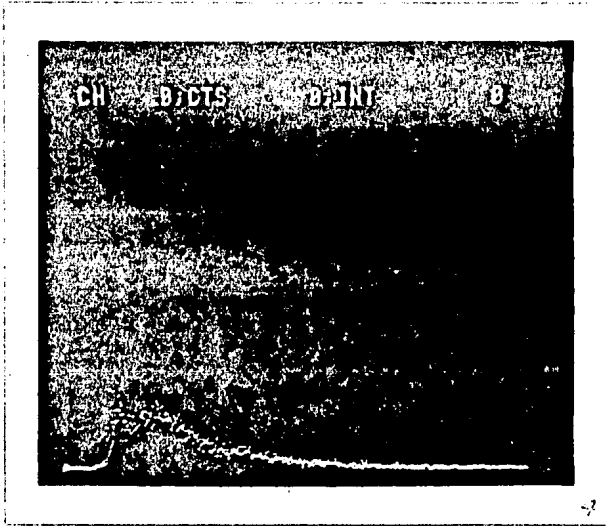
SINCRONIZACION DE FIBROBLASTOS HUMANOS POR EL USO DE TIMIDINA

ANALISIS CITOFLUOROGRAFICO

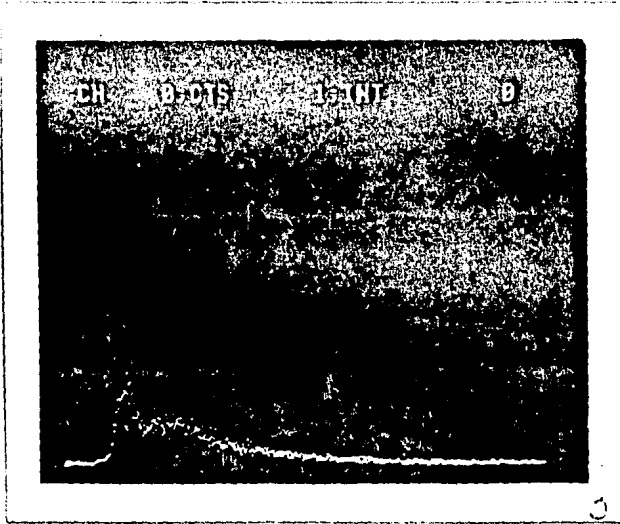
TIEMPO HRS.	FASE G1	FASE S+g2	FASE s+G2
0	91%	8%	
2	79.9 %	20.71%	
4	55.66%	44.64%	
6	35.79%	64.44%	
8	30.50%	69.31%	
10	27.46%		72.51%
12	21.74%		77.80%



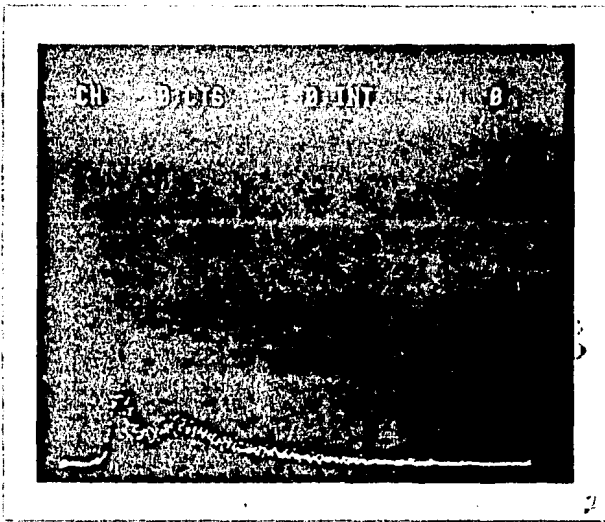
GRAFICA A



GRAFICA B

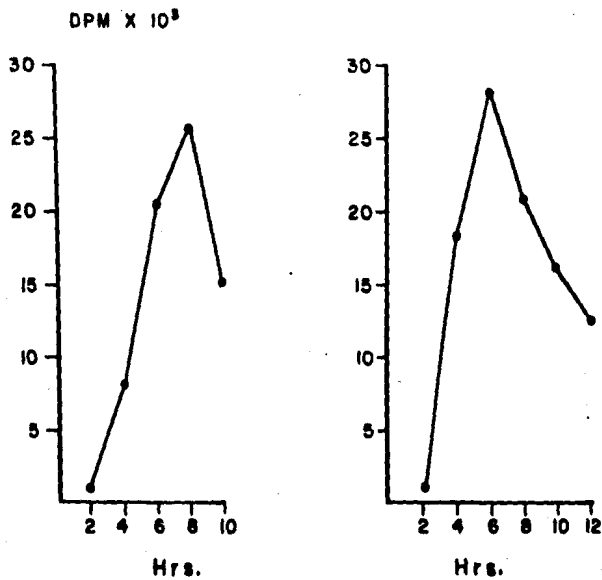


GRAFICA C



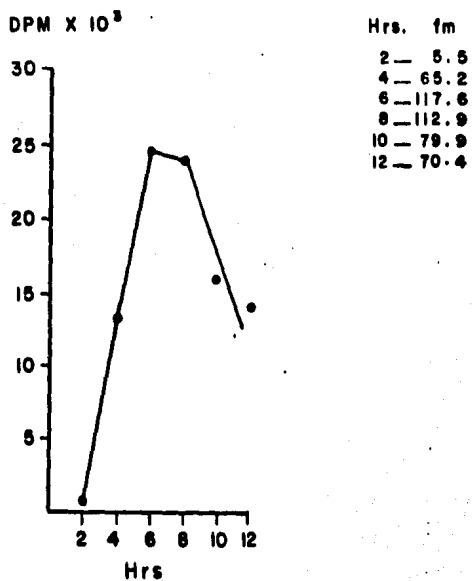
GRAFICA D

INCORPORACION DE TIMIDINA 3 H DURANTE LA FASE S DEL CICLO
CELULAR EN FIBROBLASTOS HUMANOS SINCRONIZADOS



GRAFICA E

INCORPORACION DE TIMIDINA 3 H DURANTE LA FASE S DEL CICLO
CELULAR EN FIBROBLASTOS HUMANOS SINCRONIZADOS



GRAFICA F

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

- 1.- Junqueira, Carneiro y López. *Biología Celular* 1a. Edición. La Prensa Médica Mexicana 1976.
- 2.- Ashihara T. , Baserga, R. *Methods in Enzymology* 58, 248-262 (1979)
- 3.- Parder, A.B., Dubrow, B., Hamlin, J.L., Klitzien, R.F. *Ann. Rev. Biochem.* 47:715-50 (1978)
- 4.- Baserga, R. *The New England Journal of Medicine* 304, 453, 459 (1979)
- 5.- Martin, R.G., Stein, S. 1976 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 73:1655-59
- 6.- Pardee, A.B. 1974 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71:1286 90
- 7.- Hatten, M.E., Horowitz, A.F. Burger, M.M. 1977. *Exp. Cell. Res.* 107:31-34
- 8.- Smith J.A., Martin L. 1973 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70:1263-67
- 9.- Klevecz, R.R. 1976 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73:4012 16
- 10.- Brooks. R.F. 1976. *Nature* 260: 248-50
- 11.- Burstin, S.J. Meiss, H.K., Basilico C, 1974. *J. Cell Physiol.* 84:397-408
- 12.- Sokawa, Y. Watanabe, Y., Watanabe M., Kawade, Y., 1977 *Nature* 268:236-38
- 13.- Rao, P.N. Piasad, S.S., Wilson, B.A. 1977 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:2869-73
- 14.- Tenner A., Zieg, J., Scheffer, I.E. 1977 *J. Cell Physiol.* 90:145-60
- 15.- Rutherford, R.B., Ross, R. 1976. *J. Cell. Biol.* 69:196-203
- 16.- Westermark, B., Wasteson, A. 1976 *Ep. Cell. Res.* 98: 170-74
- 17.- Antoniadis, H. N., Stathakos, D., Scher, C.D. 1975 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72:2635-39

- 18.- Antonlades, H.N. Scher, C.D. 1977 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:1973-77
- 19.-Burk, R.R. 1976 Exp. Cell Res. 101:293-98
- 20.-Bovine H.R. Rozengurt, E. 1976 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 4555-59
- 21.-Wolf L., Kohler N., Roehm C., Lipton A. 1975. Exp. Cell Res. 92:63-69
- 22.-Klagsbrun, M., Langer, R. Levenson, R., Smith S., Lillehei, C. 1977. Exp. Cell Res. 105:99-108
- 23.-Jimenez de Asua, L. Clingan, D., Rudland, P.S. 1975 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 2724-28
- 24.-Jimenez de Asua, L. Carr, B, Clingan D., Rudland P. 1977 Nature 265:450-52
- 25.-Rechler, M.M., Podskalny, J.M. 1976 Nature 259:134-36
- 26.-Rechler M.M., Podskalny, J.M. Nissley, S.P. 1977, J. Biol. Chem 252:3898-910
- 27.-Raizada, M.M., Perdue J.F. 1976 J.Biol. Chem. 251: 6445-55
- 28.-Chou, I.N., O'Donnell, S.p. Black, P. H., Roblin, R.O. 1977. J. Cell Physiol. 91:31-36
- 29.-Dulbecco R., Elkington, J. 1975 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:1584-88
- 30.-Swierenga, S.H.H., MacManus, J.P., Whitfield, J.F. 1976 In Vitro 12:31-36
- 31.-Whitfield, J.F., MacManus, J.P., Ri on R.H. Boynton A.L. Youdals, T., Swiwrenga S, 1976. In Vitro 12:1-18
- 32.-Rubin, H. 1975 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:3551-55
- 33.-Rubin, H. 1975 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:1676-80
- 34.-Whittenberger, B. Glaser. L. 1977 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:2251-55
- 35.-Lipkin, G., Krecht, M.E 1976. Exp. Cell Res. 102:341-48
- 36.-Edelman, G.M. 1976, Science 192; 218-26
- 37.-Mc.Clain, D.A., Eustachio B.D. Edelman G.M. 1977. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:666-70

- 38.- Mc Clain, D.A., Eustachio, P.D. Edelman, G.M. 1977 .
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:666-70
- 39.- Pardee, A.B. 1976 In International Workshop on Cell
Surfaces and Malignancy pp 117-2u Bethesda, Md. National
Institutes of Health.
- 40.- Plagemann, P.G. W., Richey, D.P. 1974 Biochem, Biophys
Acta 344:263-306.
- 41.- Melero J.A., Salas M.L. Salas, J. 1976 Eur.J.Biochem.
67:341-48
- 42.- Tanaka, K., Ichichara, A. 1976 Ep. Cell. Res. 99:1-6
- 43.- Baserga R. 1976 Multiplication and Division in Mammalian
Cells. New York; Marcel Dekker. 239pp
- 44.- Johnson, L.F. Williams, J.G., Abelson, H.T. Green, H., Penman
S. 1975 Cell 4:69-75
- 45.- Johnson, L.F., Penman S., Green, H. 1976. J. Cell. Physiol
87:141-46
- 46.- Bandman, E., Gurney, T. 1975 Ep. Cell. Res. 90-159-68
- 47.- Rudland, P.S. Weil S., Hunter, A.R. 1975. J. Mol. Biol.
96:745-66
- 48.- Williams, T.G. Penman, S. 1975. Cell 6:197-206
- 49.- Pastan, L., Johnson, G.S. 1974. Adv. Cancer Res. 19:303-
36.
- 50.- Pastan, I.H., Johnson, G.S. Anderson, W.B. 1975 Ann. Rev. Biochem.
44:491-522
- 51.- Costa, M., Gerner, E.W., Russell, D. H. 1976
J. BIOL. Chem. 251:3313-20
- 52.- Maller, J.L., Krebs, E.G. 1977. J. Biol. Chem. 252:1712-19
- 53.- De Morales, M.M., Blat, C., Harel, L. 1974 Ep. Cell Res.
86:111-19
- 54.- Blenkinsopp, W.K. 1968. Exp. Cell. Res. 50:265-76
- 55.- Cairns, J. 1966. J. Mol. Biol. 15:372-73
- 56.- Callan, H.G. 1973. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.
38:195-204
- 57.- Wang, E.G., Henner, D., Furth, J.J. 1975. Biochem Biophys. Res.
Commun. 65:1177-83

- 58.- Weissbach,A.1977. Ann.Rev. Biochem.46:25-47
- 60.- Herrick,G.,Spear,B.B.,Veomett,G. 1976 Proc. Natl.Acad. Sci. USA. 73:1136-39
- 61.-Spalding,J.,Kajiwara,K., Mueller,G. C. 1966 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56:1535-42
- 62.-Fischer-Fantuzzi,L., Marín,G.Vesco,C. 1975 Eur.J.Biochem. 60:505-11
- 63.-Krishan,A., Frei,E.111. 1976. Cancer Res. 36:143-50
- 64.-Santoianni,P. y Ayala,M. Journal Inv. Dermatology 25, 99(1965)
- 65.-Ashihara,T.et al Cancer Research 38(2514-2518).1978
- 66.-Darzn Kiewiez,D., et al. Hormon Research 37,(4635-4640) 1977.
- 67.-Pollack,A., et al Science 203,(1025-1027)1979
- 68.-Bassol,S.,Ulloa-Aguirre, A., Pérez A.B., Méndez,J.P., Pérez-Palacios,G., Rev.Invest.Clin.(Me .) 36:231-235 1984.