

Leji 137

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

"EFECTO DE ALGUNAS HORMONAS ESTEROIDES SOBRE LA ESTIMULACION POR FITOHEMAGLUTININA (PHA), EN LINFOCITOS DE HUMANO EN CULTIVO".

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

PRESENTA

MARIA TERESA PEÑA RANGEL

México, D.F., enero de 1983



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

	Página
I. INTRODUCCION	1
a) Comunicación.	1
b) Sistema endócrino.	3
-Hormonas esteroides.	3
-Ciclo menstrual.	5
-Mecanismo de acción de estrógenos y progesterona.	8
c) Ciclo celular.	10
d) Linfocitos.	11
II. MATERIALES Y METODOS	14
a) Obtención de linfocitos y siembra.	14
b) Parámetros para determinar el crecimiento de la población celular.	14
-Número de figuras mitóticas.	15
-Incorporación de ³ H-Timidina.	15
-Conteo de células vivas.	16
c) Cultivos con sangre periférica de mujer.	17
d) Cultivos con sangre periférica de varón.	17
e) Cultivos con sangre periférica de varón, tratados con estradiol y/o progesterona.	18
f) Análisis estadístico.	19
III. RESULTADOS Y DISCUSION.	21
IV. RESUMEN Y CONCLUSIONES.	76-
V. BIBLIOGRAFIA.	78

LISTA DE ABREVIATURAS.

ACTH. Hormona adrenocorticotrófica.
ADN. Acido desoxirribonucléico.
AMP_c. Monofosfato de adenosina cíclico.
ARN. Acido ribonucléico.
ATP. Trifosfato de adenosina.
Con A. Concanavalina A.
CPM. Cuentas por minuto.
DPM. Desintegraciones por minuto.
Et. Error típico.
FSH. Hormona folículo-estimulante.
GCH. Hormona gonadotrófina coriónica.
GH. Hormona del crecimiento.
GL. Grados de libertad.
GMP_c. Monofosfato de adenosina cíclico.
³H-Timidina. Timidina tritiada.
HCl. Acido clorhídrico.
LH. Hormona luteinizante.
MC. Media de cuadrados.
PHA. Fitohemaglutinina.
PRL. Prolactina.
rpm. Revoluciones por minuto.
SC. Suma de cuadrados.
SDS. Dodecil sulfato de sodio.
TCA. Acido tricloroacético.
THAM. Tris-hidroximetil-amino metano.
TSH. Hormona estimuladora de la tiroides.

I. INTRODUCCION.

a) Comunicación.

La capacidad de comunicación, es una propiedad fundamental de los seres vivos, que les permite mantenerse en contacto e interactuar con el medio que les rodea, mediante un flujo de información bidireccional.

Shannon en 1948 (Tomado de Pierce, 1972), propuso un esquema de comunicación universal, que consta de una fuente de información, capaz de transmitir un mensaje, el cual es procesado por un transmisor que envía la señal a través de un canal hacia un receptor, dando este último después de interpretarlo, una respuesta.

Este patrón puede adaptarse a todos los niveles de complejidad en los sistemas biológicos, dando como resultado un cambio en el comportamiento del destinatario, que en consecuencia pasa a ser fuente de información.

En el desarrollo del presente trabajo, es de interés particular, la comunicación a nivel celular.

Este nivel de comunicación se ha agrupado en tres clases: genética, metabólica y nerviosa (Stent, 1972).

La comunicación genética depende de la información almacenada en una determinada secuencia de nucleótidos, que forman a la molécula de ADN, que posteriormente se replica, o se transcribe y traduce. El flujo de este tipo de información a lo largo de la historia del planeta, trae como consecuencia la continuidad, diversidad y evolución de los seres vivos.

La comunicación metabólica consiste en la liberación de mensajeros químicos, generalmente denominados hormonas, a partir de una célula secretora, los cuales viajan entre diversas poblaciones celulares hasta hacer contacto con una de células blanco, modificando de alguna manera su metabolismo.

En este caso, el flujo de información, por una parte controla el desarrollo normal de los organismos multicelulares, al dar instrucciones sobre la forma y momento de dife-

renciación en diversos tipos de células y por otro lado, interviene en los procesos de homeostasis, que le permiten al organismo mantenerse en un estado de equilibrio dinámico, como respuesta a los cambios que ocurren en el medio ambiente.

La comunicación nerviosa depende de las señales eléctricas generadas por las neuronas, originadas por estímulos físicos o químicos, que por lo general liberan como consecuencia, neurotransmisores a través de las terminales nerviosas, los cuales pueden mediar desde la contracción muscular hasta el control de los patrones de conducta.

Sin embargo al estudiar estos tipos de comunicación, se observa que existe una relación muy estrecha entre la clasificada como metabólica y la nerviosa. Un ejemplo claro es el hecho de que las hormonas secretadas por la médula adrenal cuya parte interna contiene gran cantidad de tejido nervioso y la parte externa, tejido mesodérmico, produce la epinefrina y la norepinefrina con estructuras muy similares entre sí. La primera estimula la síntesis de glucógeno en varios tejidos y la segunda tiene acción sobre diversas partes del sistema nervioso simpático, de tal manera que estas sustancias además de actuar como hormonas, funcionan como neurotransmisores en ciertas uniones nerviosas (Luria, 1975).

Así puede considerarse que un mecanismo de comunicación empleado normalmente entre células nerviosas o entre células nerviosas y musculares, se ha adaptado a la acción hormonal, en donde una señal nerviosa modula el funcionamiento de una glándula. Ambos mecanismos relacionados y coordinados en la liberación de hormonas y neurotransmisores, muy antiguos desde el punto de vista evolutivo, dejan claro que es más conveniente clasificarlos como un solo sistema de comunicación, la comunicación neurohumoral (O'Malley y Schrader, 1976).

Sin embargo, considerando el funcionamiento del sistema inmune, en donde el contacto de un antígeno con el receptor de superficie de un linfocito, es la señal que inicia -

el desencadenamiento de la respuesta inmune; León-Cázares (1980), propone otra clasificación: comunicación genética, comunicación neurohumoral y comunicación inmune.

Para los fines del presente trabajo, los tres sistemas de comunicación están involucrados, pero la comunicación neurohumoral e inmune son las de mayor peso.

b) Sistema endócrino

El funcionamiento del sistema endócrino involucra tres etapas de interacción hormona-célula blanco, bajo la actividad del hipotálamo, modulada por estímulos transmitidos por el sistema nervioso. El esquema general sobre dicha organización se presenta en la figura 1.

Las hormonas, sustancias que se producen en pequeñas cantidades, secretadas por diversas glándulas y que actúan como mensajeros químicos, son llevadas por la sangre a distintos órganos blanco, donde regulan una enorme variedad de actividades fisiológicas y metabólicas. Las células blanco de una hormona poseen receptores específicos de naturaleza protéica, capaces de reconocerla. Los receptores de las hormonas hidrosolubles se localizan en la membrana celular a diferencia de los receptores de las hormonas liposolubles, que están localizados en el citoplasma. La unión de la hormona a su receptor, provoca la formación de un mensajero intracelular que posteriormente estimula o inhibe la actividad de la célula blanco, generalmente, el mensajero intracelular es un nucleótido cíclico (AMP_c y/o GMP_c), en el caso de las hormonas liposolubles, el complejo receptor-hormona, es considerado el mensajero intracelular.

-Hormonas esteroides.

En particular, las hormonas esteroides, tiene una estructura común, el ciclopentano perhidrofenantreno. Las diferencias entre los varios esteroides, están dadas por el patrón de enlaces químicos dentro de los anillos y por la naturaleza y orientación de los grupos laterales unidos a estos.

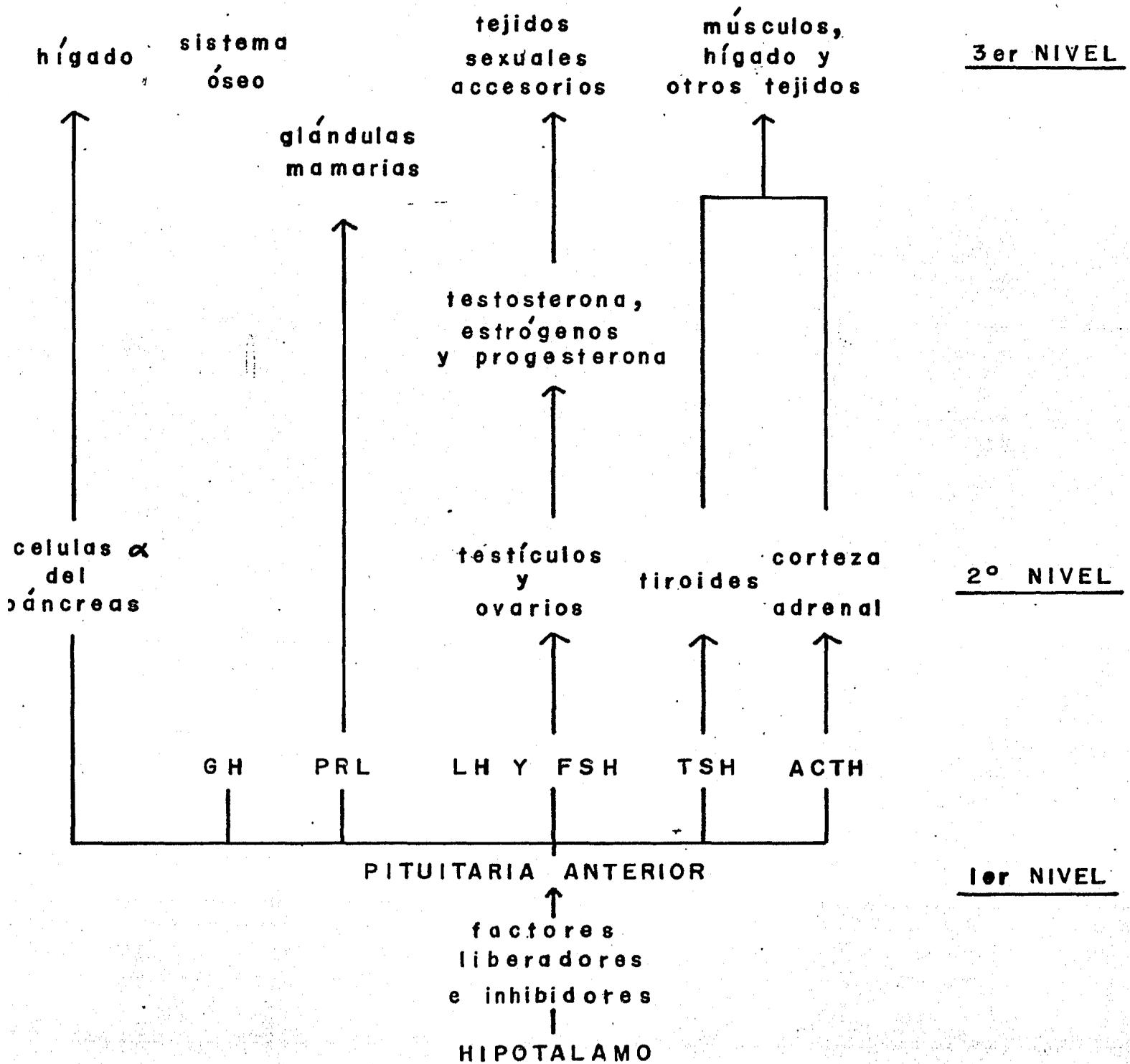


FIGURA 1. Regulación endócrina (Adaptado de Lehninger, 1978).

Sus similitudes estructurales están dadas por su origen, ya que todas son sintetizadas a partir del mismo precursor, el colesterol. Las fórmulas de algunas de estas hormonas se muestran en la figura 2.

Existen varios grupos de este tipo de hormonas.

1. Los estrógenos u hormonas sexuales femeninas como el 17β estradiol y la estrona.
2. Los andrógenos u hormonas sexuales masculinas como la testosterona y dihidrotestosterona.
3. Las hormonas progestacionales como la progesterona.
4. Las hormonas de la corteza adrenal como el cortisol, la aldosterona y la corticosterona.

En particular, el primer y tercer grupo son los de interés en el presente trabajo.

Por lo general, durante el desarrollo embrionario y postnatal inmediato, las hormonas sexuales influyen directamente sobre la diferenciación sexual del sistema nervioso, esto es, sobre el patrón de conexiones nerviosas y la organización de los circuitos en ciertas partes del cerebro. En organismos adultos, los esteroides secretados por los ovarios y los testículos, estimulan por un lado la conducta sexual, actuando sobre las células nerviosas del cerebro, y por otra parte, actúan sobre tejidos asociados con funciones sexuales en las hembras, sobre la vagina, el útero, los oviductos y las glándulas mamarias y en los machos, sobre la vesícula seminal y la próstata (McEwen, 1976).

-Ciclo menstrual.

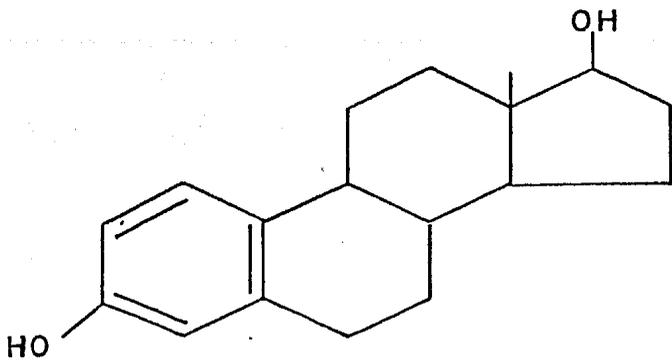
Uno de los aspectos más interesantes de la función de los esteroides, es la regulación del ciclo sexual en las hembras de muchas especies de mamíferos.

En el humano, dicho ciclo tiene una duración promedio de 28 días, se presenta a partir de la pubertad, finaliza con la menopausia y se interrumpe durante la preñez.

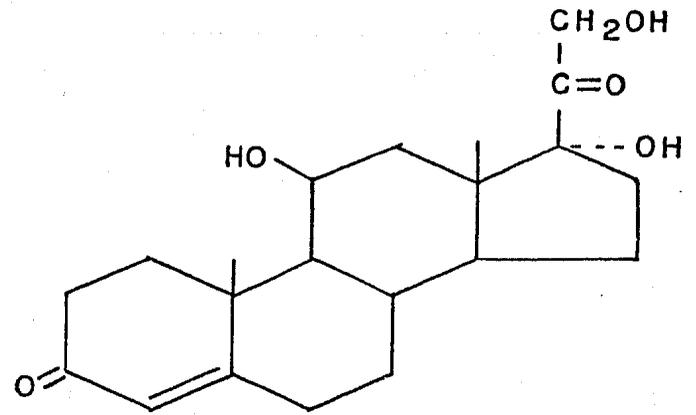
Al inicio de cada ciclo, un cierto número de óvulos dentro de los folículos ováricos, empiezan a madurar y generalmente sólo uno completa el desarrollo. Los folículos aumen--

HORMONAS SEXUALES

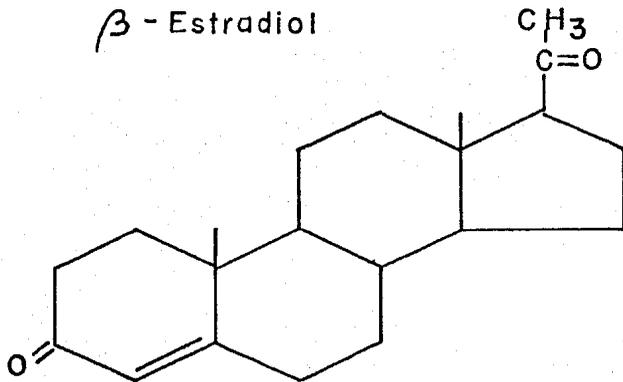
ADRENOCORTICOSTEROIDES



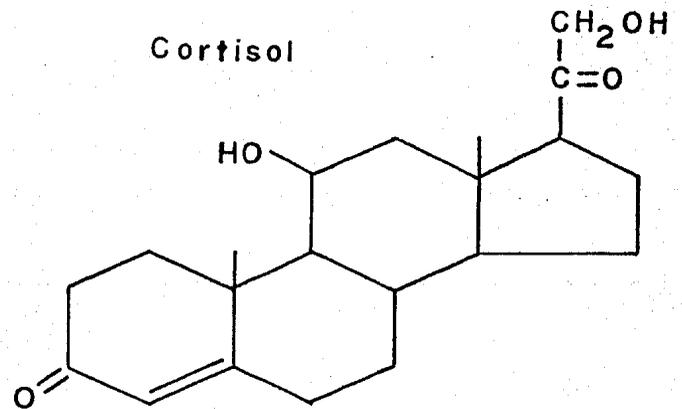
β - Estradiol



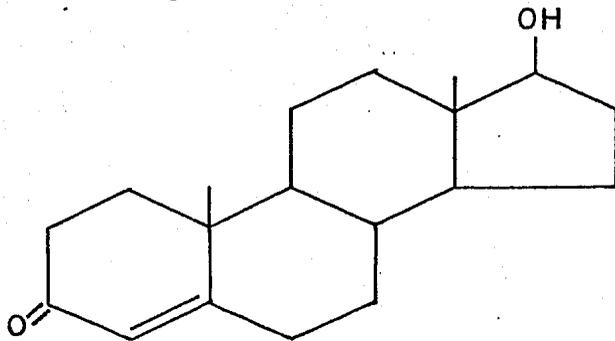
Cortisol



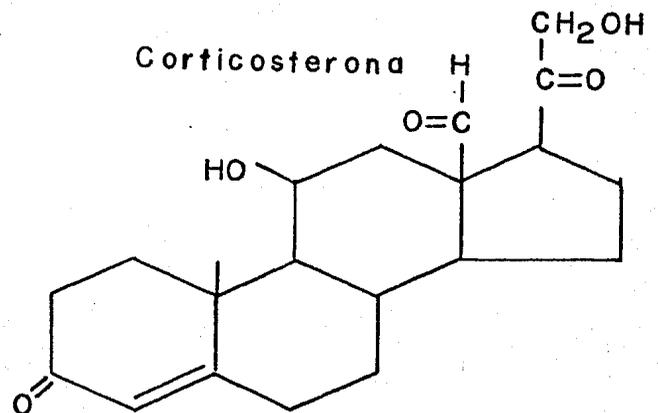
Progesterona



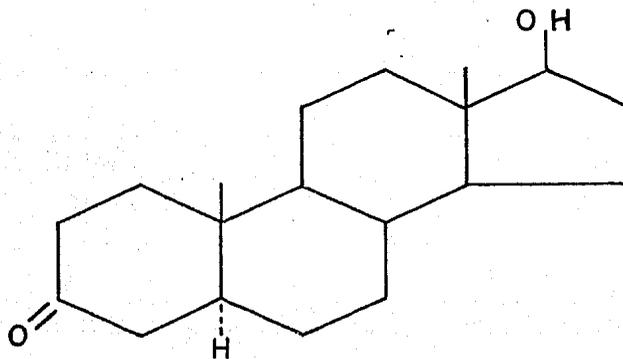
Corticosterona



Testosterona



Aldosterona



Dihidrottestosterona

Figura 2. Principales Hormonas Esteroides

(Adaptado de Lehninger, 1978)

tan en tamaño y número de células, durante la primera etapa del ciclo, bajo la acción de la FSH y durante este crecimiento, las células secretan determinados niveles de estrógenos, tales como el estradiol, que actúa sobre el útero y la pituitaria, estableciéndose con esta última, un mecanismo de retroalimentación, de tal manera que la pituitaria reduce la liberación de FSH. En el útero, actúa estimulando el crecimiento del endometrio.

Conforme transcurre el ciclo y el folículo sigue aumentando su tamaño, la liberación de FSH disminuye y son ahora los niveles de la LH, los que predominan. Dicha hormona completa la maduración del óvulo y provoca el rompimiento del folículo, permitiendo la salida del óvulo que desciende por una de las trompas de Falopio. En consecuencia, las células del folículo cambian su expresión génica y constituyen el cuerpo lúteo que secreta progesterona, la cual controla la proliferación de las células del endometrio y en caso de que haya fecundación, favorece la interacción del útero con las células del blastocisto, llevándose a cabo la implantación. Dicho cuerpo lúteo deja de funcionar si es que no hay fecundación o implantación, el óvulo degenera y un nuevo número de folículos empiezan a crecer. El cambio en los niveles de estradiol y progesterona trae como consecuencia la degeneración de una gran cantidad de células del endometrio y su desprendimiento, es decir la menstruación (Grobstein, 1979).

Si el óvulo fue fecundado, experimenta una serie de cambios con divisiones sucesivas, formando primero una mórula y posteriormente un blastocisto, que se implanta en las paredes del útero, si las condiciones medioambientales son favorables para ello. La capa de células más externa del embrión en desarrollo, llamada córion, conforme prolifera, produce grandes cantidades de una hormona semejante a la progesterona, la GCH, la cual previene el desprendimiento de gran parte del endometrio y por lo tanto permite la implantación y el desarrollo del embrión (Grobstein, 1979).

-Mecanismo de acción de estrógenos y progesterona.

Sobre la forma de acción de la progesterona y los estrógenos, se ha demostrado (Stormshak, 1981), que entran por difusión pasiva a la célula blanco y se unen a un receptor citoplásmico de naturaleza protéica, con el cual forman un complejo y así viajan hacia el interior del núcleo, en donde interactúan con la cromatina.

Karolson en 1964 (citado en O'Malley y Schrader, 1976), propuso que el complejo hormona-receptor realiza un papel similar al de los inductores en las bacterias, al combinarse con proteínas represoras, de acuerdo al modelo de Jacob y Monod (1961), sobre los mecanismos de regulación génica y la síntesis de proteínas.

Debido a la complejidad de las células eucariontes, los esteroides se acoplan a receptores citoplásmicos de naturaleza protéica y de esta manera tienen un efecto regulador sobre los genes, cuando el complejo se une a determinados sitios específicos localizados en una fracción de las proteínas no histónicas (O'Malley y Schrader, 1976). En consecuencia se desencadena una serie de eventos de transcripción y traducción que traen como resultado una respuesta característica, cuya magnitud, parece estar relacionada con la concentración intracelular de receptores que puede variar dentro del mismo tipo celular y no es fija para los diferentes órganos blanco, sino que puede cambiar dependiendo de algunos factores como el tiempo de vida del individuo, el estado fisiológico y aún por la presencia de ciertas hormonas (Robel, et al. 1981).

Parece ser que los estrógenos no sólo estimulan la síntesis de sus propios receptores, sino también de los receptores a la progesterona, además que esta actúa cooperativamente con los estrógenos a ciertos niveles y de una manera antagonista en otras concentraciones fisiológicas (Robel, et al. 1981).

Oka y Schimke (1969), en estudios realizados en pollos, demostraron, que la progesterona administrada simultáneamen-

te con los estrógenos, inhibe la acción de estos últimos sobre el aumento en la producción de la lisozima, sugiriendo que la progesterona impide los procesos de diferenciación de las células epiteliales del oviducto, provocada por el tratamiento con los estrógenos. Así mismo, O'Malley (1974), demostró que la progesterona está involucrada en la inducción de la síntesis de una proteína, la avidina, en oviductos tratados con estrógenos.

Otros resultados, obtenidos por Cox y Sauerwein (1970), indican que en ausencia de estrógenos, en pollos de 8 semanas, la progesterona provoca la diferenciación de las células del oviducto, después de dos días de tratamiento con la hormona y observan gran cantidad de cambios morfológicos tales como un aumento en el número de mitocondrias, mientras que el aparato de Golgi y el retículo endoplásmico se vuelven muy prominentes.

Parecería que el efecto inhibitor de la progesterona, en presencia de estrógenos a nivel celular, es debido a que dispara algunos cambios bioquímicos y morfológicos, en un cierto porcentaje de la población, que reduce así el número de células susceptibles a los estrógenos.

Es evidente que existe una influencia de ambas hormonas sobre la proliferación celular en varios tejidos, sin embargo el mecanismo molecular se desconoce. La producción de diferentes especies de ARN, en el núcleo de las células blanco sugiere que regulan la síntesis de proteínas, ejerciendo un efecto primario sobre la transcripción de los genes.

En algunos trabajos, se han encontrado ciertas evidencias en donde al parecer, los niveles de mensajeros secundarios, AMP_c y GMP_c, resultan afectados por la acción de los estrógenos y la progesterona. La administración del 17 β estradiol, provoca un ligero aumento en los niveles de AMP_c en el útero de la rata, sugiriendo que esta molécula juega un papel importante en la respuesta celular, pero como un efecto secundario más que primario (Kissel, et al. 1970). Por otro lado, la progesterona produce una estimulación en la ac-

tividad de la adenilato ciclasa, enzima que regula la conversión de ATP en AMP_c, en oviducto de pollo (Rosenfeld y O'Malley, 1970).

c) Ciclo celular.

Uno de los principales eventos en el ciclo celular, consiste en duplicar todos los componentes celulares, en donde la parte fundamental y por tanto la responsable de la conservación y potencialidad de cada tipo de célula, es la replicación de la molécula de ADN, seguida de una división que los distribuye a las células hijas.

Dicho ciclo se divide convencionalmente en cuatro fases llamadas G₁, S, G₂ y M, en donde las tres primeras se definen con base en las diferentes moléculas sintetizadas en cada una de ellas y en la cuarta se lleva a cabo la división celular (Lerner y Dixon, 1973).

A las células que responden a estos eventos se les conoce como células cíclicas, características de tejidos epiteliales como el de la piel y el sistema que forma la sangre, en donde la producción de nuevas células, esta modulada de tal manera que se compensa la pérdida continua de células envejecidas.

Existen también células denominadas no cíclicas, que se caracterizan por detenerse en una fase llamada G₀, éstas inician su diferenciación y por lo tanto no ocurre un evento posterior de síntesis, ni división (Mazia, 1974), tal es el caso de las células del sistema nervioso y muscular, las cuales cesan de reproducirse y llevan a cabo su diferenciación.

Sin embargo, dentro de las células no cíclicas, se encuentran algunos tipos celulares que se detienen durante tiempo indefinido en la fase G₀, pero que bajo ciertas condiciones medio ambientales, son capaces de entrar a la fase G₁ y posteriormente a la división celular, como es el caso de los linfocitos, las células principales en la respuesta inmune, el proceso por el cual un organismo responde a su medio y en donde al parecer, el contacto con un antígeno, puede --

ser el evento que desencadena la entrada a la fase G_1 (Lerner y Dixon, 1973).

Este evento puede darse en forma natural en las reacciones de inmunidad, o de una manera artificial, al cultivarse en el laboratorio, sometiéndolas a la acción de ciertas glucoproteínas, en su mayoría de origen vegetal, como son las lectinas y en especial la fitohemaglutinina (PHA), que actúa como antígeno inespecífico in vitro (Sharon, 1977).

d) Linfocitos.

Behring y Kitazato, en 1890 (citado en Jerne, 1973), descubrieron la existencia de los anticuerpos y fue hasta 1960, que se determinó su estructura. En 1950 no se pensaba que los linfocitos formaran parte del sistema inmune y fue 10 años más tarde que se probó su participación en la respuesta inmune.

La gran mayoría de la población de linfocitos, son los llamados linfocitos pequeños, células esféricas que miden aproximadamente $10\mu\text{m}$ de diámetro y se dice que están en estado quiescente. Las células descendientes de un linfocito pequeño, constituyen una clona. En 1957, Burnet (citado en Jerne, 1973), postuló que los anticuerpos producidos por un linfocito y por las células de su clona, son moléculas idénticas. Las células de cada clona, están destinadas a expresar genes que codifican regiones variables particulares de las cadenas ligeras y pesadas de las inmunoglobulinas. En estado quiescente, un linfocito pequeño produce una cantidad mínima de estas moléculas, las cuales se distribuyen sobre la superficie de la membrana celular, constituyendo sus receptores, capaces de reconocer determinadas moléculas, los antígenos.

El que un linfocito sea estimulado al hacer contacto con un antígeno, depende de varias condiciones, como son su concentración, el grado de especificidad con los sitios receptores, la forma en la que se presentan y la ausencia o presencia de otros linfocitos que ayudan o suprimen la respuesta.

Un linfocito estimulado tiene dos tareas, al dividirse y diferenciarse dá como consecuencia una célula plasma, adaptada exclusivamente a la síntesis y secreción de anticuerpos específicos y una célula de memoria, la cual continúa circulando a través del torrente sanguíneo, llevando sobre la superficie como receptor, la misma inmunoglobulina -- que la producida por la célula plasma.

Todos los linfocitos que circulan por los diferentes tejidos, descienden de células precursoras de la médula ósea. Aproximadamente la mitad de la población, son células T, las cuales han pasado a través del timo durante su recorrido, la otra mitad, las células B, no sufren la influencia del timo y son estas últimas y su progenie, las únicas que secretan anticuerpos. Las células T tienen la capacidad de destruir otras células como las cancerosas y las de tejidos transplantedos con haptenos extraños. Estas células también pueden -- producir sustancias tóxicas, citotoxinas, que al ser vertidas al medio, son capaces de neutralizar a los agentes extraños que originaron su producción (Jerne, 1973).

Estas células pueden obtenerse de diversos órganos tales como nódulos linfáticos, bazo, timo, amígdalas, apéndice vermiforme y médula ósea, bien sea en fragmentos o en una -- suspensión celular y además, a partir de sangre periférica (Ling y Kay, 1975).

Ostrosky-Shejet (1972), al estudiar la influencia del medio ambiente sobre una población de linfocitos de sangre -- periférica de humano, mediante la técnica de cultivo de tejidos, encontró una variación en la estimulación de linfocitos de mujer, por la PHA, utilizando como criterio, la producción de figuras mitóticas. Realizó cultivos de sangre periférica de una donadora, en varios días durante diferentes ciclos menstruales y observó una variación cíclica con máximos en producción de figuras mitóticas, en los días 8, 11, 15, 20 y 22 y mínimos en los días 1, 6, 9, 12, 16 y 23. Dicha variación se atribuyó a una posible influencia de los niveles de hormonas esteroides contenidos en las muestras, durante --

el ciclo menstrual, con un máximo de estimulación cercano al período de ovulación, y un mínimo en los primeros y últimos días del ciclo.

Al tomar en cuenta lo anterior y con base en los antecedentes mencionados, se planteó el presente trabajo, con el objeto de obtener más elementos de juicio acerca de la influencia de los factores ambientales, como las hormonas esteroideas presentes en las muestras, sobre la capacidad de respuesta a la PHA, de los linfocitos de humano en cultivo.

II. MATERIALES Y METODOS.

a) Obtención de linfocitos y siembra.

Se tomaron muestras de 5 ml de sangre periférica de los donadores, con una jeringa humedecida con una solución de heparina de 1,000 UI/ml, y cada cultivo se realizó según una modificación a la microtécnica de Arakaki y Sparkes --- (1963). Se utilizaron frascos ampula de 10 ml, con 1 ml de medio completo, formado por un 80% de medio TC-199 (Difco - 5477), 20% de suero fetal de ternera (Gibco 614), previamente inactivado a 60°C durante 30 min, glutamina (Difco 5789) al 0.5%, 100 unidades de TC penicilina y 100 μ g de estreptomina (Difco 5854), 300 unidades de heparina (Abbott 3979) y 6 gotas de sangre equivalentes a 0.3 ml. A cada frasco se le añadió como mitógeno, 0.016 mg/ml de PHA (Difco 0528). Paralelamente se realizaron los controles correspondientes.

b) Parámetros para determinar el crecimiento de la población celular.

Existen varios parámetros para determinar el comportamiento de poblaciones celulares. En este trabajo se utilizaron tres, los cuales se describen a continuación:

1. Incorporación de ^3H -Timidina. Este criterio da un índice de actividad de las células que duplican su ADN durante el período final de incubación.
2. Conteo de figuras mitóticas. Consiste en la observación de preparaciones fijas hechas a partir de los cultivos sometidos a la acción de la Colcemid, la cual actúa como mitostático, y por lo tanto detiene en metafase a las células que han entrado a la división celular.
3. Conteo de células vivas. Se utilizó el método de exclusión con azul tripan, el cual se basa en la propiedad que tienen las células vivas de no permitir la acumulación del colorante, a diferencia de las células muertas, que quedan teñidas de azul (Phi---

llips, 1973).

Número de figuras mitóticas. A cada frasco para ser utilizado bajo este criterio, se le agregaron, 3 horas antes de la cosecha, 0.05 ml de una solución de 2 μ g/ml de Colcemid (Ciba 001641). Al término de las 72 horas de incubación el contenido de cada frasco se cosechó mediante la técnica de Moorhead (1960), que consiste en agitarlo y pasarlo a un tubo de centrifuga, centrifugando durante 10 min a 800 rpm. Se desechó el sobrenadante y el precipitado se resuspendió suavemente en agua destilada estéril a 37°C durante 15 min, al término de los cuales se centrifugó a 800 rpm durante 10 min, se retiró el sobrenadante nuevamente y el botón se resuspendió en fijador a base de metanol-ácido acético (Baker 9070 y 9507), en proporción 3:1, hasta 5 ml, incubándose -- luego a temperatura ambiente durante 15 min.

Posteriormente se centrifugó a 800 rpm durante 10 min, se desechó el sobrenadante y se repitió el paso anterior 3 veces más, ahora sin incubar, de tal forma que el botón --- quedó libre de hemoglobina y restos celulares. Los tubos se dejaron 24 horas en congelación y luego se procedió a hacer dos preparaciones de cada tubo mediante la técnica de secado al aire y tinción con una solución de Giemsa-Leishman-agua (Sigma 972 y 746), en proporción 3:1:36, durante 20 min. Finalmente se enjuagó con agua destilada y alcohol al 50%, dejándose secar las preparaciones a temperatura ambiente. Se procedió a observar al microscopio y contar el número total de figuras mitóticas en metafase, por frasco.

Incorporación de ^3H -Timidina. Se agregó 0.1 ml equivalente a 1 μ Ci de ^3H -Timidina por frasco (New England Nuclear Net 027 A, actividad específica de 2.0 Ci/mM), 15 horas antes de la cosecha. Al término del período de incubación, se hizo lo que se mencionó en la cosecha, suprimiendo el choque hipotónico y después de la segunda fijación se desechó el sobrenadante y se agregó TCA (Merck 807), frío y al 7%, hasta 5 ml, dejándose en incubación a 4°C durante 1 hora. Una vez transcurrido este tiempo, se centrifugó a ---

2,000 rpm durante 10 min, se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 5 ml de TCA frío, haciéndose pasar el contenido del tubo a través de un filtro Millipore con poros de $0.65\mu\text{m}$ de diámetro, se agregó igual volumen de TCA y se repitió el procedimiento. El filtro se colocó en un vial de contador agregándosele 0.4 ml de SDS (Sigma) al 2% y se incubó durante 30 min a 60°C . Se le añadieron 10 ml de Bray como líquido de centelleo para poder registrar las partículas β^{-} emitidas por el elemento radiactivo, incorporado al ADN de las células que entraron a fase S, como cpm. El aparato de registro fue un contador de centelleo líquido Packard automático, modelo 2425. Una vez obtenidas las cpm y el porcentaje de eficiencia del contador, con base en el estándar externo, se calculó el número de dpm, con el objeto de conocer la radiactividad real. La fórmula utilizada para el cálculo, fue la siguiente:

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

Conteo de células vivas. Se hizo un conteo en el momento de la siembra y otro después del período de incubación. La técnica consistió en centrifugar el contenido del frasco durante 10 min a 1,000 rpm, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el botón en 5 ml de solución lisadora de eritrocitos, preparada con 4.5 g de cloruro de amonio (Mallin-crodt, 3384) y 1 g de THAM (Sigma), aforado a 500 ml con agua destilada y ajustando el pH a 7.3 con HCl concentrado. Se incubó el tubo durante 5 min a 37°C y se repitió el lavado dos veces más. Finalmente se centrifugó a 1,000 rpm durante 10 min y el botón se resuspendió en solución salina al 0.85% a 37°C , hasta 1 ml, de esta suspensión se tomaron 0.9 ml y se le agregaron 0.1 ml de azul tripan (Sigma 468) al 0.5% en solución salina al 0.85%. Una vez resuspendida esta solución, se llenó una cámara del hemocitómetro y se contaron los linfocitos sin teñir, en los 5 cuadros conven-

cionales. Después se hizo lo mismo en la otra cámara. El número total de células contadas en los 10 cuadros, corresponde al número de células por mm^3 , de tal forma que multiplicado por 1,000, se tiene el número de células por ml.

c) Cultivos con sangre periférica de mujer.

En la primera etapa se realizaron 3 cultivos de sangre periférica por donadora, en los días 5, 14 y 23 de sus correspondientes ciclos menstruales, con un total de cuatro individuos.

Se determinaron esos días, con el objeto de observar el comportamiento de los linfocitos ante la PHA, a partir de una muestra de sangre obtenida en un día cercano al período de ovulación (a mitad del ciclo menstrual, día 14), en donde los niveles de estradiol son los más elevados durante el ciclo y a partir de dos muestras de sangre obtenidas con intervalos de 9 días, antes y después del día 14 -- (días 5 y 23), además de que el día 5 coincide con los mínimos niveles de estradiol y el día 23, con los máximos niveles de progesterona.

Se sembraron 10 frascos por cultivo, distribuyéndose de la siguiente manera:

10 frascos	{	5 fcos. C/PHA	{	3 fcos. para incorporación de ^3H -Timidina.
		y		1 fco. para producción de figuras mitóticas.
		5 fcos. S/PHA		1 fco. para conteo de células vivas.

Todos los frascos se incubaron a 37°C durante 72 horas

d) Cultivos con sangre periférica de varón.

En la segunda etapa de desarrollo del presente tra-

bajo, se hicieron cultivos con sangre periférica de 5 varones en diferentes días. El número de cultivos por donador, fue de 2 en dos personas y 3 en los restantes. Se sembraron 3 frascos con PHA por cultivo, se utilizó solamente el criterio de incorporación de ³H-Timidina.

e) Cultivos con sangre periférica de varón, tratados con estradiol y/o progesterona.

En la tercera y última etapa de este trabajo, se hicieron cultivos con sangre periférica de varón, a los que se les añadió diferentes concentraciones de estradiol y/o progesterona. Se sembró un total de 15 frascos por tratamiento, de los cuales 5 se cosecharon a las 24 horas, 5 a las 72 horas y 5 a las 120 horas de incubación, utilizándose en su interpretación los tres criterios ya mencionados. Todos los frascos contenían PHA.

Los tratamientos fueron seleccionados de la siguiente manera, con el fin de simular los niveles de dichas hormonas, correspondientes a los reportados para los días 5, 14 y 23 del ciclo menstrual.

Hormona	Concentración (ng/ml)
Estradiol	0.00
	0.05
	0.10
	0.25
	0.00
Progesterona	1.57
	3.14
	12.56
Estradiol y progesterona.	0.00/0.00
	0.05/1.57
	0.10/3.14
	0.10/12.56

f) Análisis estadístico.

Para tratar de dar más apoyo y facilitar la interpretación de los datos, se realizaron algunos tratamientos estadísticos basados en el análisis de varianza, desarrollado por Fisher (citado en Sokal, 1969), que permite saber si dos o más medias muestrales, pudieron haberse obtenido de poblaciones con la misma media paramétrica, con respecto a una variable dada, para poder determinar si estas medias difieren una de otra en tal magnitud que se debe suponer, que corresponden a diferentes poblaciones.

Ahora, si se quiere hacer una prueba para ver si el resultado de un tratamiento es significativamente diferente con respecto a otro, se utiliza la distribución de F, tomando en cuenta las varianzas (S^2), para cada variable, mediante la siguiente relación:

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

en donde S_1^2 y S_2^2 tiene n_1 y n_2 grados de libertad y su valor dependerá de las magnitudes relativas entre ellas.

Es necesario hacer una comparación con los valores de F dados en las tablas de Fisher para los diferentes grados de libertad considerados y de esta manera saber si los valores obtenidos son o no significativos. Además al comparar los valores de F de los grupos, se puede determinar que tratamientos tienen mayor efecto (Heath, 1977).

Se hicieron diferentes tratamientos en los análisis de varianza ya que en los cultivos utilizados para determinar incorporación de ^3H -Timidina se hicieron por triplicado y en los utilizados para contar número de células viables y número de figuras mitóticas, no hay tales. Además hay experimentos en los que se incluyen más de dos variables, por ejemplo en los experimentos con sangre periférica de diferentes donadoras que abarca muestras de varios días del ciclo

menstrual, con y sin PHA.

Se hicieron además, ajustes de rectas por el método de mínimos cuadrados, anotándose la correspondiente ecuación, el coeficiente de correlación y el valor de ji-cuadrada para cada ajuste.

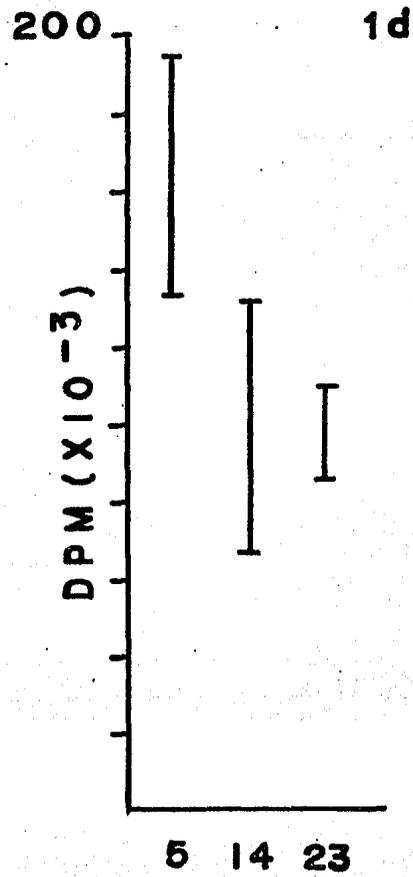
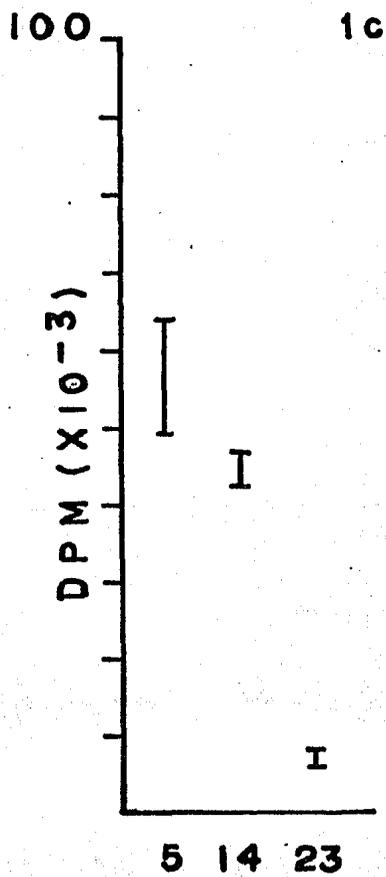
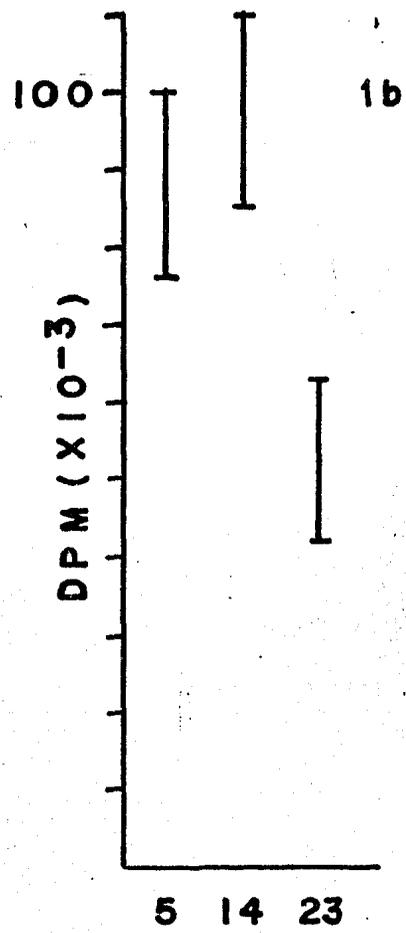
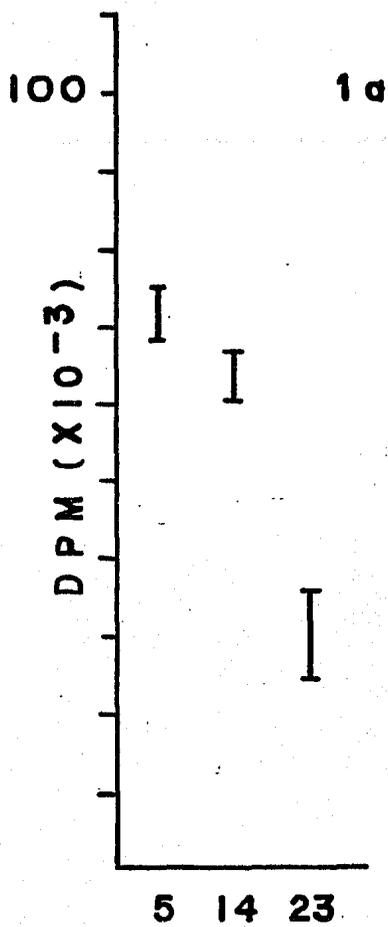
III. RESULTADOS Y DISCUSION.

Los resultados obtenidos a partir de los cultivos sin PHA, de sangre periférica de las cuatro donadoras, en cuanto a incorporación de ^3H -Timidina, representaron menos del 1%, con relación a la incorporación total del precursor radiactivo, al compararlos con los de los cultivos con mitógeno, lo que equivale solamente a la radiactividad de fondo. En cuanto al número de figuras mitóticas, no se observó ninguna en los cultivos control.

Los datos obtenidos a partir de los cultivos con PHA, con base en el criterio de incorporación de ^3H -Timidina, se presentan en la figura 1. En cuanto al análisis de estos, se observa un mismo comportamiento en tres de las cuatro donadoras, es decir un máximo de incorporación del precursor radiactivo, en el día 5 del ciclo menstrual, un valor intermedio para el día 14 y un mínimo a finales del ciclo. En el caso de la donadora 1b, los valores de DPM para los días 5 y 14, tomando en cuenta sus correspondientes errores típicos, caen dentro del mismo rango, de tal manera que pueden considerarse sin diferencias significativas.

Muy probablemente debido a la experiencia inmunológica de cada donadora, que puede traducirse en una capacidad diferente de respuesta al mitógeno en cultivo, los valores de DPM obtenidos para el mismo día, son muy variables, por lo que se decidió expresarlos como porcentajes, considerando como 100% el promedio de DPM por día para los cuatro individuos y de esta manera observar más claramente las diferencias en síntesis de ADN por individuo y las semejanzas por día en diferentes donadoras. En la tabla 1 y figura 2, se nota muy claramente como disminuye la proporción de células susceptibles a ser estimuladas y entrar a fase S, conforme transcurre el ciclo menstrual. El coeficiente de correlación es de -0.97 y la ecuación de la recta correspondiente es $y = -4.3x + 160.7$.

Figura 1. Incorporación de ^3H -Timidina por los linfocitos - de sangre periférica de cuatro donadoras: 1a, 1b, 1c y 1d - respectivamente, en los días 5, 14 y 23 de sus correspon---dientes ciclos menstruales.



DIA DEL CICLO MENSTRUAL

Tabla 1. Porcentaje de incorporación de ^3H -Timidina de DPM, obtenido a partir de los cultivos con sangre periférica de cuatro donadoras, en diferentes días del ciclo menstrual y a los que se les aplicó un análisis de varianza de dos variables por triplicado.

Factor B	Factor A				X ± Es
	1a	1b	1c	1d	
5	142.1	126.6	191.6	186.3	133.3 ± 9.4
	127.3	80.7	123.2	114.4	
	121.1	125.1	154.2	107.4	
14	123.8	113.7	113.7	142.7	111.4 ± 9.7
	118.3	101.4	128.0	48.9	
	103.3	153.9	131.5	142.7	
23	69.7	47.9	14.6	94.7	55.3 ± 13.2
	35.7	91.4	20.9	61.9	
	58.7	59.3	22.4	86.5	

Análisis de varianza:

Fuente de variación	G.L.	S.C.	M.C.
Subgrupos	11	51666.3	4696.9
A	3	0	0
B	2	38894.2	19447.1
A X B	6	12772.1	2128.7
Dentro de los subgpos.	24	17288.5	720.4
Total	35	68954.8	

$$F, A = 0$$

$$F_t 0.05(3,24) = 3.01$$

$$F, B = 26.99^*$$

$$F_t 0.05(2,24) = 3.4$$

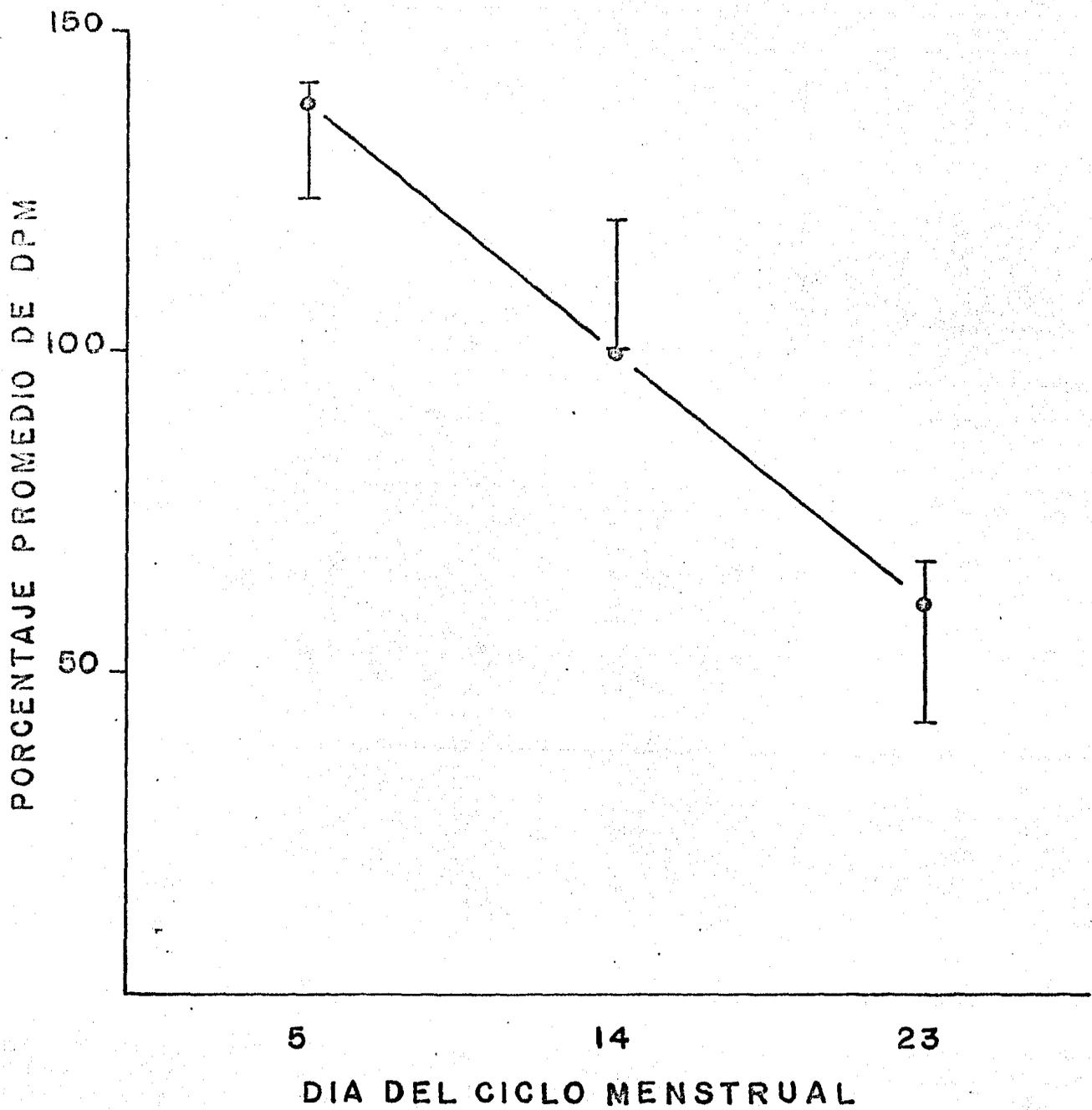
$$F, (A X B) = 2.9^*$$

$$F_t 0.05(6,24) = 2.5$$

Factor A = individuos

Factor B = días del ciclo menstrual

Figura 2. Promedio del porcentaje de incorporación de $^3\text{H-Ti}$ midina por los linfocitos, considerando los valores de las cuatro donadoras en diferentes días del ciclo menstrual. La ecuación de la recta es $y = -4.3x + 160.7$ y el coeficiente de correlación es $r = -0.97$.



Con los resultados obtenidos en cuanto al criterio de número de figuras mitóticas, que se muestran en la tabla 2 y en la figura 3, es evidente la disminución en el número de estas conforme avanza el ciclo y el análisis estadístico muestra que es significativo ($F = 42.2$, $p = 0.05$), con respecto al tiempo, contrario a lo que se observa con relación a las diferencias entre individuos, pues este valor no es significativo ($F = 4.2$, $p = 0.05$).

Con el conteo de células vivas, se registraron varios resultados interesantes. Es necesario aclarar que los valores presentados en la tabla 3 corresponden al porcentaje de células vivas, obtenidos al considerar el número de células sembradas como el 100% y con respecto a este, la diferencia con el número de células registradas después del período de incubación.. En esta parte si estan incluidos los valores encontrados en los tratamientos sin PHA, pues resulta importante observar cómo en los cultivos sin mitógeno, hay un número mayor de células después de 72 horas de incubación, con respecto al número de células sembradas en los días 5 y en dos de los casos en los días 14 y 23 del ciclo, aunque siempre los valores están por debajo de los de los cultivos expuestos a la PHA. Sin embargo se nota cómo la capacidad de crecimiento de la población, disminuye conforme avanza el ciclo menstrual, llegando a ser menor que el número sembrado.

Se puede preguntar porqué si hay un incremento en el número de células, no hay incorporación de ^3H -Timidina en los cultivos sin PHA. Es importante señalar que el inicio de la síntesis de ADN en un linfocito, depende de factores tales como la intensidad de la señal que reciba, que a su vez depende de la naturaleza y el número de moléculas del mitógeno, unidas a sus receptores de superficie.

En el caso de la PHA, la máxima síntesis de ADN en cultivos de linfocitos corresponde a las 72 horas después de añadir el mitógeno (Sören, 1973), aunque ya a las 48 horas hay una considerable proporción de células que han iniciado

Tabla 2. Número de figuras mitóticas obtenido a partir de los cultivos de linfocitos con sangre periférica de mujer, en diferentes días del ciclo menstrual. A los resultados se les aplicó un análisis de varianza de dos variables sin réplicas.

Factor B	Factor A				X ± Es
	1a	1b	1c	1d	
5	544	380	272	385	395.3 ± 56.0
14	329	251	215	349	286.0 ± 31.7
23	88	54	32	69	60.8 ± 11.8

Análisis de varianza:

Fuente de variación	G.L.	S.C.	M.C
A	3	34887.0	11629.0
B	2	232751.2	116375.6
Error	6	16534.8	2755.8

$$F, A = 4.2$$

$$F_t 0.05(3,6) = 6.6$$

$$F, B = 42.4^*$$

$$F_t 0.05(2,6) = 7.26$$

Factor A = individuos

Factor B = días del ciclo menstrual.

Figura 3. Promedio del número de figuras mitóticas obtenidas de los cultivos de cuatro donadoras, en los días 5, 14 y 23 de sus correspondientes ciclos menstruales. La ecuación de la recta es $y = -18.6x + 507.5$ y el coeficiente de correlación es $r = -0.98$.

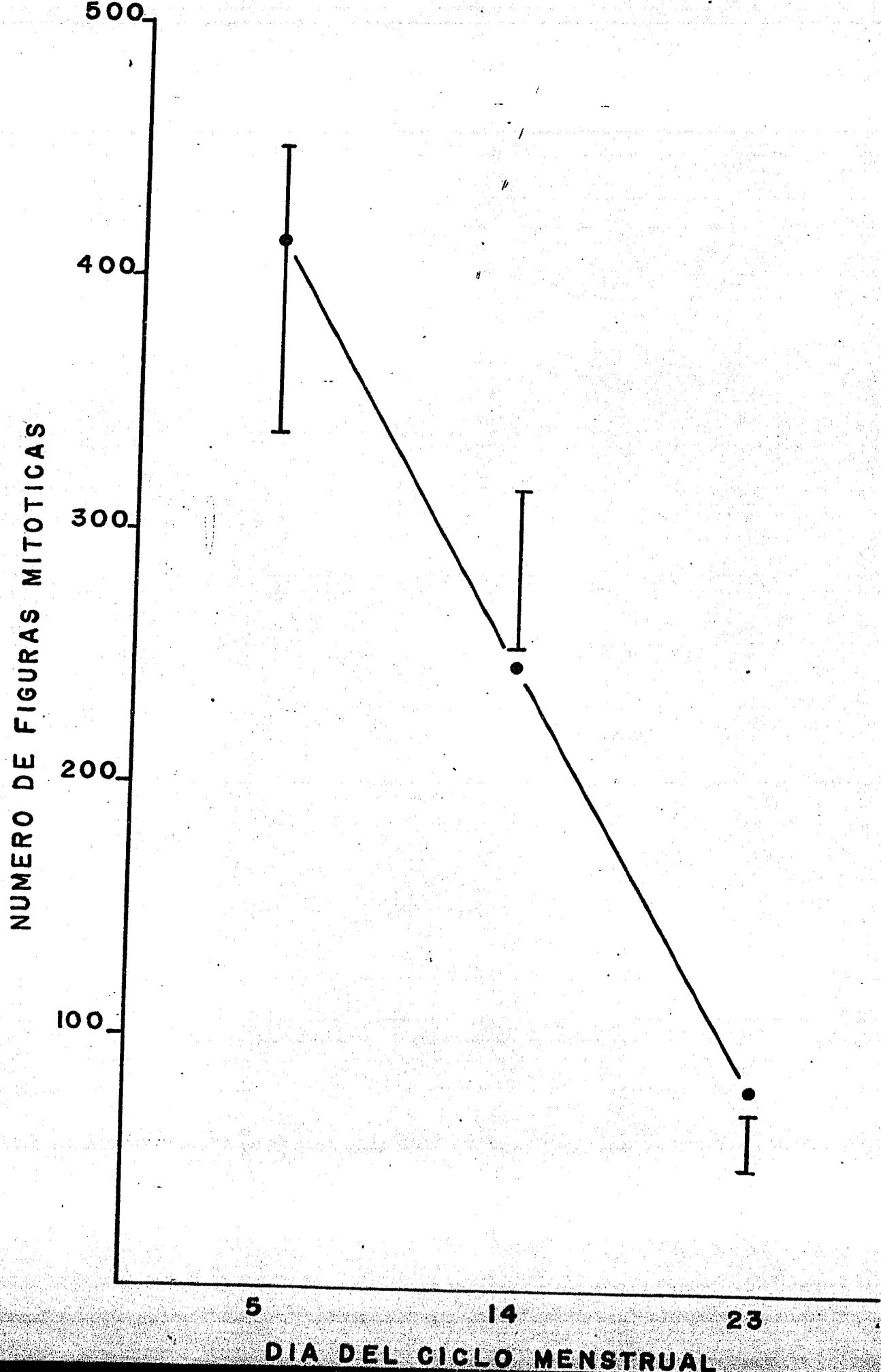


Tabla 3. Porcentaje de células vivas, a partir de los cultivos de linfocitos con sangre periférica de mujer, en diferentes días del ciclo menstrual, con y sin PHA, en donde se aplicó un análisis de varianza de tres variables sin réplicas.

	Factor B			
	5	14	23	
C/PHA	143.7	140.7	97.7	Factor A
	196.2	196.9	76.0	
	293.6	192.4	109.0	
	142.9	98.4	116.1	
	194.1 ± 35.4	157.1 ± 23.4	99.7 ± 8.8	
S/PHA	110.5	90.9	94.4	Factor A
	197.1	147.9	68.3	
	269.7	153.5	113.0	
	103.9	78.2	113.6	
	170.3 ± 39.4	117.6 ± 19.3	97.3 ± 10.7	

Análisis de varianza:

Fuente de variación	G.L.	S.C.	M.C.
A X B	6	21541.2	3590.2
A X C	3	97.6	32.5
B X C	2	1387.4	840.0
A X B X C	6	686.7	114.5

$$F, A X B = 31.4^*$$

$$F_t 0.05(6,6) = 5.8$$

$$F, A X C < 1$$

$$F_t 0.05(3,6) = 6.6$$

$$F, B X C = 7.3^*$$

$$F_t 0.05(2,6) = 7.2$$

Factor A = individuos

Factor B = días del ciclo menstrual

Factor C = tratamientos

dicha síntesis (Aguilar- Santamaría, 1977).

Es probable que la gran mayoría de proteínas que contiene el suero, sean señales suficientes para desencadenar la respuesta de algunas poblaciones de linfocitos (Bonilla-Núñez, 1970) y sea la proliferación de estas, la causa del incremento observado en el número de células. Probablemente la mayoría de las células estimuladas de esta manera, han terminado la fase S y se encuentran en la fase G₂ o principios de la M, al momento de añadir el precursor radiactivo y es por eso que no se detecta incorporación.

Los resultados con el análisis de varianza, muestran que no hay diferencias significativas cuando se compara el porcentaje de células vivas entre individuos por tratamiento, lo que equivale a decir que los linfocitos de las cuatro donadoras responden de manera muy similar bajo las mismas condiciones de cultivo ($F < 1$; $p = 0.05$). En cambio si hay diferencias significativas cuando se compara el número de células vivas entre diferentes días del ciclo y además juega un papel importante el tratamiento ($F = 7.3$, $p = 0.05$)

En la figura 4, se muestra el comportamiento de los linfocitos, en cuanto al número de células vivas, con los resultados de las cuatro donadoras y se nota como disminuye la población conforme transcurre el ciclo menstrual, obteniéndose valores más altos por día en los cultivos con PHA, ya que aquí se supone que se está sumando el efecto de este mitógeno, con el probable efecto antigénico de otros factores presentes en el medio, que producen los valores de la recta sin PHA.

De los datos obtenidos con los varones (tabla 4 y figura 5), las cifras de DPM resultantes de los promedios para cada individuo, son muy diferentes, por lo tanto, al igual que lo que se hizo con los resultados de los cultivos de las donadoras, se consideró este promedio como 100% y se obtuvo el porcentaje correspondiente para cada cultivo (figura 6). No se obtuvo un promedio por día considerando los datos a partir de los cinco donadores, porque no correspon-

Figura 4. Porcentaje promedio del número de células vivas a partir de los cultivos de cuatro donadoras, en los días 5, 14 y 23 del ciclo menstrual, C/PHA (●) y S/PHA (▲). Las ecuaciones de las rectas y sus coeficientes de correlación son:
C/PHA $y = -5.2x + 223.7$, $r = -0.99$; S/PHA $y = -4.1x + 185.2$
 $r = -0.97$.

PORCENTAJE DE CELULAS VIVAS

200

150

100

50

5

14

23

DIA DEL CICLO MENSTRUAL

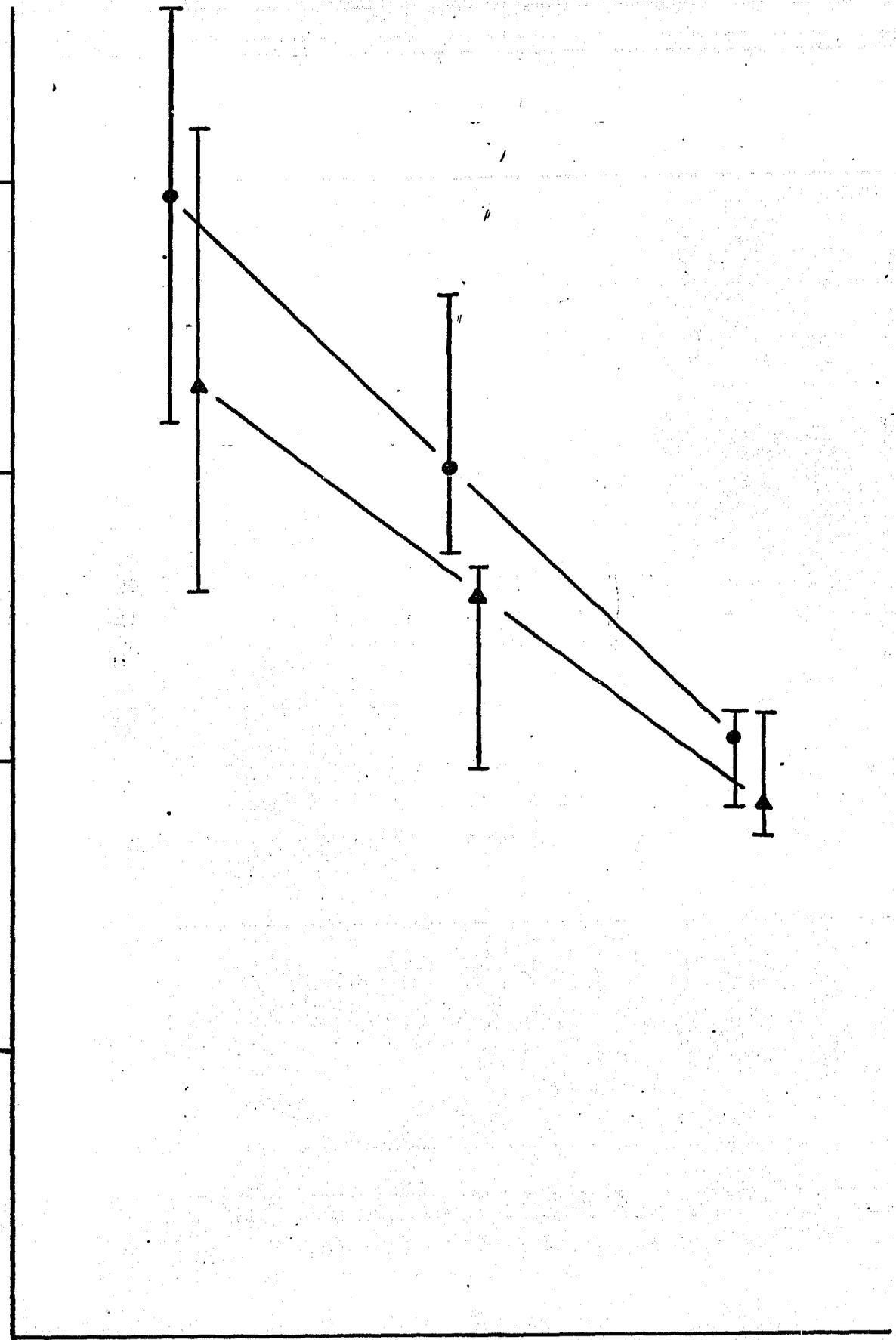
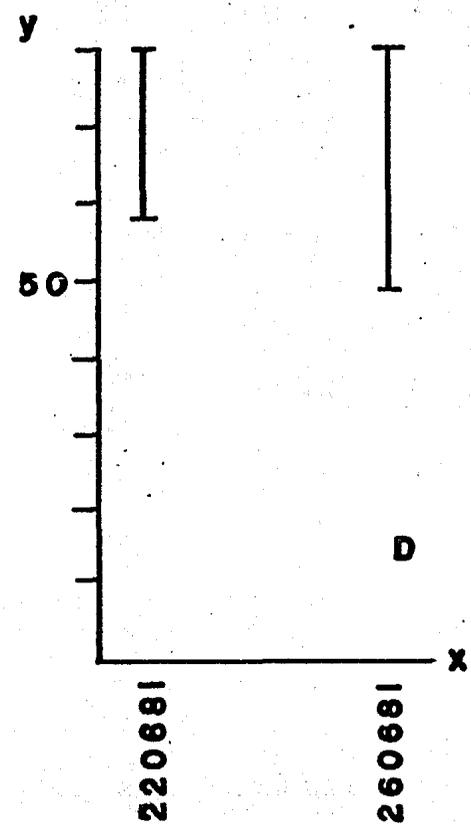
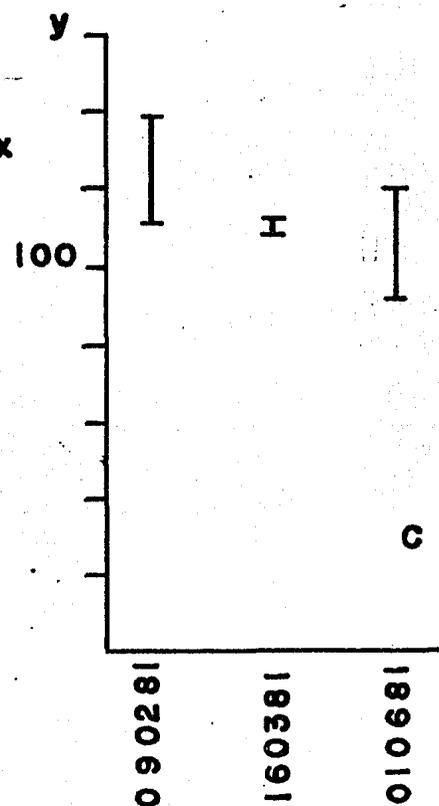
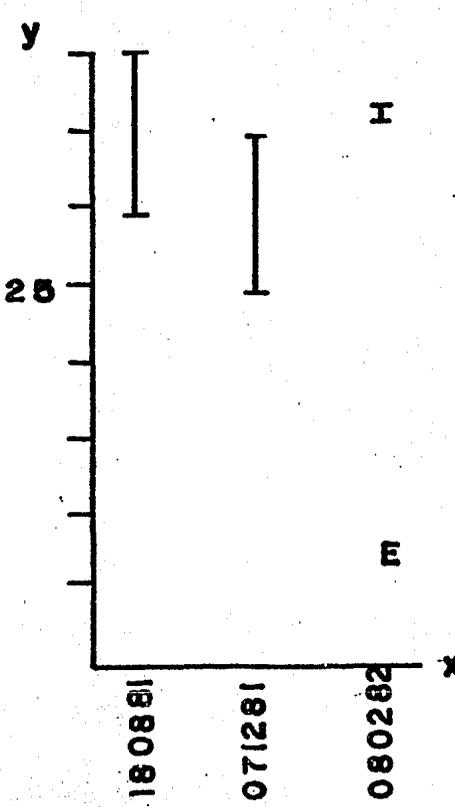
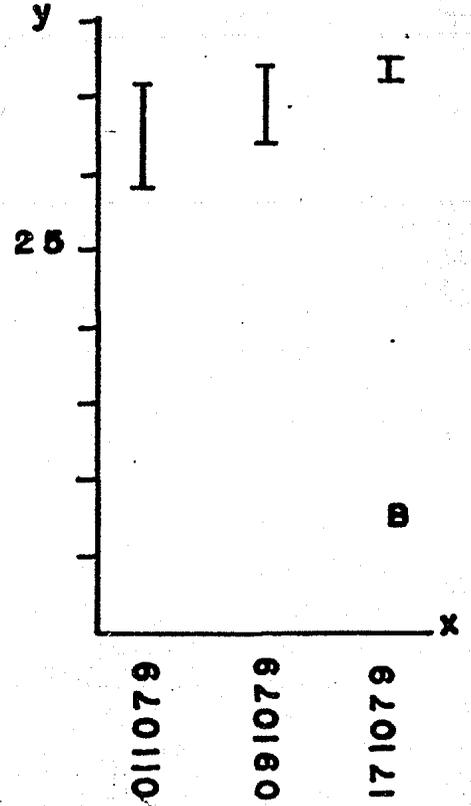
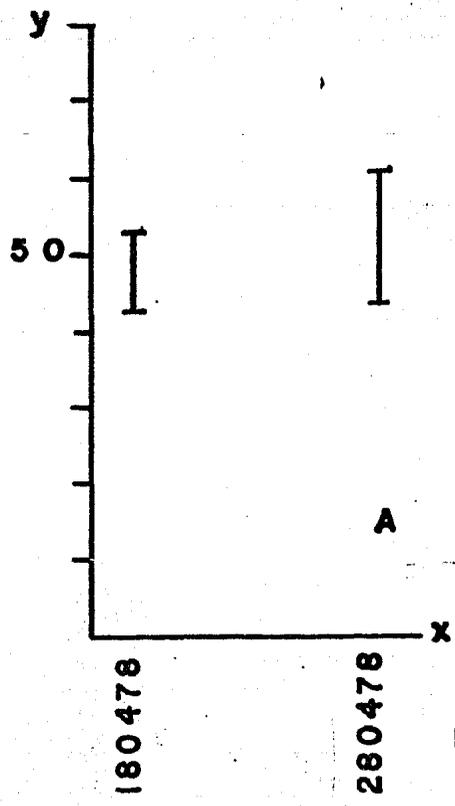


Tabla 4. Incorporación de ^3H -Timidina por los linfocitos estimulados con PHA, a partir de sangre periférica de cinco donadores.

Donador	Día en que se to mo la muestra.	DPM \bar{X} \pm Et/cultivo	DPM \bar{X} \pm Et/culti vos realizados	%
A	190478	49548.6 \pm 4244.9	50988.0 \pm 1439.4	97.2
	280478	52427.4 \pm 8839.1		102.8
B	011079	31396.4 \pm 2605.3	34222.9 \pm 1518.1	91.7
	091079	34676.0 \pm 4314.2		101.3
	171079	36596.3 \pm 879.3		106.9
C	090281	125103.3 \pm 14067.7	113689.1 \pm 5747.0	110.0
	160381	109153.3 \pm 2700.2		96.0
	010681	106810.8 \pm 14302.8		94.0
D	220681	69471.7 \pm 11097.4	67178.3 \pm 2293.4	103.4
	260681	64884.8 \pm 15129.9		96.6
E	180881	34984.8 \pm 5713.9	33542.7 \pm 1936.5	105.2
	071281	29709.6 \pm 4901.7		89.3
	080282	35934.6 \pm 651.9		105.6

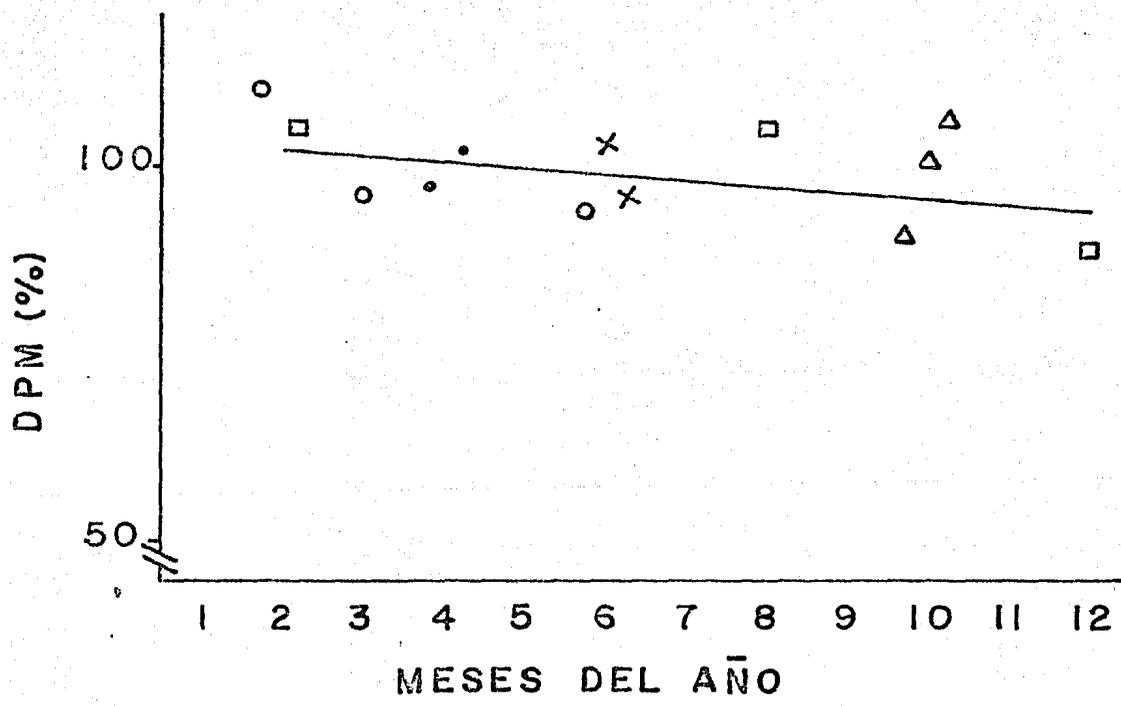
Donador	Día en que se tomó la muestra.	DPM $\bar{X} \pm Et/cultivo$	DPM $\bar{X} \pm Et/cultivos$ realizados	%
A	190478	49548.6 \pm 4244.9	50988.0 \pm 1439.4	97.2
	280478	52427.4 \pm 8839.1		102.8
B	011079	31396.4 \pm 2605.3	34222.9 \pm 1518.1	91.7
	091079	34676.0 \pm 4314.2		101.3
	171079	36596.3 \pm 879.3		106.9
C	090281	125103.3 \pm 14067.7	113689.1 \pm 5747.0	110.0
	160381	109153.3 \pm 2700.2		96.0
	010681	106810.8 \pm 14302.8		94.0
D	220681	69471.7 \pm 11097.4	67178.3 \pm 2293.4	103.4
	260681	64884.8 \pm 15129.9		96.6
E	180881	34984.8 \pm 5713.9	33542.7 \pm 1936.5	105.2
	071281	29709.6 \pm 4901.7		89.3
	080282	35934.6 \pm 651.9		105.6

A. Figura 5. Incorporación de ^3H -Timidina en DPM \pm Et, a partir de los cultivos con sangre periférica de cinco varones, en diferentes fechas.



x = DIA EN QUE SE TOMO LA MUESTRA
 y = DPM (X10⁻³)

Figura 6. Porcentaje de incorporación de ^3H -Timidina a partir de los cultivos con sangre periférica de 5 donadores:-- A (\bullet), B (Δ), C (\circ), D (\times) y E (\square): La ecuación de la recta es $y = 1.3x + 104.7$ y el coeficiente de correlación es $r = -0.67$.



den los días en que se tomaron las muestras de sangre de los diferentes individuos, sin embargo no parece necesario ya -- que hay diferencias mínimas entre los cultivos por donador, con lo que se muestra prácticamente que no hay diferencias - en estimulación de los linfocitos en los varones, con la PHA; respecto al tiempo considerado, lo cual se hace muy evidente en la figura en donde se muestra el porcentaje de DPM por -- cultivo, durante los diferentes meses del año y en donde la recta trazada que corresponde al promedio mensual, es casi - paralela con respecto al eje de las x, es decir con una pendiente cercana a cero y un valor de correlación de -0.67, en comparación al valor de la pendiente de -4.3 obtenida en la gráfica de las mujeres y con un índice de correlación de --- de -0.97.

Este hecho era de esperarse al no haber en los varones cambios tan marcados en los niveles de las hormonas esteroi- des circulantes tales como la testosterona y dihidrotestoste rona, de tal forma que los linfocitos cultivados en cual---- quier tiempo, son capaces de responder a la PHA.

Sin embargo Dionigi et al (1973), presentan algunas evi- dencias que se contraponen a esto. Basándose en observacio-- nes de transformación blastogénica así como incorporación de ³H-Timidina por linfocitos de individuos sanos, estimulados con PHA, encuentran que la respuesta no es constante y que - hay una disminución de esta a intervalos periódicos que va-- rían entre 5 y 35 días aunque no da una explicación sobre -- las posibles causas y sólo sugieren que los niveles hormona- les pueden tener alguna relación, pero sin mencionar algu-- nas hormonas como responsables.

De nuestros datos con 5 varones, no encontramos tales - diferencias ni entre días, ni entre meses, sino que las res- puestas permanecen casi constantes.

Con los resultados mostrados hasta el momento, parece e- vidente la influencia de los niveles hormonales durante el - ciclo menstrual, sobre la estimulación de linfocitos de mu-- jer cultivados, pues los tres parámetros utilizados producen

diferencias significativas entre los días del ciclo mens---
trual considerados, cosa que en los cultivos con sangre peri
férica de varón no se presenta.

Con el fin de evaluar si efectivamente el nivel hormo--
nal es responsable del comportamiento observado en los culti
vos con sangre periférica de mujer, se hicieron cultivos con
sangre periférica de varón a los que se les suministraron di
ferentes concentraciones de estradiol y/o progesterona.

Los resultados obtenidos a partir de los cultivos a los
que se les agregó estradiol, en cuanto a incorporación de --
³H-Timidina, se presentan en la tabla 5 y figura 7.

La diferencia significativa es con relación al tiempo -
de incubación. A las 24 horas, las células prácticamente no
incorporan el precursor radiactivo, en ninguna de las dosis
ni en el control, a diferencia de lo encontrado a las 72 ho
ras de incubación, teniendo un máximo en la síntesis de ADN,
en los cultivos testigo y un aumento en DPM conforme se ele
van los niveles de estradiol, pero sin sobrepasar los valo--
res de los primeros. El análisis de varianza muestra que las
diferencias son debidas al azar y no a las concentraciones -
de estradiol. A las 120 horas de incubación, los valores de
DPM alcanzan un nivel muy parecido en todos los tratamientos
y la proporción de linfocitos estimulados en el cultivo tes
tigo, es prácticamente la misma que la de las 72 horas, pero
la población de linfocitos tratados con diferentes concentra
ciones de estradiol, que son capaces de responder a la PHA,
aumenta al comparar estos mismos tiempos. Parecería que a --
las 72 horas hay un desfaseamiento en la respuesta de los lin
focitos al estar en presencia de la hormona, pero que des---
pués de haber transcurrido 24 horas, la población se "recupe
ra".

De aquí se puede decir que el estradiol en todas las do
sis probadas, tiene una mínima influencia sobre la capacidad
de respuesta de los linfocitos a la PHA, al compararse con -
los cultivos testigo, sin embargo es necesario hacer la acla

Tabla 5. Incorporación de ^3H -Timidina en DPM, obtenida a partir de los cultivos de linfocitos con sangre periférica de varón, sometidos a diferentes concentraciones de estradiol, con diversos tiempos de incubación, aplicando análisis de varianza de dos variables por triplicado.

Factor B	Factor A		
	24	72	120
Testigos	802.6	23259.5	40816.8
	730.0	26538.9	33572.1
	668.4	39327.4	20101.0
	733.7 ± 38.8	29708.6 ± 4901.7	31496.7 ± 6069.5
0.05	889.4	17848.3	32225.4
	689.5	10506.3	31926.2
	609.8	22201.1	30471.8
	729.6 ± 83.2	16851.8 ± 3412.5	31541.1 ± 541.6
0.10	487.6	21316.5	36603.3
	502.6	24226.3	36967.6
	633.7	17197.3	24453.7
	541.3 ± 46.4	20913.4 ± 2040.4	32675.9 ± 4112.4
0.25	816.8	31395.6	37573.7
	749.7	22960.5	43894.6
	753.9	18475.8	23132.6
	773.5 ± 21.7	24277.3 ± 3587.3	34867.0 ± 6144.4

Análisis de varianza:

Fuente de variación	G.L.	S.C.	M.C.
Subgrupos	11	6.7 X 10 ⁹	8.0 X 10 ⁷
A	2	6.4 X 10 ⁹	3.2 X 10 ⁹
B	3	1.0 X 10 ⁸	3.3 X 10 ⁷
A X B	6	1.8 X 10 ⁸	3.0 X 10 ⁷
Dentro de los subgpos.	24	8.8 X 10 ⁸	3.6 X 10 ⁷

$$F, A = 89.4^*$$

$$F_t 0.05(2,24) = 3.4$$

$$F, B < 1$$

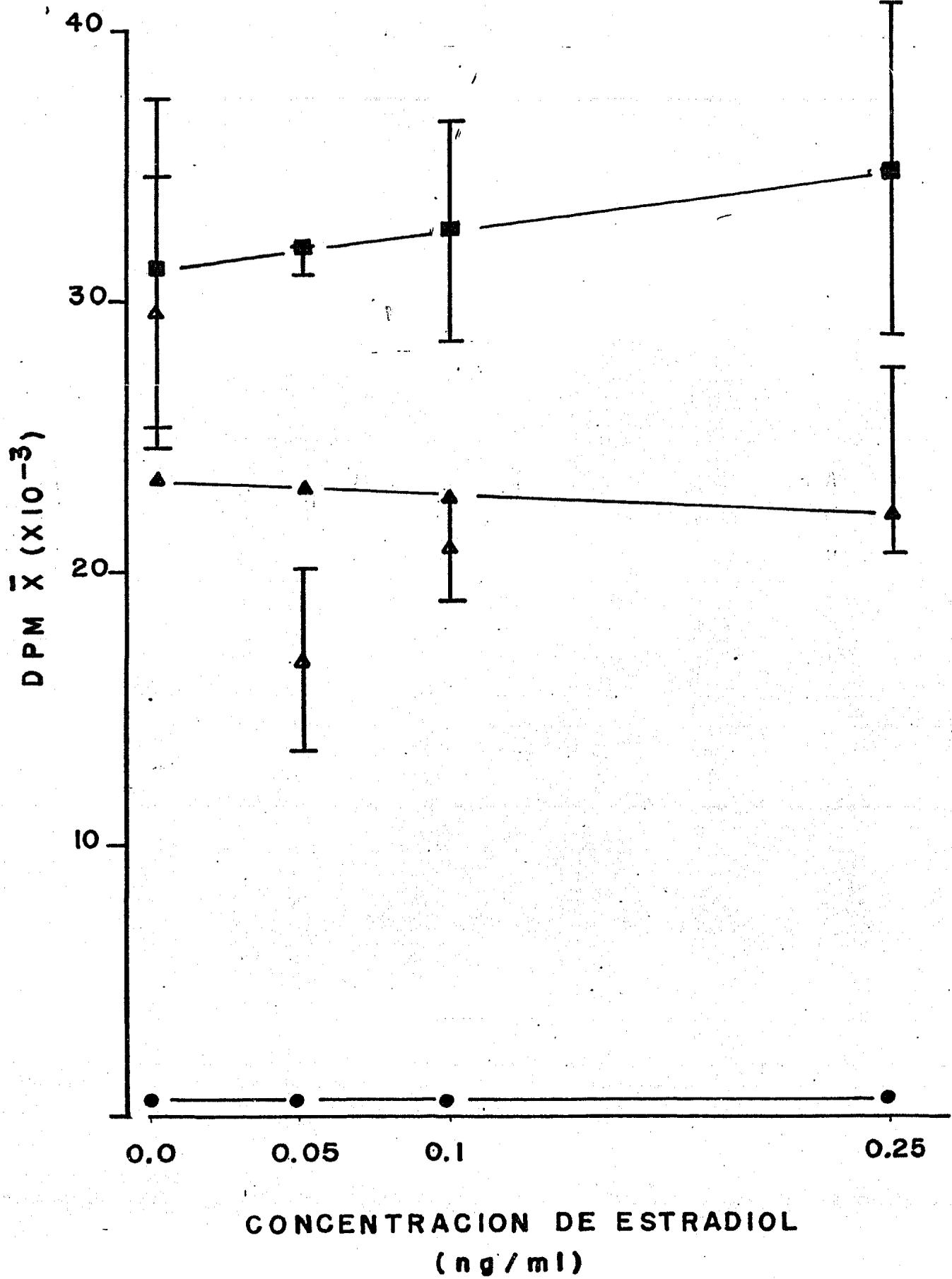
$$F_t 0.05(3,24) = 3.0$$

$$F, A X B < 1$$

$$F_t 0.05(6,24) = 2.5$$

Factor A = horas de incubación, Factor B = estradiol (ng/ml).

Figura 7. Incorporación de ^3H -Timidina en DPM, a partir de los cultivos con sangre periférica de varón, sometidos a varias concentraciones de estradiol, a diferentes tiempos de incubación. Las ecuaciones de las rectas y los correspondientes coeficientes de correlación son : 72 horas de incubación (\blacktriangle), $y = 4910x + 23428.8$, $r = -0.09$; 120 horas de incubación (\blacksquare), $y = 14380.7 + 31207.1$, $r = 0.98$.



ración que en los cultivos con 72 horas de incubación, parecería haber cierta influencia, que el análisis de varianza muestra como no significativa, pero se considera necesaria la realización de otras repeticiones para confirmar los resultados.

Analizando los resultados en cuanto al conteo de células vivas, expresados en porcentajes, se nota que van de acuerdo con los datos de incorporación del precursor radiactivo, pues nuevamente el factor significativo es el de las horas de incubación, en donde si hay diferencias importantes y las concentraciones de estradiol no tienen efecto sobre el número de células vivas (tabla 6 y figura 8).

En el caso de los cultivos con progesterona (tabla 7), las 24 horas de incubación, casi no hay células que estén sintetizando ADN y por lo tanto la incorporación de ^3H -Timidina es mínima, en todos los tratamientos. A las 72 horas de incubación, ya se nota una gran influencia de la hormona sobre los linfocitos, pues mientras que los cultivos testigo incorporan en promedio 53,439.9 DPM, en los cultivos tratados con progesterona, se observa que aún la dosis más pequeña, es un factor suficiente para reducir la población celular capaz de ser estimulada por el mitógeno (34,087.8 DPM), esta disminución se relaciona con el aumento en la concentración de progesterona. Dicha relación es logarítmica y tiene el mismo efecto a la 72 y 120 horas de incubación, sólo que en cuanto a las rectas ajustadas en la figura 9, se observa una pendiente más pronunciada a las 72 horas de incubación, lo que significaría que al estar sometidas las células a las diferentes concentraciones de progesterona durante tiempos más largos, es menor la población capaz de responder a la PHA y por lo tanto de entrar a fase S.

La acción de la progesterona parece ser muy evidente a partir de los resultados obtenidos en cuanto al número de células vivas (tabla 8 y figura 10), y además en poco tiempo de exposición, pues a las 24 horas se nota como disminuye la población en los cultivos tratados con las concentraciones -

Tabla 6. Porcentaje de células vivas a partir de los cultivos con sangre periférica de varón, sometidos a diferentes concentraciones de estradiol, a varias horas de incubación, aplicando a los resultados análisis de varianza de dos variables sin réplicas.

Factor B	Factor A		
	24	72	120
Testigo	101.0	135.6	104.4
0.05	96.8	139.0	125.7
0.10	102.3	118.2	121.6
0.25	100.5	134.3	114.0

Análisis de varianza:

Fuente de variación	G.L.	S.C.	M.C
A	2	2000.8	1000.4
B	3	88.7	29.6
Error	6	448.8	74.8

$$F, A = 13.4^*$$

$$F_t 0.05(2,6) = 7.2$$

$$F, B < 1$$

$$F_t 0.05(3,6) = 6.6$$

Factor A= horas de incubación

Factor B= concentración de estradiol (ng/ml).

Figura 8. Porcentaje del número de células vivas, a partir de los cultivos con sangre periférica de varón, sometidos a varias concentraciones de estradiol y diferentes horas de incubación : 24 horas (●). Las ecuaciones de las rectas y los coeficientes de correlación correspondientes son: 72 horas (▲), $y = 10.5x + 132.8$, $r = 0.12$; 120 horas (■), $y = -10.5x + 115.4$, $r = 0.12$.

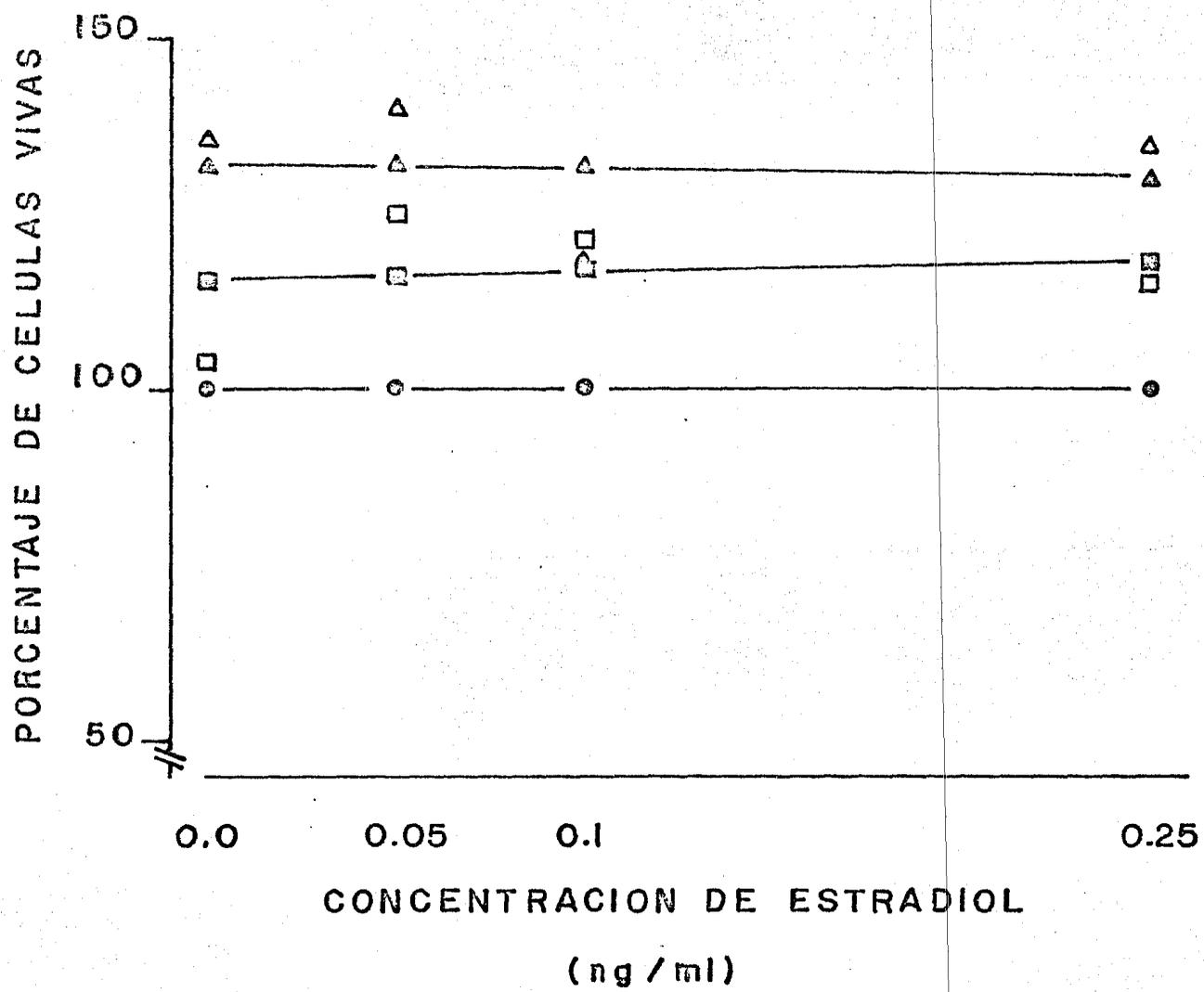


Tabla 7. Incorporación de ^3H -Timidina en DPM, obtenida a partir de los cultivos de linfocitos con sangre periférica de varón, sometidos a diferentes concentraciones de progesterona, con diversos tiempos de incubación, aplicando análisis de varianza de dos variables, por triplicado.

	Factor B	Factor A	
	24	72	120
	891.2	63186.8	18196.0
Testigo	1130.6	48408.2	39012.1
	1190.5	48724.6	34130.2
	1037.4 ± 74.0	53439.9 ± 3874.3	30445.4 ± 6284.6
	1023.7	32695.2	52438.3
1.57	1003.7	29824.2	52438.3
	1056.2	39744.3	47984.6
	1027.9 ± 15.3	34087.8 ± 2947.1	47820.4 ± 2714.7
	1065.6	32264.2	45920.3
3.14	1005.6	30955.6	32865.4
	1165.0	19907.0	44681.3
	1078.7 ± 46.5	27708.9 ± 3919.2	41155.6 ± 4160.5
	1213.9	9787.2	1816.6
12.56	891.2	10371.6	2557.4
	986.6	10807.5	3043.2
	1030.6 ± 95.7	10322.1 ± 295.6	2472.3 ± 356.6

Análisis de varianza:

Fuente de variación	G.L.	S.C.	M.C.
Subgrupos	11	1.4 X 10 ¹⁰	1.2 X 10 ⁹
A	2	7.0 X 10 ⁹	5.5 X 10 ⁹
B	3	3.4 X 10 ⁹	1.1 X 10 ⁹
A X B	6	3.2 X 10 ⁹	5.3 X 10 ⁸
Dentro de los subgpos.	24	7.0 X 10 ⁸	2.9 X 10 ⁷

$$F, A = 120.0^*$$

$$F_t 0.05(2,24) = 3.4$$

$$F, B = 38.8^*$$

$$F_t 0.05(3,24) = 3.0$$

$$F, A X B = 18.2^*$$

$$F_t 0.05(6,24) = 2.5$$

Factor A= horas de incubación.

Factor B = concentración de progesterona (ng/ml).

Figura 9. Incorporación de ^3H -Timidina en DPM, a partir de los cultivos con sangre periférica de varón, sometidos a varias concentraciones de progesterona, a diferentes horas de incubación : 24 horas (\bullet). Las ecuaciones de las rectas y los coeficientes de correlación correspondientes son: 72 horas (\blacktriangle), $y = 10.85x^{-0.6}$, $r = -0.99$; 120 horas (\blacksquare), $y = 10.96x^{-1.09}$, $r = -0.86$.

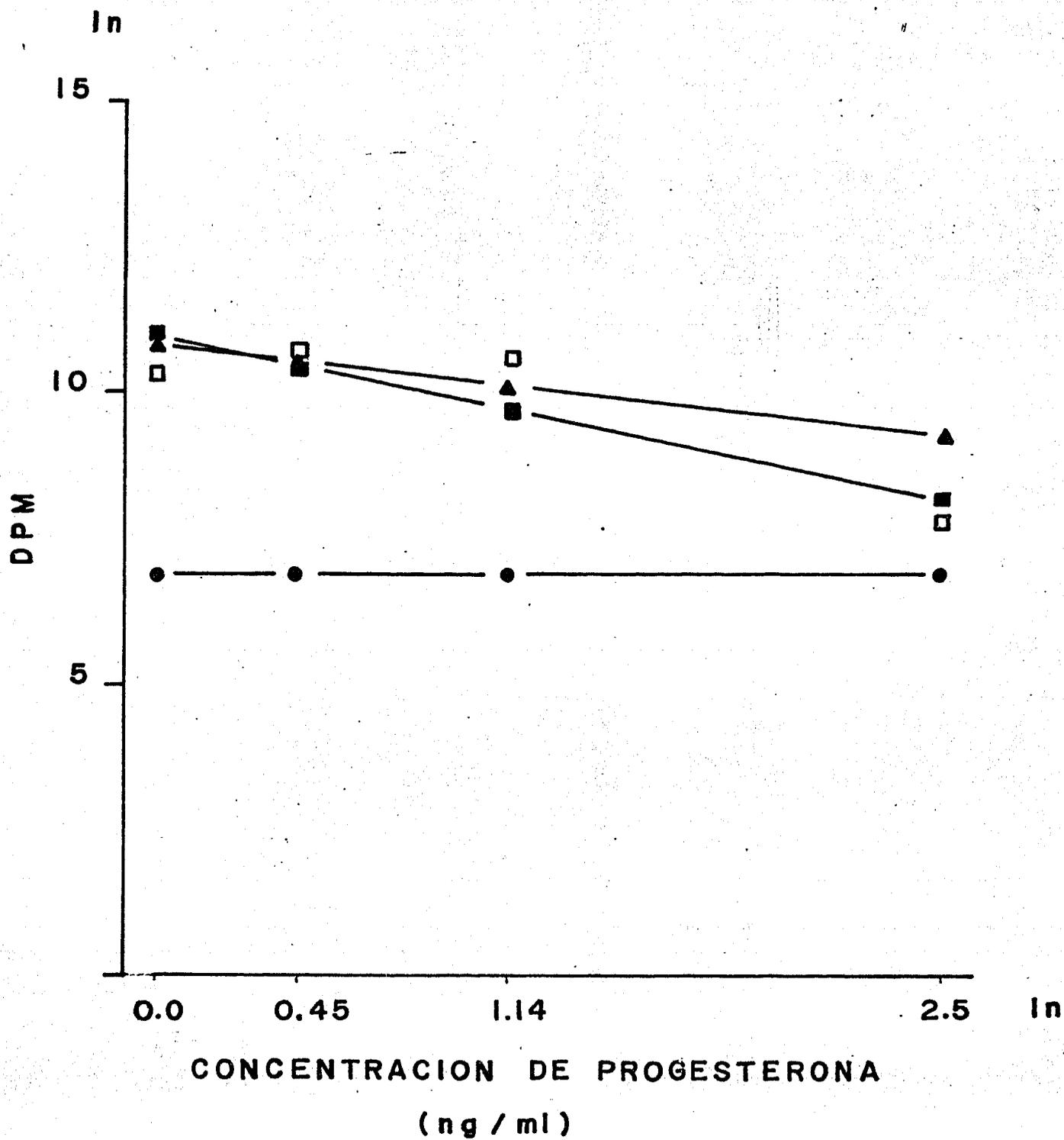


Tabla 8. Porcentaje del número de células vivas a partir de los cultivos con sangre periférica de varón, sometidos a varias concentraciones de progesterona, a diferentes horas de incubación, aplicando análisis de varianza de dos variables sin réplicas.

	Factor B		Factor A	
	24	72	120	
Testigo	109.2	125.2	96.5	
1.57	104.0	83.3	82.5	
3.14	86.2	85.8	90.2	
12.56	59.3	80.2	70.4	

Análisis de varianza:

Fuente de variación	G.L.	S.C.	M.C.
A	2	152.7	76.4
B	3	2456.3	898.8
Error	6	788.6	131.4

F, A < 1

$$F_{t 0.05(2,6)} = 7.26$$

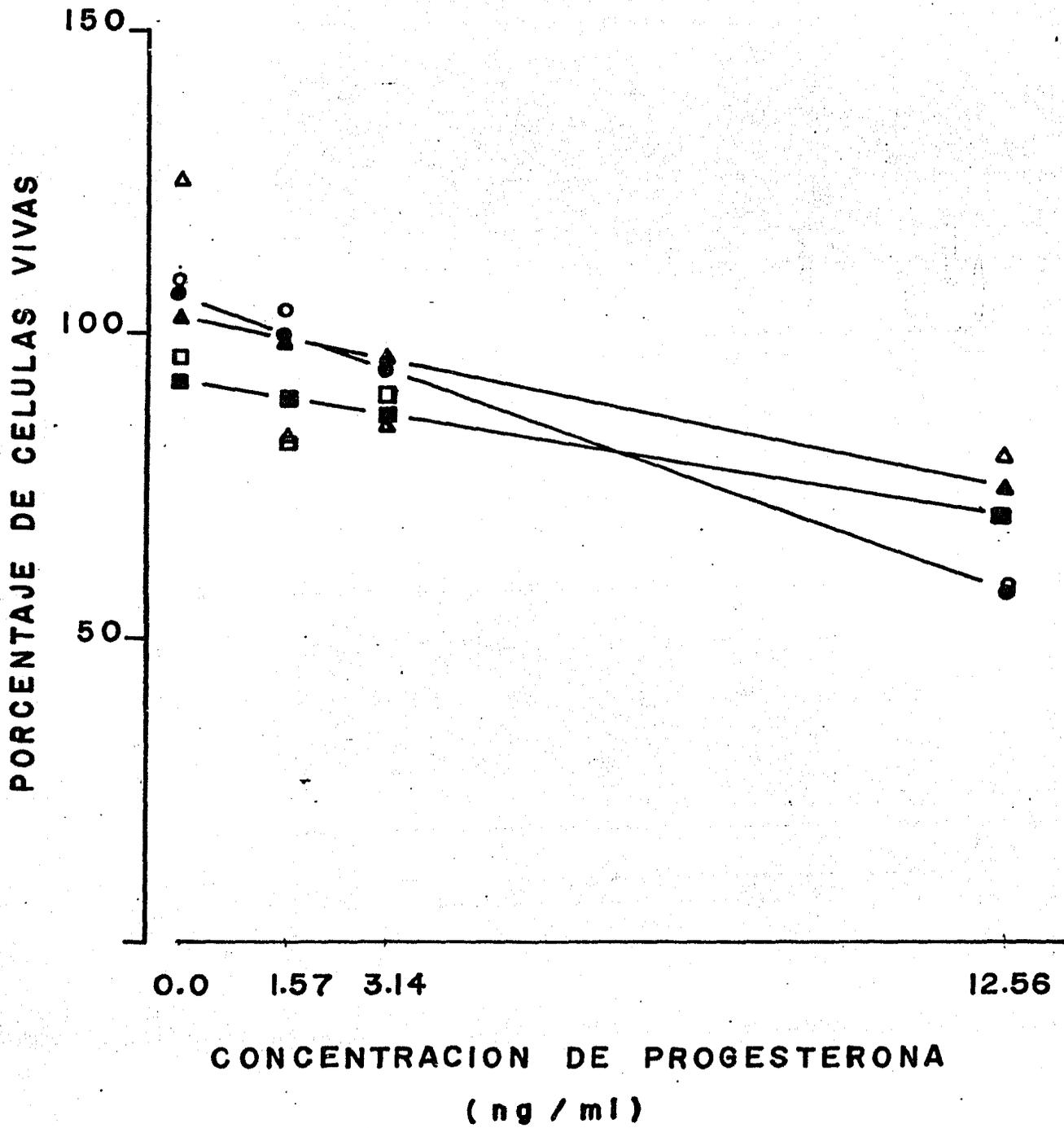
F, B = 6.8*

$$F_{t 0.05(3,6)} = 6.6$$

Factor A = horas de incubación

Factor B = concentración de progesterona (ng/ml).

Figura 10. Porcentaje del número de células vivas a partir de los cultivos con sangre periférica de varón, sometidos a diferentes concentraciones de progesterona, a varias horas de incubación. Las ecuaciones de las rectas y los coeficientes de correlación correspondientes son: 24 horas (●), ----- $y = -3.87x + 106.4$, $r = -0.97$; 72 horas (▲), $y = -2.2x + 103$, $r = -0.6$; 120 horas (■), $y = -1.8x + 92.6$, $r = -0.89$.



más altas de esta hormona a diferencia de que en los cultivos testigo, la población aumenta. A las 72 horas, en todos los cultivos sometidos a la acción de la progesterona, el número de células vivas disminuye, aunque el efecto ya no es tan pronunciado como el observado a las 24 horas para las concentraciones más altas. A las 120 horas de incubación, en todos los casos hay una disminución en el número de células, con respecto a la cantidad sembrada, siendo menor de un 4% en los cultivos testigo. Esto último puede explicarse por el aumento en un 25% de la población a las 72 horas y quizá la densidad alcanzada haya provocado la mortalidad observada a las 120 horas. El análisis estadístico muestra cómo las horas de incubación, no tienen diferencias significativas en cuanto al número de células vivas y son las concentraciones de progesterona, las responsables de las diferencias en la respuesta.

Cuando se estudió el efecto de las dos hormonas en forma simultánea (tabla 9 y figura 11), prácticamente se observaron los mismos resultados que cuando se sometieron los linfocitos sólo a la acción de la progesterona, lo que hace suponer que es esta hormona la que tiene una influencia más directa en la capacidad de respuesta de los linfocitos ante la PHA, sin embargo hay algunas diferencias importantes: una de ellas es que la relación entre incorporación de ^3H -Timidina/dosis es aritmética y no logarítmica, como en el caso de la figura 9 y otra, que los efectos en cuanto a las concentraciones hormonales ya no son tan marcados, lo cual se puede observar tanto a partir del análisis estadístico, al comparar los valores de F obtenidos para las diferentes horas de incubación en los dos experimentos (120.0 y 48.8) y con relación a las concentraciones de progesterona (38.8 y 16.6), en las tablas 7 y 9, además con los valores de las pendientes de las rectas mostradas en las figuras 9 y 11.

Por último en cuanto a los resultados en el conteo de células vivas a partir de los cultivos sometidos a la acción del estradiol más progesterona (tabla 10 y figura 12), no --

Tabla 9. Incorporación de ^3H -Timidina en DPM, obtenida a -- partir de los cultivos de linfocitos con sangre periférica de varón, sometidos a diferentes concentraciones de estradiol más progesterona, con diversos tiempos de incubación, aplicando análisis de varianza de dos variables, por triplicado.

Factor B	Factor A		
	24	72	120
Testigos	964.2	35589.1	48332.6
	773.1	35934.6	31876.3
	662.3	33829.0	18562.2
	799.9 ± 88.2	35117.5 ± 651.9	32923.7 ± 8609.9
0.05/1.57	621.5	30447.6	16030.1
	768.9	19090.5	27829.0
	555.7	21547.1	38825.4
	648.7 ± 63.0	23695.1 ± 3449.9	27561.5 ± 6581.8
0.10/3.14	550.0	22794.7	24324.7
	580.0	16431.9	30914.5
	565.5	21704.1	22668.4
	565.3 ± 8.8	20310.2 ± 1964.5	25969.2 ± 2518.5
0.10/12.56	438.3	4387.4	4212.4
	351.1	5024.6	3479.0
	456.3	5888.5	4564.8
	415.2 ± 32.2	5100.2 ± 434.9	4085.3 ± 319.8

Análisis de varianza:

Fuente de variación	G.L.	S.C.	M.C.
Subgrupos	11	6.5 X 10 ⁹	5.9 X 10 ⁸
A	2	3.4 X 10 ⁹	1.8 X 10 ⁹
B	3	1.9 X 10 ⁹	6.2 X 10 ⁸
A X B	6	9.3 X 10 ⁸	1.6 X 10 ⁸
Dentro de los subgpos.	24	9.0 X 10 ⁸	3.8 X 10 ⁷

$$F, A = 48.8^*$$

$$F_t 0.05(2,24) = 3.4$$

$$F, B = 16.6^*$$

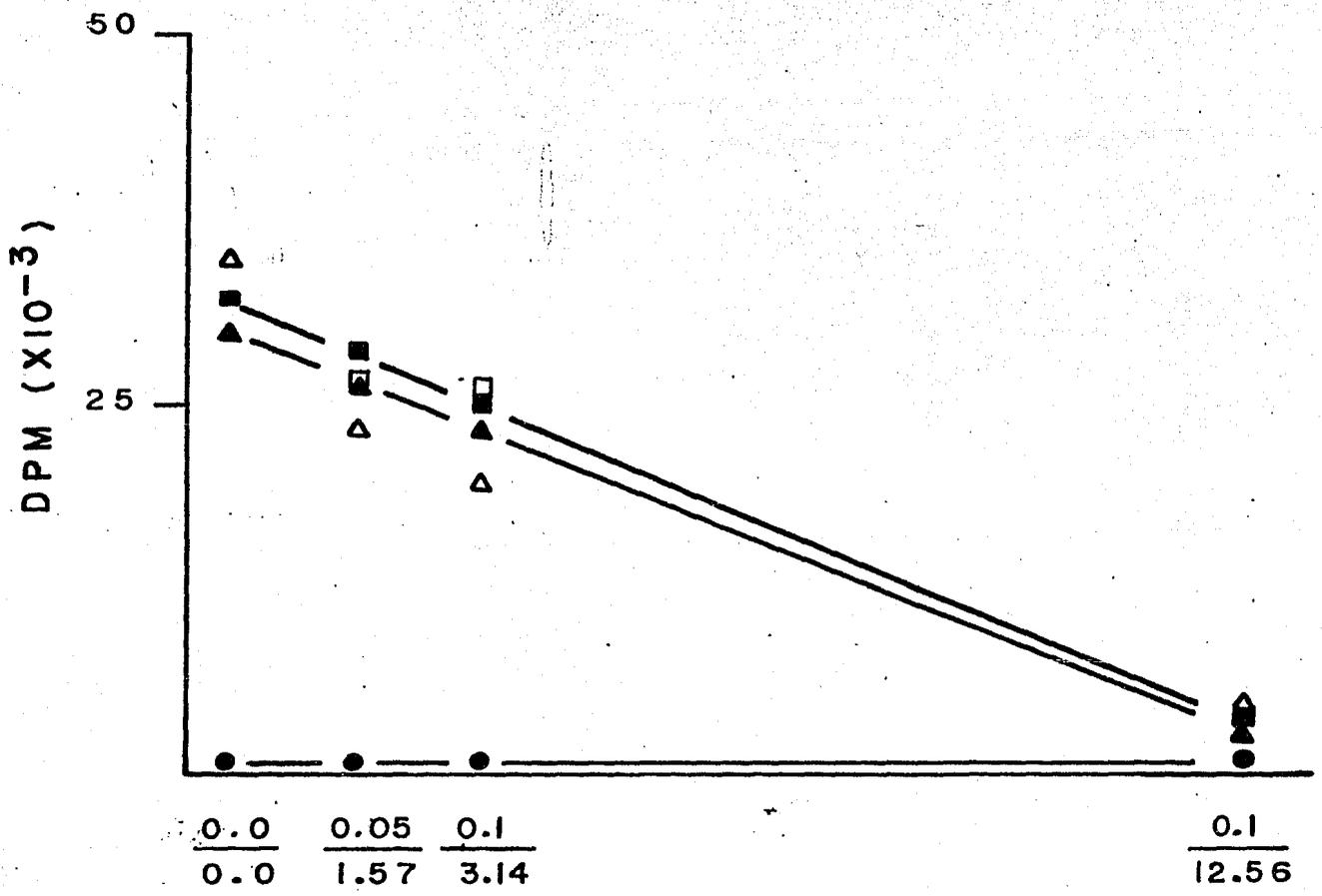
$$F_t 0.05(3,24) = 3.0$$

$$F, A X B = 4.1^*$$

$$F_t 0.05(6,24) = 2.5$$

Factor A = horas de incubación, Factor B = $\frac{\text{estradiol}}{\text{progesterona}}$ (ng/ml).

Figura 11. Incorporación de ^3H -Timidina, a partir de los cultivos con sangre periférica de varón, sometidos a diferentes concentraciones de estradiol más progesterona, a varias horas de incubación. 24 horas (\bullet). Las ecuaciones de las rectas y los coeficientes de correlación correspondientes son: 72 horas (\blacktriangle), $y = -2079x + 30032$, $r = -0.96$; 120 horas (\blacksquare), $y = -2248x + 32342$, $r = -0.99$.



CONCENTRACION DE ESTRADIOL/PROGESTERONA
(ng/ml)

Tabla 10. Porcentaje de células vivas, a partir de los cultivos con sangre periférica de varón, sometidos a varias - concentraciones de estradiol más progesterona, a diferen--tes horas de incubación, aplicando análisis de varianza de dos variables, sin réplicas.

	Factor B		Factor A	
	24	72	120	
Testigo	103.8	118.4	102.2	
0.05/1.57	81.4	109.5	114.6	
0.10/3.14	91.6	104.3	101.6	
0.10/12.56	63.5	105.1	111.9	

Análisis de varianza:

Fuente de variación	G.L.	S.C.	M.C.
A	2	1463.2	731.6
B	3	332.2	110.7
Error	6	798.1	133.0

$$F, A = 5.5$$

$$F_t 0.05(2,6) = 7.2$$

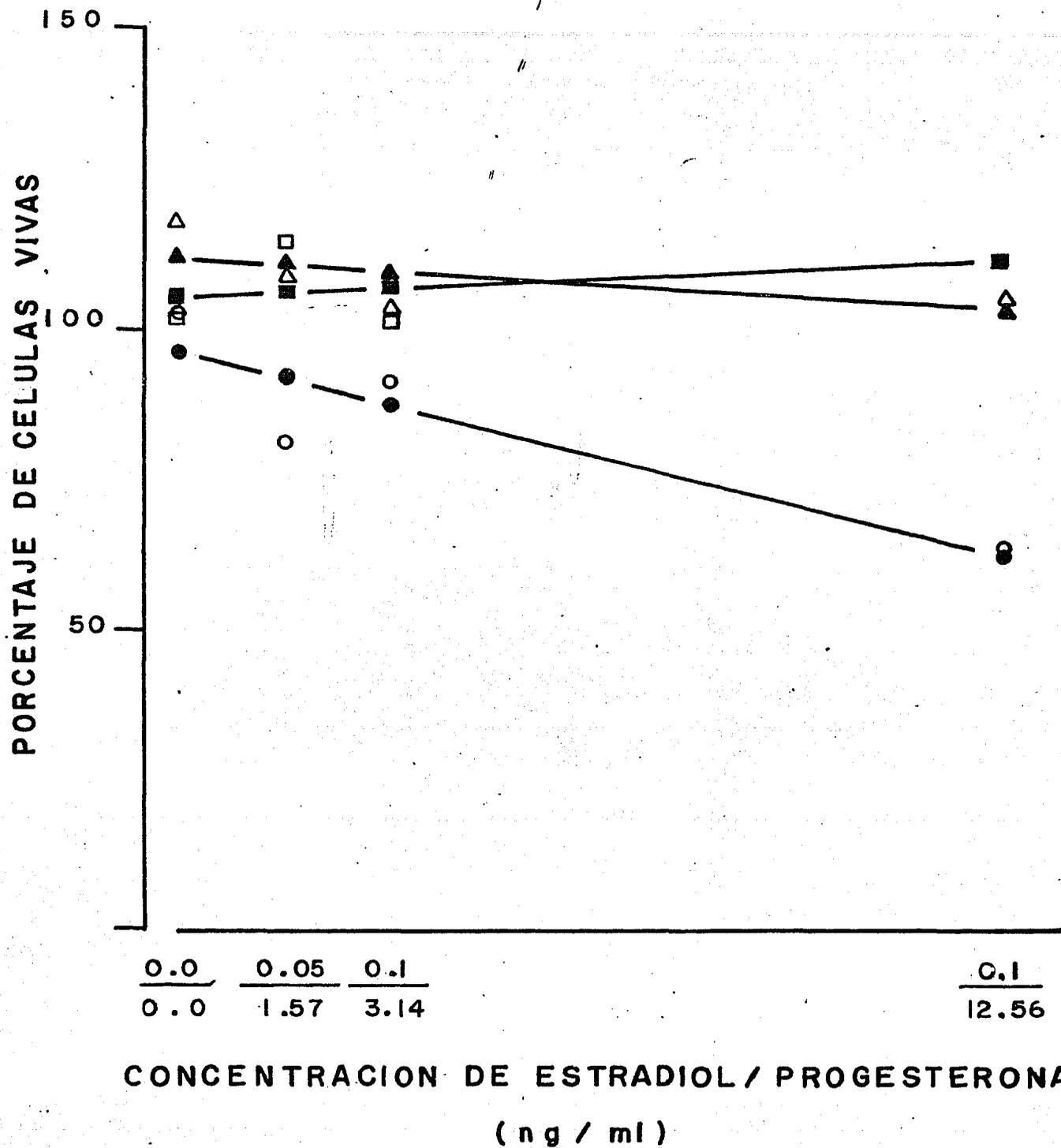
$$F, B < 1$$

$$F_t 0.05(3,6) = 6.6$$

Factor A = horas de incubación

Factor B = concentración de estradiol/progesterona (ng/ml).

Figura 12. Porcentaje del número de células vivas, a partir de los cultivos con sangre periférica de varón, sometidos a diferentes concentraciones de estradiol más progesterona, a varias horas de incubación. Las ecuaciones de las rectas y los coeficientes de correlación correspondientes son: 24 horas (●), $y = -2.7x + 96.8$, $r = -0.8$; 72 horas (▲), $y = -0.72x + 112.5$, $r = -0.6$; 120 horas (■), $y = 0.48x + 105$, $r = 0.4$.



dan diferencias significativas ni para las diversas horas de incubación ni entre las concentraciones hormonales utilizadas, lo cual hace aún más aparente el probable efecto antagónico del estradiol, propuesto por Robel, et al., --- (1981), sobre la acción de la progesterona.

Todo parece indicar que al menos in vitro, sí hay una influencia de las hormonas que participan en el ciclo menstrual, sobre la capacidad de respuesta de los linfocitos a la PHA, lo cual es muy bien apreciado en el caso de la progesterona, por lo que a continuación se propone un mecanismo de acción probable de ésta, sobre las células en cultivo.

El mecanismo de acción propuesto por Coffey, et al., (1977), de que la PHA incrementa la entrada de Ca^{2+} y en consecuencia provoca una acumulación intracelular de éste que conduce a la división celular, posiblemente sea afectado, debido al paso de la progesterona a través de la membrana celular, lo que puede ser un evento suficiente como para alterar la permeabilidad de ésta al paso de ciertos iones como el Ca^{2+} y por lo tanto, las células sean incapaces de entrar a la división celular.

Es también probable que existan moléculas en los linfocitos, capaces de interactuar con la progesterona y se forme así un complejo, el cual posiblemente produzca una activación sobre la enzima adenilato ciclasa como proponen Rosenfeld y O'Malley (1970) y de esta forma aumenten los niveles de AMP_c . Dicho aumento impedirá los cambios en el metabolismo celular que conducen a la división.

Esto se ve apoyado con los experimentos en los que compuestos tales como la norepinefrina, el isoproterenol y las prostaglandinas, elevan los niveles de AMP_c e inhiben la incorporación de 3H -Timidina por linfocitos estimulados con PHA (Smith, 1971).

Por otro lado, Katagiri (1976), observó que el aumento intracelular de Ca^{2+} provoca la activación de la guanilato ciclasa y propone que esto trae como consecuencia un

aumento en los niveles de GMP_c , lo que finalmente conduce a la división celular y si se considera lo observado por Rosenfeld y O'Malley (1970), parecería una condición de contradicción pues a diferencia de lo que se propone en la hipótesis del "ying-yang" (Lenhinger, 1978), en donde ambos nucleótidos, el AMP_c y el GMP_c , muestran cambios inversos de concentración durante la regulación de procesos celulares en los que están involucrados, sin embargo no existe tal, si suponemos que no son eventos simultáneos y que la acción de la progesterona probablemente sea la que se manifiesta, sobre la acción de la PHA.

En cuanto al posible efecto antagónico del estradiol, se puede pensar que en los niveles a los que se trabajó, es probable que actúe contrarestando la acción de la progesterona, pues como propone Brenner (1974), la acción de la progesterona, es dependiente del estradiol, en células del endometrio, lo que nos permite suponer algo similar en los linfocitos.

Se observa que en las muestras de sangre obtenidas durante los primeros días del ciclo menstrual, la gran mayoría de la población celular en los cultivos, es muy sensible a la estimulación por PHA, es decir que la unión de este antígeno inespecífico, con los receptores de superficie hacen a las células salir de su estado quiescente y entrar a la fase G_1 y posteriormente a la síntesis de ADN y división celular. Es importante mencionar que para este tiempo los niveles de estradiol y progesterona en la muestra de sangre, son muy bajos, por lo tanto la estimulación de los linfocitos por la PHA prácticamente no se ve afectada, en comparación con muestras tomadas en otros días del ciclo.

Crocker en 1974 demostró que durante los primeros días del ciclo menstrual en un sistema in vivo, el número de receptores a ambas hormonas en el endometrio humano, es muy elevado, el más alto corresponde a los de la progesterona con relación a otras etapas del ciclo. Podría sugerirse que las moléculas de hormonas circulantes, presentes en

tan pequeñas cantidades, tienen "preferencia" por las células de los órganos blanco y por lo tanto es mínima la interacción con los linfocitos, de ahí que la estimulación de estos por cualquier antígeno circulante en la mujer, cuyo mecanismo de acción fuera similar al propuesto para la PHA, no se vería afectada y se llevaría a cabo una respuesta inmune normal.

De las muestras tomadas conforme se acerca el período de la ovulación, algunos linfocitos empiezan a ser menos susceptibles a la estimulación por PHA, de tal manera que disminuye la parte de la población que inicia síntesis de ácidos nucleicos y pasa a etapas posteriores. En este intervalo, los niveles de progesterona comienzan a elevarse y los de estradiol ya van en descenso, después de tener un máximo entre los días 11 y 12 del ciclo menstrual.

Al considerar un sistema in vivo como el endometrio humano, en donde se tiene un mínimo en el número de receptores de estradiol y al parecer los receptores a la progesterona no aumentan, con respecto a principios del ciclo (Milgrom, 1972), se facilitaría la acción hormonal sobre las células blanco y debido a su alta concentración, se encontraría un nivel alto en sangre circulante, lo que brindaría una mayor oportunidad de tener contacto con los linfocitos, así que la presencia de la PHA, no sería suficiente como para desencadenar una respuesta completa, sino ligeramente disminuida.

De muestras obtenidas a finales del ciclo, es mínimo el número de células en cultivo, capaces de responder a las señales provenientes del medio, pues es un poco menos de la mitad de la población celular la que sale de la fase G_0 y entra a la fase S. En estos momentos los niveles de progesterona, son muy altos, los más altos durante todo el ciclo y los niveles de estradiol son un poco menores que en los días cercanos a la ovulación, de tal forma que es mínima la estimulación por PHA sobre los linfocitos, pues posiblemente la progesterona altera en gran medida

los niveles de segundos mensajeros o provoca alteraciones en la permeabilidad de la membrana que conduzcan a una inhibición en la respuesta de las células al mitógeno.

En condiciones in vivo, se ha demostrado que los receptores a ambas hormonas en células del endometrio, disminuyen (Mester, 1974), y si se considera esto y se observan todos los datos experimentales, se puede sugerir que la gran cantidad de progesterona en el plasma, y la pequeña cantidad de receptores a ésta en el endometrio, favorece su acumulación en la sangre, de tal forma que en una muestra que se cultive, es mínima la estimulación por la PHA, de manera que es menor la respuesta.

Los únicos datos sobre efectos de la PHA in vivo que se encontraron, son los de Anderson (1978), obtenidos en experimentos con ratones, en distintos períodos de gestación, en donde se encontró que a diferencia de animales no preñados, los linfocitos son prácticamente incapaces de responder a la PHA y a la con A en el medio, lo que en el humano podría interpretarse como una forma de prevenir el rechazo al embrión recién implantado que sería reconocido por los linfocitos de la madre como una población celular extraña al organismo.

Sin embargo, ésto hace evidente la necesidad de estudiar más a fondo las diferencias en estimulación de linfocitos, con respecto a los cambios en los niveles de hormonas esteroideas en las muestras, por ejemplo, tratando de tomar muestras a intervalo más cortos que los utilizados en el presente trabajo y de esta manera correlacionar los resultados con los niveles hormonales en cada día y paralelamente con muestras de varones. Hacer cultivos con sangre periférica de mujeres embarazadas durante la gestación, tomando muestras de sangre a intervalos lo más corto posible para seguir el comportamiento de las poblaciones de linfocitos en cuanto a susceptibilidad a antígenos inespecíficos como la PHA.

IV. RESUMEN Y CONCLUSIONES.

Es evidente que los resultados obtenidos no corresponden del todo, a los presentados en el trabajo que sirvió como antecedente a éste (Ostrosky-Shejet, 1972). Una explicación es que, en dicho trabajo sólo se consideraron cultivos con sangre de una donadora y fueron analizados bajo sólo un criterio, reportándose un máximo en la producción de figuras mitóticas durante los días cercanos a la ovulación y mínimo a principios y finales del ciclo menstrual.

En el presente trabajo, se observó, basándose en cultivos con sangre de varias donadoras, una estimulación por PHA muy marcada a principios del ciclo, mediana durante la fase ovulatoria y mínima a finales de éste, considerando los parámetros de incorporación de ^3H -Timidina, número de figuras mitóticas y conteo de células vivas.

En los cultivos con muestras de varones no se observaron cambios en la respuesta de los linfocitos en los diferentes días, al parecer porque los niveles de hormonas tales como la testosterona y dihidrotestosterona no cambian al no existir un ciclo como tal o bien estas hormonas no interfieren con la acción de la PHA in vitro.

Los cultivos de sangre de varón, sometidos a diferentes concentraciones de estradiol y progesterona, muestran el mismo comportamiento en respuesta a la PHA para las concentraciones empleadas, que simulan las que ocurren en la mujer, lo cual apoya los resultados obtenidos con las donadoras.

Esto permite suponer que el efecto sea a nivel de cambios en la permeabilidad de la membrana y no a través de receptores, ya que los varones al no contener estradiol ni progesterona circulantes, lo más lógico es que sus células no contengan receptores a estas hormonas y por lo tanto su acción sobre los linfocitos sea indistinta con respecto a lo observado en las donadoras, cuando se suministran en los cultivos, concentraciones hormonales similares a las

reportadas en las mujeres.

Los niveles de progesterona parecen ser directamente los responsables de las diferencias en estimulación de los linfocitos a la PHA, sin conocerse exactamente el mecanismo de acción.

Para finalizar, queda claro que en condiciones experimentales, los factores ambientales influyen grandemente sobre la respuesta de las poblaciones celulares, mediante -- procesos que en la mayoría de las ocasiones son sumamente complicados, de ahí que este trabajo podría continuarse -- considerando otro tipo de hormonas esteroides, como la testosterona, con el fin de acumular más información sobre -- los mecanismos de acción sobre las células del sistema in-mune de organismos tan complejos como son los mamíferos superiores.

V. BIBLIOGRAFIA.

Aguilar-Santamaría, M. de los A. (1977). Estudio del ciclo celular del linfocito humano mediante la incorporación de Timidina tritiada "in vitro". Tesis profesional. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. U.N.A.M.

Anderson, D. J. (1978). The Responsiveness of Various Maternal Mouse Lymphocyte Populations to Mitogenic Stimulation "in vitro". Cell. Immunol 41:150-156.

Arakaki, D. T. y R. S. Sparkes (1963). Microtechnique for culturing Leukocytes from Whole blood. Cytogenetics 2:57-60

Bonilla-Núñez, M. (1970). Reacción de linfocitos humanos en cultivo a los componentes del medio II. Tesis profesional. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. U.N.A.M.

Brenner, R. G. (1974). Cyclic Changes in Oviductal Morphology and Residual Cytoplasmic Estradiol Binding Capacity Induced by Sequential Estradiol-Progesterone Treatment of Spayed Rhesus Monkeys. Endocrinology 95:1094-1104.

Coffey, R. G., Hadden, E. and Hadden, J. (1977). Evidence for cyclic GMP and calcium mediation of Lymphocyte activation by mitogens. J. Immunol 119(4):1387-1394.

Cox, R. F. and Sauerwein, H. (1970). Studies on the mode of action of progesterone on chicken oviduct epithelium. Exptl Cell. Res 61:79-90.

Crocker, S. G. (1974). Uptake of (6,7-³H)Oestradiol-17 by Normal and abnormal Human Endometrium. J. of Endocrinol 62:145-152.

Dionigi, R., Aris, Z., Fulvio, A., Roberto, G. and Guido, B

(1973). Cyclic variation in the response of lymphocyte to phytohemagglutinin in healthy individuals. *Transplantation* 16(6):550-557.

Grobstein, C. (1979). External Human Fertilization. *Sci. Am* 240(6):57-67.

Heath, O. V. (1977). *La estadística en la investigación experimental*. Ed. Omega. Barcelona, España.

Jacob, F and J. Monod (1961). Genetic Regulatory Mechanisms in the Synthesis of Proteins. *J. Mol. Biol* 3:318-322.

Jerne, N. K. (1973). The Immune System. *Sci. Am*, 229(1):52-60.

Katagiri, T. (1976). Activation of Mouse Splenic Lymphocyte Guanylate Cyclase by Calcium Ion. *J. Biochem* 79:849-856.

Kissel, H., M. Rosenfeld, L. Chase and B. O'Malley (1970). Response of chick oviduct adenyl-cyclase to steroid hormones. *Endocrinology* 86:1019-1023.

Lehninger, A. L. (1978). *Biochemistry*. 2^a ed. Worth Publishers, Inc. Nueva York, N. Y. EUA.

León-Cázares, J. M. (1980). *Curso Seminario de Biología (Biología Celular II)*. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. U.N.A.M.

Lerner, A. R. and F. J. Dixon (1973). The Human Lymphocyte as an Experimental Animal. *Sci. Am.* 228:82-91.

Ling, N. R. and J. E. Kay (1975). *Lymphocyte Stimulation*. North Holland Publishing Co. Amsterdam, Holanda.

Luria, S. E. (1975). *36 Lectures in Biology*. MIT Press. Ma-

ssachusetts, M. A. EUA.

Mazia, D. (1974). The Cell Cycle. Sci. Am 230(1):55-64.

McEwen, B. S. (1976). Interactions between Hormones and Ner
ve Tissue. Sci. Am 255:48-58.

Mester, J. (1974). Hormonal Control of Qestrogen Receptor in
Uterus and Receptivity for Ovoinplantation in the Rat. Natu
re 250:774-777.

Milgrom, E. (1972). Progesterone in Uterus and Plasma: VI. U
terine Progesterone Receptors during the Estrus Cycle and -
Implantation in the Guinea Pig. Endocrinology 90:1071-1078.

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

Oka, R. L. and L. Schimke (1969). Progesterone Antagonism -
of Estrogen-induced Cytodifferentiation in Chick Oviduct. --
Science 163:83-85.

O'Malley B. (1974). Science 184:215-219.

O'Malley, B. W. and W. T. Schrader (1976). The Receptors of
Steroid Hormones. Sci. Am 234:32-43.

Ostrosky-Shejet, M. P. (1972). Reacción de Linfocitos Huma-
nos en cultivo. Efecto del ciclo menstrual en la producción
de mitosis. Tesis profesional. Facultad de Ciencias. Depar-
tamento de Biología. U.N.A.M.

Phillips, H. J. (1973). Dye Exclusion Test for Cell Viabili-
ty in Tissue Culture: Methods and Applications. Krusse, P. F
and M. K. Patterson, ed. Academic Press, Inc. New York, N.

Y., EUA.

Pierce, J, R. (1972). Communication. Sci. Am 227:52-60.

Robel, P., R. Mortel and E. Baulieu (1981). Estradiol and Progesterone Receptors in Human Endometrium. Biochemical Actions of Hormones 8:493-513.

Rosenfeld, M. G. and B. W. O'Malley (1970). Steroid Hormones Effects on Adenyl Cyclase Activity and Adenosine 3',5'-Monophosphate in Target Tissues. Science 168:253-255.

Sharon, N. (1977). Lectins. Sci. Am 236:108-119.

Smith, J. W (1971). Human Lymphocyte Metabolism Effects of Cyclic and Noncyclic Nucleotides on Stimulation by Phytohemagglutinin. J. of Clin. Invest. 50:442-448.

Sokal, R. R. and F. J. Rohlf (1969). Biometry. W. H. Freeman and Co. San Francisco, Cal. EUA.

Soren, L. (1973). Variability of time at which PHA-stimulated lymphocytes initiate DNA synthesis. Exptl. Cell. Res 78 201-206.

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

Stormshak, f. (1981). Uterine Estrogen and Progesterone Receptors in Animal Reproduction (BARC, Symposium 3. Harold Hawk, ed). Allanheld, Osmum, Montclair.