

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

00381
9
Zej

"ESTUDIO CITOGENETICO COMPARATIVO EN DIFERENTES ETAPAS
DEL DESARROLLO HUMANO Y EN EL ENVEJECIMIENTO PREMATURO"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS
(BIOLOGIA)

PRESENTA

VIRGINIA PALMA PADILLA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D.F.

1990



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.

~~PLAN~~ CONTENIDO

I.	PLANTEA LENTO DEL ESTUDIO	1
II.	OBJETIVOS	2
III.	HIPOTESIS	3
IV.	MARCO TEORICO	4
	A) CICLO CERCERA	4
	B) INTERCAMBIO DE ORNATIVES HERMANAS	24
	C) ABERRACIONES DEL CICLO	34
	D) EFECTOS DEL DESARROLLO HUMANO	50
	E) ENVEJECIMIENTO	54
	F) PROGENIA	65
V.	DEFINICION Y METODOS	69
VI.	RESULTADOS	79
VII.	DISCUSION	113
VIII.	CONCLUSIONES	135
IX.	BIBLIOGRAFIA	138

INDICE DE FIGURAS, TABLAS, GRAFICAS Y CASOS

FIGURA CC-1	CITSA CELULAR	5
FIGURA CC-2	MITOSIS	6
FIGURA CC-3	MEIOSIS	7
FIGURA CC-4	AVANCES GENERALES EN LA REGULACION DEL CICLO CELULAR	18
FIGURA ICH-1	MECANISMO DE FORMACION MUSCULAR PARA LA TIRACION DEL MÚSCULO DE CRISTIDAS HERMANAS	25
FIGURA ICH-2	ESQUEMAS CON TIRACION DIFERENCIAL EN 1 ^a , 2 ^a y 3 ^a DIVISION CELULAR	26
FIGURA AC-1	ORDENES DE HERENCIA LENTO DE LA ARGENTINA PARA EL CROMOSOMA METAFASICO	35
FIGURA AC-2	TRANSICION METAFASICA - METAFASICA	37
FIGURA AC-3	POLICROMATIDOS METAFASICOS - BANDAS C	37
FIGURA AC-4	ENDOCROMATIDACION	40
FIGURA AC-5	ORIGEN DE LAS ABERRACIONES CROMOSOMICAS NUMERICAS ANEUPLOIDES	44
FIGURA AC-6	MECANISMO DE FORMACION GENERAL PARA LAS ABERRACIONES CROMOSOMICAS ESTRUCTURALES	45
FIGURA AC-7	ABERRACIONES LENTO METAFASICO	46
FIGURA AC-8	ABERRACIONES FILO METAFASICO	48
TABLA M-1	METODOLOGIA	78
TABLA 1	CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO	84
TABLA 2	CALCULOS Y RESULTADOS GENERALES PARA C/INDIVIDUO EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO	85
GRAFICA 1 - 3	CINETICA CELULAR EN LOS NIÑOS PROTERIA	88
GRAFICA 4 - 9	CINETICA CELULAR EN NIÑOS NORMALES	89

TABLA 9	FRECUENCIA DE AC EN SUBTIVOS NORMALES Y SUBTIVOS NON BRDU EN 1 ^a y 2 ^a DIVISION PARA CADA INDIVIDUO	106
TABLA 10	FRECUENCIA BRDU DE ABERRACIONES DE COMI- CAS EN SUBTIVOS NORMALES (N) SIN BRDU PARA CADA INDIVIDUO	107
TABLA 11	FRECUENCIA DE LOS SUBTIVOS DE LAS ABERRACIONES DE SUBTIVOS (AC) NORMALES DE JUSTIVOS NORMALES (N) Y SUBTIVOS NON ABERRACION DE BRDU PARA CADA INDIVIDUO	108
TABLA 12	COMPARACIONES ESTADISTICAS CON RESPECTO DE χ^2 DEL NUMERO DE AC EN SUBTIVOS NORMALES Y SUBTIVOS NON BRDU EN CADA SUBTIVO DE ESTUDIO	109
ESQUEMA 4	HORIZONTES DE DISTRIBUCION ESTADISTICA EN LOS DIAGRAMAS DE SUBTIVOS DE ESTUDIO PARA LAS FRECUENCIAS BRDU DE JUSTIVO O COMI- DE GENERACION (TSG), INTERACCION DE INTERACCIONES HEREDITARIAS (ICH) Y ABERRACIONES CROMOSOMICAS (AC)	110
TABLA 13	RESUMEN GENERAL DE LAS FRECUENCIAS DE AC-111 GENERICAS (X) EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO	
GRAFICA 42 - 45	DIAGRAMAS DE DISTRIBUCION Y REPRESENTACION DEL TIEMPO PROMEDIO DE GENERACION (TSG) CONTRA EL INTERACCION DE INTERACCIONES HEREDITARIAS (ICH)	112

" EL ENVEJECER TIENE MUCHAS VIRTUDES (larga pausa).
Estoy intentando pensar cuáles pueden ser. "

Maughan William Somerset (a los 80 años).

I. PLANTEAMIENTO DEL ESTUDIO

Es claro que los eventos iniciales que conducen al desarrollo y deterioro de un organismo ocurren a nivel molecular, pero tienen su expresión a nivel celular. De ahí el interés de investigar el efecto de la edad y el proceso del envejecimiento natural y prematuro estudiando células cultivadas "in vitro" procedentes de sujetos normales en diferentes etapas del desarrollo y en pacientes con envejecimiento prematuro como es el síndrome de Progeria, el cual ofrece una especial oportunidad para estudiar algunos hechos relacionados con el envejecimiento celular.

Pocos trabajos en la literatura hablan acerca de la duración del del ciclo celular, intercambiando de cromátides hermanas, así como la frecuencia de aberraciones cromosómicas en linfocitos humanos de sangre periférica en las diferentes etapas del desarrollo, en el envejecimiento natural y en el problema del envejecimiento prematuro, por lo que el presente estudio se propuso determinar si la edad o los procesos de envejecimiento afectan significativamente a la población celular de linfocitos "in vitro" y la influencia de variación entre los diferentes parámetros citogenéticos estudiados.

II. OBJETIVOS

- a. Establecer el tiempo de duración del ciclo celular de sujetos en edad pediátrica con el Síndrome de Progeria, la cual es una enfermedad genética caracterizada principalmente por envejecimiento prematuro y compararlo con el tiempo de ciclo celular de niños, jóvenes y seniles normales.
- b. Establecer la frecuencia de intercambio de cromátides hermanas detectadas en individuos con envejecimiento prematuro y relacionarla con la de sujetos normales de diferentes edades.
- c. Establecer la frecuencia y tipo de aberraciones cromosómicas de pacientes en edad pediátrica y compararla con la de los diferentes grupos de estudio normales.
- d. Determinar si la frecuencia de intercambio de cromátides hermanas se relaciona con el tiempo de duración del ciclo celular en los diferentes grupos de estudio.
- e. Determinar el efecto citotóxico de la BrdU comparando la frecuencia de aberraciones cromosómicas de las células de cultivos normales sin BrdU con las células en primera división de cultivos con BrdU y comparar la frecuencia de aberraciones cromosómicas de primera y segunda división de cultivos con BrdU para estimar el daño clastogénico en los diferentes grupos de estudio.

III. HIPOTESIS

Los linfocitos de individuos con envejecimiento prematuro tienen un tiempo de duración del ciclo celular, un número de intercambio de cromátides hermanas y un número de aberraciones cromosómicas significativamente mayor que las células del grupo de sujetos normales de la misma edad.

Los sujetos normales poseen un tiempo de duración del ciclo celular, un número de intercambio de cromátides hermanas y un número de aberraciones cromosómicas especie-genotipo específico de acuerdo a su sensibilidad y eficiencia fisiológica, presentando un patrón individual para cada parámetro estudiado, pero cuyos promedios de frecuencia son diferentes en cada una de las etapas del desarrollo humano.

IV. MARCO TEORICO

A) CICLO CELULAR

1.- Definición.

Howard y Pelc en 1953 (1) introdujeron la idea de ciclo celular, definiendolo Mitchison en 1971 (2) como el período de tiempo comprendido entre la formación de la célula por división de su célula madre y el tiempo cuando ella misma se divide y da origen a dos células hijas (fig. CC-1).

El ciclo celular comprende dos períodos: la división celular y la interfase donde ocurre la duplicación del ADN y las proteínas y que ocupa la mayor parte del ciclo. Siguiendo éstos dos eventos fácilmente reconocibles en las células cíclicas y mediante la observación de que las células sintetizan su ADN durante un intervalo definido de la interfase, el ciclo celular se divide en: Fase G_1 , Gap 1, post-mitótica o pre-sintética, es el período comprendido entre el final de la división celular o mitosis y el comienzo de la síntesis del ADN; Fase S o de síntesis del ADN; Fase G_2 , Gap 2, pre-mitótica o post-sintética es el lapso comprendido entre la replicación del ADN y el inicio de la siguiente división celular que puede referirse a una mitosis (fig. CC-2) o bien una meiosis (fig. CC-3).

También se ha caracterizado una fase denominada G_0 , Gap 0 ó Lat que es un estado de latencia celular no replicacional, que existe como parte del ciclo de vida de las células eucariontes y que ciertos autores consideran diferente a cualquier fase del ciclo celular, por lo que pudiera considerarse fuera de él (3).

FIGURA. CC-1

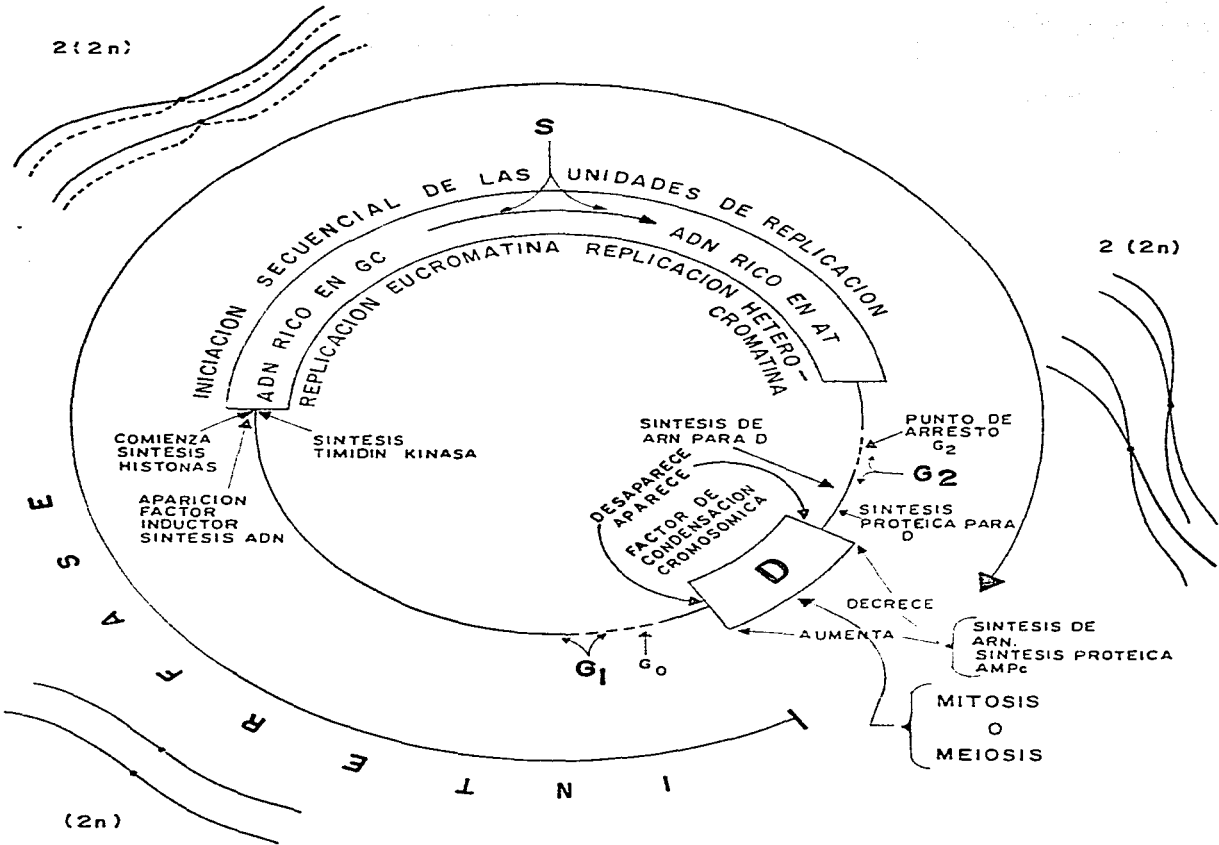
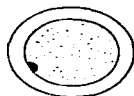


DIAGRAMA DEL CICLO CELULAR MOSTRANDO LOS PRINCIPALES EVENTOS MOLECULARES Y CITOGENETICOS (SOLO SE HA REPRESENTADO UNO DE LOS 23 PARES DE CROMOSOMAS HUMANOS) EN LA ETAPA DE DIVISION CELULAR (D) Y LA INTERFASE, LA CUAL SE ENCUENTRA DIVIDIDA EN: G₁ O PERIODO PRE-SINTETICO O POST-MITOTICO (DENTRO DEL CUAL SE CONSIDERA A G₀ CUANDO EXISTE EN LA VIDA CELULAR), S O PERIODO DE SINTESIS Y G₂ O PERIODO POST-SINTETICO O PRE-MITOTICO.

FIGURA. CC-2

M I T O S I S

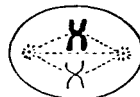
INTERFASE
G₂
2(2n)



PROFASE
2(2n)



METAFASE
2(2n)



ANAFASE
2(2n)



TELOFASE
2(2n)



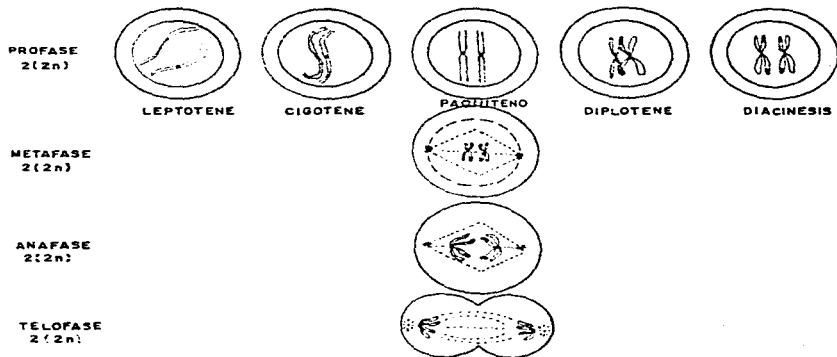
INTERFASE
G₁
(2n)



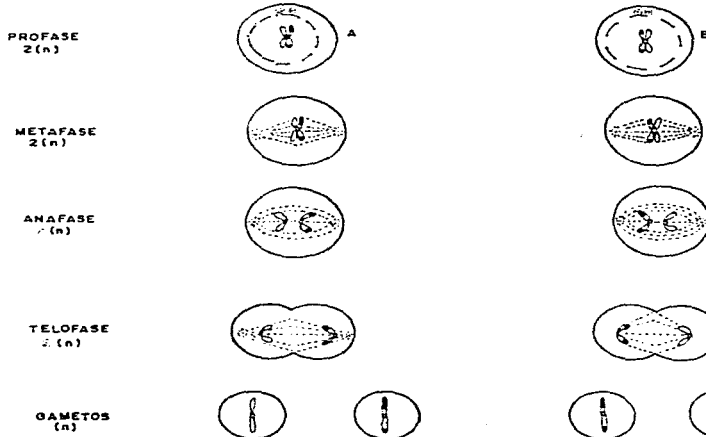
FIGURA CC-3

MEIOSIS

PRIMERA DIVISION MEIOTICA



SEGUNDA DIVISION MEIOTICA



2.- CARACTERISTICAS DE LAS FASES DEL CICLO CELULAR.

a) El período G_1 .

La amplia variedad en la longitud del período G_1 , es lo que principalmente determina la variabilidad del tiempo de generación dentro de una población celular.

Esta fase es de gran importancia en el control de la proliferación celular, durante ella se inicia y se lleva a cabo la mayor parte del crecimiento celular, la síntesis de ARN aumenta, así como los niveles y actividad de los ARN polimerasas y aumenta el número de ribosomas.

Hay una gran actividad de la síntesis proteica, principalmente de no histonas y varias proteínas fase-específicas que se han podido detectar recientemente por las técnicas de anticuerpos monoclonales (4-9), como son: Calmodulina, su aumento en la fase G_1 se relaciona con la concentración de Ca^{++} en la célula, activando la continuidad del ciclo hacia la fase S; ornitina descarboxilasa y sus productos regulan la transcripción; cinasa C relacionada con algunos protooncogenes y oncogenes celulares como c-myc; la proteína de membrana p-21 que es producto de algunos protooncogenes que se expresan en esta fase como son el c-erbB ó c-src y el c-Ha-ras, p-21 se encuentra incrementada en células viejas crecidas in vitro y pareciera que interviniera en el bloqueo de las células a nivel del paso de G_1 a S.

Se han determinado algunos factores de crecimiento y el tiempo en el que actúa en esta fase, como por ejemplo: el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) que actúan tempranamente, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y somatomedin_C que actúan tardíamente (10-13).

Se ha informado que ciertos oncogenes como c-myc, c-ras, c-erbA y c-erbB son expresados simultáneamente en relación a la acción de los factores de crecimiento y que guardan relación con los receptores para éstos factores y para distintas hormonas expresadas en esta fase (14,15).

Otras proteínas encontradas son la actina B, timidina cinasa, histona H₁ y H₃ y otras citoplasmáticas (16).

El final del período G₁ es necesaria la síntesis de enzimas que funcionen en la producción de precursores de ADN.

Muy cerca del inicio de la fase S comienza a incrementarse la actividad de las ADN polimerasas, un activo transporte de iones en la membrana celular y se ha detectado un incremento en la fosforilación proteica.

Algunos otros fenómenos observados son los cambios morfológicos en la superficie celular.

Al finalizar esta fase los cromosomas están formados por dos filamentos de la cadena del ADN y constituyendo una sola cromátide por lo que se les denomina monocromatídicos.

b) El período G₀.

Convencionalmente se ha considerado al período G₀, como un estado fisiológico que presentan las células no cíclicas con una fase G₁ muy prolongada, denominada fase quiescente, durmiente o de latencia. Actualmente por evidencias experimentales se considera a la fase G₀ un período fuera del ciclo celular por sus diferencias cualitativas y cuantitativas, distintas a cualquier otra fase del ciclo celular.

Las características de las células en G₀ varían de las de G₁ en:

- i) El grado de condensación de la cromatina en este período es mayor que en el resto de la interfase.
- ii) Los ARN ribosomal, de transferencia y mensajero aumentan en las células estimuladas.
- iii) La síntesis de proteínas aumenta en las células estimuladas
- iv) Existe una expresión génica diferente y en ocasiones inversa, tanto en proteínas histónicas como no histónicas en células de la misma línea celular en G_0 y G_1 .
- v) La proteína p53 se requiere para la salida de la fase G_0 , pero no así para continuar G_1 .

Como un punto importante debe mencionarse que existen evidencias experimentales acerca de un segundo punto de restricción, localizado en la fase G_2 en células no cíclicas ya que presentan éstas en interfase un contenido de ADN duplicado $2(2n)$, y el cromosoma es dicromatídico (3.6,8.17).

c) El período S.

Corresponde a la síntesis del ADN, el número diploide de la especie ($2n$) se duplica a $2(2n)$, el cromosoma monocromatídico formado por los dos filamentos de las cadenas del ADN al replicar tendrá cuatro filamentos o dos cadenas de ADN y será dicromatídico.

La síntesis se realiza mediante replicones (1000 a 30000 en el genoma haploide humano), los cuales son unidades de duplicación que tienen su origen en el centro y se desplazan bidireccionalmente a los extremos.

En la horquilla de replicación una proteína desenrollante separa las bandas originales, otra proteína las mantiene separadas.

Debido a que la replicación se produce en ambas bandas en dirección 3' → 5', el proceso es continuo en una de ellas y la otra en sentido opuesto, se copia solamente en segmentos cortos de 1000 a 2000 residuos de nucleótidos cada uno con su propio ARN iniciador. A estos segmentos se les conoce como fragmentos de Okasaki, un promotor móvil constituye un sitio de reconocimiento para que se depositen estos fragmentos que se convertirán posteriormente en el ADN complementario. La polimerasa III añade monómeros de ADN que alargan la banda; la polimerasa I "revisa" la secuencia, extrae los nucleótidos incorrectos e inserta los adecuados. Por último, la ligasa llena los huecos entre los fragmentos de la banda fija.

El orden de duplicación parece estar controlado por los mecanismos de metilación. En el desarrollo embrionario funcionan simultáneamente en las células todos los replicones. En los organismos adultos, la síntesis se inicia y tiene una secuencia específica dependiendo del tipo celular y en relación al contenido de bases, replicando tempranamente las regiones euromáticas ricas en G-C y tardíamente las ricas en A-T.

Para la iniciación de la síntesis de ADN y proteínas asociadas del tipo de las histonas que se sintetizan en esta fase, se requiere la integración de un complejo protéico relacionado con su metabolismo, de estas proteínas se han logrado determinar las ADN polimerasas, las ligasas, timidina cinasa, ribonucleótida reductasa, timidilato cinasa, dihidrofolato reductasa, desoxi-dimidilato sintetasa y topoisomerasa dependiente de ATP.

Se han encontrado algunas otras proteínas específicas de esta fase como son la metil transferasa y la ADP ribosil transferasa

(4,18,19).

Cabe notar que existen otros factores que influyen en la proliferación de las células como son los factores de crecimiento entre los cuales se han encontrado a somatomedina c y el factor de crecimiento parecido a insulina (Sm-C/IGF-1) que estimulan la síntesis de ADN (18).

d) El período G_2 .

En esta fase se sintetizan las proteínas específicas, necesarias para que la célula entre en división, como serían las necesarias para la condensación cromosómica denominadas "factores mitóticos" (21), que son proteínas no histónicas de gran afinidad por la cromatina y que son inactivadas por otros factores denominados "inhibidores de los factores mitóticos" que permanecen activos hasta la fase G_1 descondensando los cromosomas, el otro tipo de proteínas las cuales se han encontrado por medio de electroforesis son las involucradas en la construcción y operación del aparato mitótico (3), por último y de gran importancia tendríamos a las enzimas involucradas en el proceso post-sintético de reparación que se lleva a cabo en la fase G_2 (22).

El paso de la fase S hacia D esta regulado por el llamado segundo punto de restricción G_2 , la inhibición de la síntesis de proteínas y ARN detiene a las células en este punto, lo cual se ha corroborado por la existencia de células no cíclicas con un contenido de ADN igual a $2(2n)$ característico del período G_2 (3,6,18).

e) El período D o M.

Se ha observado que continua la producción de proteínas no histónicas cromosómicas.

En general la síntesis proteica es disminuida y se inhibe a nivel de la traducción, ya que los ribosomas no pueden unirse al ARN, el cual ha sido afectado en su transcripción y solo se sintetiza la forma 4S y 5S.

La condensación cromosómica probablemente este relacionada con la fosforilación de la proteína H3 y H1 en los residuos de serina y treonina en la porción amino terminal (4).

La división celular que se puede efectuar es la mitosis para las células somáticas o bien la serie de divisiones celulares mitóticas previas para tener un número de células "básicas" reproductoras, que por medio de la meiosis darán lugar a los gametos. estos procesos se esquematizan en la fig. CC-2 y CC-3.

3.- EL LINFOCITO COMO SISTEMA DE PRUEBA CITOGENETICA EN HUMANOS

a) El sistema inmunológico esta basado principalmente en los leucocitos los cuales patrullan todo el organismo desplazándose por la corriente sanguínea y filtrándose a través de los espacios de los tejidos. Los leucocitos comprenden una serie de células con funciones especiales. Los macrófagos, devoradores de células y partículas extrañas. así como colaboradoras en la estimulación de la función de los leucocitos encargados de la respuesta inmune, que son los linfocitos B y T.

Los linfocitos B son los auténticos responsables de la inmunidad humoral, necesitando de la colaboración de los linfocitos T para la producción de anticuerpos.

Los linfocitos T son las células centrales de la respuesta inmunológica ya que reconocen a los antígenos, actúan como células efectoras de inmunidad y regulan el mecanismo inmunológico. Al igual que las anteriores células el linfocito T se origina en la médula ósea, pero éste emigra al timo donde se diferencia y se hace funcional. Las células en estadio pre-T experimentan una serie de eventos metabólicos determinados por la expresión y represión de genes para moléculas de membrana, que funcionan como señales de las distintas etapas de la diferenciación hacia linfocitos T inmunocompetentes.

en base a los receptores de superficie celular los linfocitos T se clasifican en T_H si aceptan la parte Fc de la IgG y T_H si aceptan la parte Fc de la IgM. Las células T_H poseen función supresora en la proliferación o diferenciación de los linfocitos B y las células T_H función de ayuda (23,24).

Por medio de anticuerpos monoclonales y microscopía electrónica se han identificado en sangre periférica dos subpoblaciones de linfocitos denominados T_4+ o CD_4+ y T_8+ o CD_8+ en una relación de 2:1 (25-27).

Ambos identifican antígenos a través de sus receptores, las funciones de cooperación celular y de inducción son para las CD_4+ y para las CD_8+ de supresión y citotoxicidad.

b) Eventos y tiempo en cada una de las fases del ciclo celular del linfocito humano.

Fase G_0

La célula en G_0 se activa por medio de un antígeno o agente mito-

génico desencadenando los siguientes eventos:

La interleucina 1 (IL-1) producida por los macrófagos (28) induce a los linfocitos T a pasar de su período G_0 al período G_1 .

Se incrementa el transporte molecular a través de la membrana, cambia el flujo de cationes monovalentes, se activa la fosfolipasa A_2 . flujo de calcio, síntesis y recambio de lípidos, metabolismo del ácido araquidónico, cambio en los nucleótidos cíclicos, fosforilación de proteínas, activación de la esterasa de serina. Aceleración de la síntesis protéica, de ARN y poliaminas, cambio en el metabolismo de carbohidratos, éstos y otros cambios propician finalmente la transformación blástica (30).

Estos eventos después de estimulada la célula pueden ocurrir en un tiempo de segundos a horas.

Fase G_1

Los linfocitos T activados incrementan sus antígenos de diferenciación CD3, CD4 y CD8, y los de la clase I del complejo mayor de histocompatibilidad.

La interleucina 2 (IL-2), principalmente producida por la subpoblación celular $CD4^+$ (29) permite a los linfocitos el paso a la fase S del ciclo celular.

La regulación del ciclo celular pareciera estar controlada en este período (5).

Es la fase de mayor variabilidad para el ciclo celular, llendo de 1 a 9 horas y en promedio 8 horas (3).

Fase S

Aparecen en los linfocitos T receptores de superficie como la interleucina 2 (IL-2) y la transferrina para diferentes factores de crecimiento, logrando así el avance a través del ciclo celular e inducir la síntesis del ADN (24).

Los 23 pares de cromosomas humanos poseen aproximadamente 109 pares de bases, que se organizan en 1000 a 30,000 replicones por genoma haploide humano, siendo el tamaño de cada replicón de 7 a 100 μm y considerando que la velocidad de replicación es de 0.5 - 2.0 $\mu\text{m}/\text{min}^{-1}$, el ADN de cada replicón se sintetiza en unos cuantos minutos. La duración promedio de esta fase es de 8 horas ya que la replicación no es simultánea en todos ellos y existe un orden temporal (31).

Fase G₂

Por medio de anticuerpos monoclonales se ha determinado la presencia en los linfocitos T activados los antígenos HBJ127 y HBJ98 necesarios para el progreso de G₂ a M (32), también incrementan en su superficie celular los antígenos clase II del complejo mayor de histocompatibilidad, desconociéndose su significado biológico (33).

El tiempo de duración de esta fase se ha determinado de 2 a 6 horas, lo cual utiliza principalmente para la preparación de la condensación cromosómica y producción del aparato mitótico.

Fase D o M

Se realiza la división celular mitótica, con sus eventos de cariocinesis o división nuclear y la citocinesis o división

citoplásmica, en un período aproximado de 1 hora. La clasificación y diferentes fases se observan en la figura CC-3.

4. REGULACION DEL CICLO CELULAR.

Los mecanismos que regulan la proliferación celular no se conocen aún en su totalidad, éstos al depender de los genes dan las pautas de estudio que serían:

- a) Identificación de genes relacionados con la proliferación celular.
- b) Mecanismos por los cuales se regulan éstos genes.

Se ha logrado al caracterizar y estudiar mutantes sensibles a la temperatura, bloqueados en puntos específicos del ciclo celular, que generalmente contienen una sola proteína alterada, y aislar más de 35 genes.

Para determinar los pasos bioquímicos se pueden estudiar las diferencias entre células normales y transformadas.

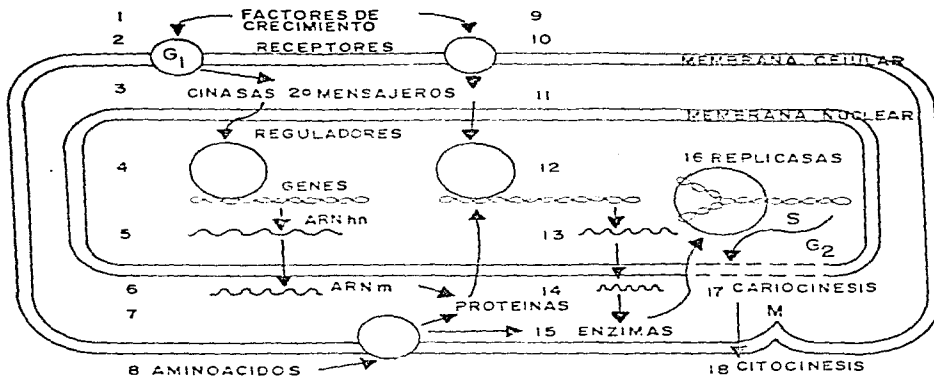
Se pueden estudiar los efectos de drogas que activen o inhiban un proceso bioquímico específico.

Los componentes celulares de mayor estudio en la actualidad son (19,35):

- i) Factores de crecimiento, dentro de los cuales se han estudiado varias hormonas polipeptídicas de acción mitogénica.
- ii) Receptores de membrana, se han estudiado algunos tan complejos como los receptores clonotípicos que son receptores de cadenas múltiples de inmunoglobulinas.
- iii) Segundos mensajeros. Muchas hormonas funcionan según un mecanismo de "doble mensajero". La hormona es el primer

FIGURA. CC-4

EVENTOS GENERALES EN LA REGULACION DEL CICLO CELULAR



- 1.- LOS FACTORES DE CRECIMIENTO ESTIMULAN LA PROLIFERACION CELULAR EN LA FASE G₁ DEL CICLO CELULAR
- 2.- UNA CASCADA DE CINASAS Y FOSFATASAS ES ACTIVADA. ESTAS ENZIMAS DESENCADENAN LA PRODUCCION DE SEGUNDOS MENSAJEROS QUE PROVOCAN EN LA CELULA EFECTOS COMO:
 - 4.- ACTIVACION GENICA
 - 5 → 7.- SINTESIS PROTEINICA
 - 8 → 14.- ALTERACION DE LA PERMEABILIDAD CELULAR, PROVOCANDO UNA NUEVA ESTIMULACION POR FACTORES DE CRECIMIENTO.
 - 15.- ACTIVACION ENZIMATICA
 - 16.- UN COMPLEJO DE ENZIMAS DE REPLICACION CATALIZAN LA SINTESIS DEL ADN
 - 17 → 18.- EL CICLO SE CONTINUA CON LA MITOSIS

mensajero, no penetra en la célula, sino que reacciona en su superficie con un receptor específico, el cual estimula o detiene la acción de enzimas como la adenil ciclasa. La enzima desencadena entonces la producción de nucleótidos cíclicos que actúan como un segundo mensajero, el AMPc o GMPc que provocarán en las células efectos como: activación génica, síntesis proteínica, activación enzimática, alteración de la permeabilidad celular, etc. Al parecer el AMPc detiene el crecimiento celular y el GMPc lo estimula (36).

- iv) Activación de genes: Es probable que la regulación génica sea ciclo dependiente y se correlacione principalmente con los eventos que ocurren en la fase G_1 (8).
- v) ARN mensajero, ribosomal y transferencia que se incrementan al estimular las células en estado quiescente.
- vi) Proteínas y Enzimas, su caracterización y mecanismo de acción en la etapa del ciclo celular en que actúan (figura CC-4).

5.- METODOS DE ESTUDIO DE LA CINETICA CELULAR.

La Cinética de proliferación celular es la cuantificación del porcentaje de células que han pasado por 1, 2, 3 o más ciclos de duplicación a lo largo de un tiempo dado.

Para la determinación de la cinética de proliferación celular y la determinación del tiempo de duración del ciclo celular es básico el conocimiento de la estructura del ADN cuyo modelo fue postulado por Watson y Crick en 1953 (37) la duplicación semi-conservativa de Meselson y Stahl reportada en 1957 (38) en procariontes y demostrada en eucariontes por Taylor y col (39,40)

en el mismo año con la timidina tritiada que es un precursor radioactivo que fue ampliamente utilizado para estudios citogenéticos.

Las metodologías más empleadas en el estudio de la cinética celular son:

a) incorporación de Precursores Radioactivos.

La incorporación en el ADN va seguida de autorradiografía y un análisis de los patrones de marcaje en función del tiempo, los precursores más usados son la timidina tritiada (^3H) y el fósforo 32 (^{32}P).

Howard y Pelc en 1953 describieron la técnica del índice de mitosis marcadas con ^3H , obteniendo la duración del tiempo del ciclo celular y estableciendo las fases del ciclo celular como las conocemos hasta la actualidad.

El tiempo del ciclo celular se obtiene al medir el intervalo que existe entre los puntos del 50% de células marcadas en las dos pendientes ascendentes.

Las ventajas que se consideran en este método son:

- i) Permite estudiar la cinética celular en poblaciones asincrónicas *in vitro*.
- ii) Pueden hacerse estudios in vivo y compararse con los de in vitro ya que una inyección del compuesto radioactivo es equivalente a un pulso en los cultivos celulares.

Las desventajas que señalan Schneider y col. 1978 son:

- i) Es una técnica muy elaborada y tardada.
- ii) Puede existir una inhibición potencial de la replicación y reutilización de los nucleótidos radioactivos.
- iii) Puede haber una baja resolución y hasta una dilución de

ser clasificadas de acuerdo con su patrón de tinción (figuras ICH-1, ICH-2) (45).

6.- LA CINETICA CELULAR Y EL TIEMPO DE DIVISION CELULAR.

Ya que el ciclo celular puede ser definido como el intervalo de tiempo que transcurre, de una mitosis a la subsecuente, una importante línea de estudio ha sido determinar el tiempo total o tiempo de duración de las diferentes fases del ciclo celular y correlacionarlo con otros fenómenos citogenéticos como podrían ser el Intercambio de Cromátides Hermanas y la presencia de Aberraciones Cromosómicas, así como tratar de ver su repercusión en mecanismos moleculares tales como la replicación del ADN y su reparación.

El tiempo del ciclo celular puede variar in vitro por algunos factores como el medio de cultivo o el suero fetal (46-49).

La tasa de crecimiento es afectada por el pH del medio ambiente de cultivo, valores por debajo de 6.3 inhiben el crecimiento celular, valores entre 6.4 y 6.7 lo reducen y los valores de 6.8 a 7.2 inducen la proliferación celular (50).

En los linfocitos de proliferación rápida el pH intracelular es más alcalino que en las células en reposo (51). Se ha observado que el pH intracelular de las fases G_0 , G_1 , y G_2 es de 7.2 y en la fase S se eleva ligeramente hasta 7.4 (52).

Se ha mostrado que existen diferencias en muestras consecutivas de un mismo individuo en la duración del ciclo celular (53). Los agentes alquilantes, los plaguicidas y la mayoría de las drogas citostáticas utilizadas en los pacientes con cáncer aumentan la duración del ciclo celular (54-56).

la marca.

iv) Es insensible con células con período intermitótico largo.

b) Citofluorometría

Se obtiene una distribución de las células con diferente contenido de ADN a través del ciclo celular ($2n$, $2(2n)$, $2(2n)$). Esta basado en la citofotometría, que mide el ADN en células fijadas y teñidas con un colorante específico para el ADN y en la microespectrofotometría ultravioleta, en la actualidad con ayuda de la computación y utilizando algún fluorocromo ADN-específico, se pueden medir miles de células que pasan una a una a través de un citómetro de flujo en que el rayo laser con una longitud de onda apropiada hace fluorecer al colorante, el cual es una medida del contenido del ADN, la última innovación a la técnica fue hecha por Latt en 1977, utilizando la incorporación de la bromodeoxiuridina que opaca la fluorescencia del Hoechst 33258 (41-44), obteniéndose mejores resultados y mayor información con el uso de anticuerpos monoclonales y técnicas inmunocitoquímicas.

c) Tinción Diferencial de Cromátides Hermanas.

Esta técnica utilizada en un principio para el estudio de Intercambio de Cromátides Hermanas (ICH), utiliza el análogo del ADN llamado 5-Bromodeoxiuridina (BrdU) el cual se incorpora en lugar de la timina, en el ADN de nueva formación, pudiéndose distinguir las células que han pasado por 1, 2, 3 o más ciclos de duplicación, de esta manera se obtiene un perfil de la cinética de proliferación celular, ya que las metafases pueden

Las células leucémicas de pacientes sin tratamiento muestran un tiempo de ciclo más largo que sus controles (57).

El análisis de los resultados de la Proliferación celular medida por la tinción diferencial con BrdU se ha realizado por diferentes métodos y no se ha estandarizado ninguno, ni para poblaciones "in vivo" ni para "in vitro". Los métodos más conocidos aunque no validados satisfactoriamente son:

- a) El método diseñado por Ditrillaux y Fosse en 1976, el cual se determina gráficamente tomando en cuenta un primer punto de referencia que sería en momento en que el 50% de las células están en 2º ciclo y el segundo punto de referencia sería el momento en el que el 50% de las células están en 3º ciclo (59).
- b) Tice y col. 1979, analizan la distribución de metafases en 1º, 2º y 3º ciclo en diferentes tiempos y toman como duración del ciclo el intervalo de tiempo entre el 50% de metafases en 1º ciclo y 50% de metafases en segundo o entre el 50% de metafases en 2º ciclo y el 50% de metafases en el 3º ciclo y para lo cual diseñaron métodos de análisis computarizados (60,61).
- c) Ivett y Tice en 1982 (62), propusieron analizar la proliferación celular en un punto o varios puntos de la cinética celular para calcular el Tiempo Promedio de Generación, en base a los porcentajes de células que han pasado por uno, dos, tres o más ciclos de duplicación en base al índice de replicación y siguiendo la ecuación:

$$\text{TPG} = \frac{\text{Tiempo de Incorporación de BrdU}}{(1 \times \% 1^\circ) + (2 \times \% 2^\circ) + (3 \times \% 3^\circ \text{ o más ciclos}) / 100}$$

B) INTERCAMBIO DE CROMATIDES HERMANAS.

1.- DEFINICION

Los intercambios de Cromátides Hermanas (ICH) son intercambios simétricos de fragmentos cromosómicos entre las cromátides de un mismo cromosoma, lo cual involucra ruptura, intercambio y reparación entre moléculas de ADN en los loci homólogos en el cromosoma duplicado.

2.- DETECCION

Mc. Clintock en 1938, mientras estudiaba la conducta genética de los cromosomas en anillo del maíz, descubrió el entrecruzamiento (crossing-over) somático, siendo éste el primer hallazgo de intercambio entre cromátides hermanas (63), posteriormente demostrado experimentalmente por Taylor en 1957, en las células de raíces de *Bellavalia romana* utilizando timidina tritiada y autorradiografía (40) Huang en 1967 observó que al utilizar bromodeoxiuridina en un estudio que realizaba para determinar el efecto de algunos carcinógenos, virus y análogos de bases sobre las células embrionarias de rattus natalensis, estas en ocasiones tenían en forma diferente las cromátides hermanas (64). Zakharov y Egolina en 1972, observaron una tinción diferencial de las cromátides en células de hamster chino que habían pasado por dos ciclos de duplicación del ADN en presencia de bromodeoxiuridina (65). Latt en 1973, utilizando el colorante fluorescente Hoechst-33258 logró evidenciar claramente la tinción diferencial en cromátides hermanas en células humanas marcadas con bromodeoxiuridina (BrdU)

(66,67).

Perry y Wolff en 1974, lograron perfeccionar la técnica al permitir visualizar la tinción diferencial de cromátides hermanas, de cromosomas teñidos con Giemsa en forma permanente al microscopio de luz (68). Korenberg y Freedlander en 1974 (69) y Goto y col (70) en 1975 describen técnicas similares usando Hoechst y Giemsa. Actualmente cada laboratorio estandariza su propia técnica, siendo éstas modificaciones de la de Perry y Wolff.

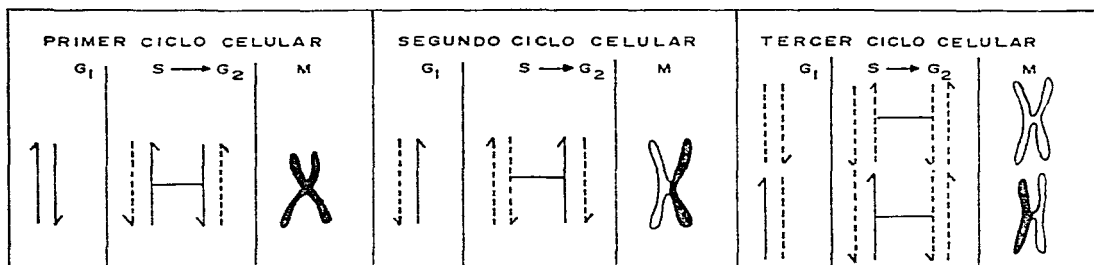
El ICH se visualiza después de dos ciclos de división celular mediante la técnica de tinción diferencial de cromátides hermanas.

El mecanismo de tinción diferencial en las metafases de células que han incorporado BrdU se basa en tres premisas propuestas por Tice y col en 1975 y son:

- 1) La duplicación del ADN se realiza semiconservativamente como el modelo de Meselson y Sthal.
- 2) Cada cromátide esta compuesta por una doble cadena de ADN, es decir, dos hebras.
- 3) Las cromátides o los cromosomas se segregan según las leyes de Mendel en la división celular.

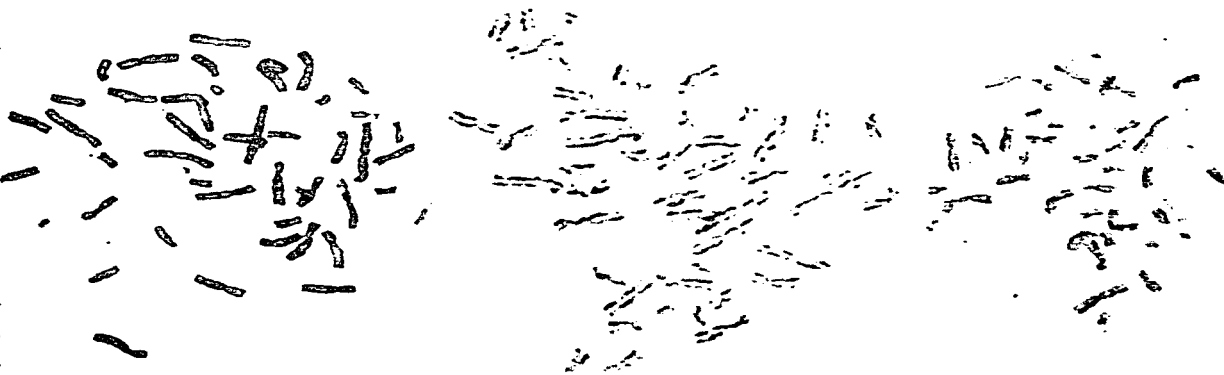
Puesto que el BrdU es un análogo del ADN que tiene la propiedad de opacar la fluorescencia del fluorocromo Hoechst 33258, podremos determinar que cuando las cromátides se encuentran unifilarmente substituidas, el cromosoma flouresce intensamente y el teñirse con Giemsa y aparecer ambas cromátides del cromosoma oscuras la metafase se considera de primera división. Aquellas con una crómátide brillante o en obscuro al ser teñida con

MECANISMO DE FORMACION MOLECULAR PARA LA TINCION DIFERENCIAL DE CROMATIDES HERMANAS POR LA SUBSTITUCION DE BrdU.



Progresión de la célula a través de 3 ciclos celulares en presencia de BrdU. En G₁, S y G₂, las líneas continuas representan una cadena de ADN con timina y las líneas punteadas una cadena de ADN substituída con BrdU. Los cromosomas visualizados en M teñidos con Giemsa, presentan la cromátide oscura, cuando hay una substitución unifilar y la cromátide será clara al tener el ADN una substitución bifilar.

FIGURA. ICH-2



Giemsa (cromátide unifilarmente substituida) y la otra opaca o clara con Giemsa (bifilarmente substituida) será una metafase en segunda división, las metafases con tres cuartas partes de sus cromátides teñidas en claro (opacas o bifilarmente substituidas) y la cuarta parte restante de las cromátides teñidas de obscuro (brillantes y unifilares) serán metafases de tercera división, aquellas con menos de una cuarta parte de cromátides teñidas en obscuro serán metafases en cuarta o más divisiones celulares (figs. ICH₁, ICH₂).

El mecanismo molecular que se ha propuesto para la formación de la tinción diferencial de cromátides, es la fotólisis del ADN en la cromátida substituida bifilarmente, seguida de una desnaturalización del ADN. La fotólisis se puede lograr con la luz solar o con la luz artificial llamada negra de una longitud de onda de 355 nm (71, 72, 73).

3.- MECANISMO DE FORMACION Y SIGNIFICADO BIOLOGICO DE LOS ICH.

El mecanismo de formación y significado biológico de los ICH sigue en discusión.

Wolff y col en 1974 (74,75) observaron que para la formación de los ICH es necesario el paso por la fase de Síntesis del ADN en el ciclo celular y Kato en 1980 (76,77) obtiene evidencias de que es en el momento de la síntesis en que las cadenas del ADN homólogas se encuentran lo suficientemente unidas o inmediatamente después de que se ha formado la bifurcación para la formación de las cromátidas en que se lleva a cabo el intercambio.

Se han propuesto varios mecanismos de la formación para los

ICH, entre los cuales están los siguientes:

a) Modelo de Kato en 1977 (76,77), basado en el modelo de recombinación bacteriana de Holliday, caracterizado por:

i) Rupturas al mismo nivel generadas por reparación o duplicación.

ii) Formación de la estructura de Holliday, en la que es posible un intercambio de doble banda y

iii) Ruptura de las bandas no involucradas en el daño

b) Modelo de Painter en 1980 (75), su mecanismo implica:

i) Daño al ADN, retardando la duplicación.

ii) Los duplicones terminan la síntesis a diferente tiempo a nivel de los agrupamientos que separan unidades de duplicación subsecuentes y permite

iii) La ruptura en la continuidad de la banda parental a nivel de agrupamientos de duplicones

iv) Cuando un duplicón retardado termina de duplicarse se da una asociación aleatoria entre bandas parentales e hijas, con base a estas reasociaciones se produce el intercambio de doble banda.

c) Modelo de Ishii y Bender en 1980 (79), proponen:

Para explicar los ICH espontáneos:

i) Ruptura de las bandas parentales a nivel de la bifurcación del ADN durante la síntesis

ii) Reasociación de la banda hija recién sintetizada

Para explicar los ICH inducidos:

i) Un daño causa la ruptura de una de las bandas parentales. a nivel de la bifurcación del ADN durante su síntesis.

ii) Esta se reasocia con la banda hija recién sintetizada

y de la misma polaridad

iii) Posteriormente puede ocurrir ruptura de la banda parental no dañada cerca del extremo terminal de la banda hija complementaria a la banda parental dañada y continuarse con ella, y se complementa con la banda que tenía el daño. Como puede notarse el modelo permite que se continúe la síntesis del ADN a pesar de la presencia de lesiones y espacios.

d) Modelos tales como el propuesto por Corner en 1984 (80)

Proponen expresiones algebraicas para calcular la frecuencia del ICH en células de 2a. y 3a. división.

Se ha propuesto que los ICH pueden representar más de un fenómeno que pudiera estar relacionado con procesos de reparación del ADN, recombinación somática, ser consecuencia de un error en la replicación normal del ADN o también deberse a algunos procesos de amplificación o diversificación de genes (S1, S2). Pareciera que los ICH en los organismos eucariotes son espontáneos por el hecho de que existe una frecuencia constante de éstos a bajas concentraciones de BrdU y porque existen algunos reportes acerca de que en ciclos celulares diferentes se presenta el mismo número de ICH (S3-S6).

El número basal de ICH por célula de linfocitos humanos varía de 1.4 - 45, siendo las medidas de 4 - 12 las más frecuentemente reportadas. La frecuencia basal de ICH puede ser afectada por factores metodológicos, físicos, biológicos y químicos, alcanzando valores con éstos últimos en condiciones experimentales hasta de 300 ICH por célula, desconociéndose si tal número es el límite del sistema de detección o del número de sitios

en el cual los ICH se presentan (87-89).

El tiempo de almacenaje de la sangre desde la toma al cultivo, la temperatura de incubación (90-95), la manera de conteo de los ICH y la variación del conteo de laminilla a laminilla así como el análisis estadístico de los ICH, son factores metodológicos que pueden afectar el número de ICH o para ser valorados adecuadamente (89,96-99).

La frecuencia de ICH varía con cada medio de cultivo, probablemente por las diferencias de concentración de timidina en ellos (100), también puede alterarse la frecuencia al suplementar los medios de cultivo con diferentes sueros, puesto que su contenido es variable y no bien determinado cualitativa y cuantitativamente (101,102).

Se ha reportado que la frecuencia basal de ICH permanece casi constante con cada uno de los mitógenos comúnmente usados como son la fitohemaglutinina (PHA), concanavalina A (con A), Wistaria floribunda (WFA) y extractos de lentin lectina (LCH-A), pero dependiendo del tipo y concentración del mitógeno el número de ICH puede variar y la cinética de proliferación celular ser alterada (103,104).

La frecuencia de ICH puede ser incrementada en función de la concentración de los antibióticos (105).

De acuerdo al anticoagulante usado, la frecuencia de ICH, la cinética del ciclo celular y el índice mitótico pueden variar, siendo la dextrosa ácido citrato (ACD) y el tetraacetato de etilendiamina (ADTA) los que alteran más significativamente en comparación con la heparina (106).

Se ha demostrado que la BrdU por sí misma induce ICH por

sustitución simple o saturación (107) incrementandose el número de ICH por:

- a) Agentes físicos.- El de mayor inducción es la radiación ultravioleta, la cual forma dímeros de pirimidina, inductores menos efectivos son la luz visible, los rayos X, los rayos gamma y el ultrasonido (108-110).
- b) Agentes químicos.- Los de mayor inducción son los capaces de alquilar el ADN al formar monoductos o espacios en una sola hebra del ADN y propiciar entrecruzamientos, análogos de bases como la Br⁻ y Cl-dU, las enzimas involucradas en la síntesis o reparación, colorantes que se unen al ADN, cafeína, diversos plaguicidas, el tabaco, etc. (79,111-113).
- c) Agentes biológicos.- el número de ICH es afectado in vivo por la integración al genoma de virus e in vitro por la presencia de Mycoplasma fermentans y M. salivarium en cultivos de linfocitos.

La duración del cultivo y la cinética del ciclo celular pueden afectar el número de ICH, presentandose una frecuencia de ICH por célula más baja en cultivos de cosecha temprana y una frecuencia más alta en células de segunda división que los de tercera división (114-116).

La frecuencia de ICH varía entre los diferentes tipos de células, siendo las de menor frecuencia aquellas que se originan en médula ósea y las de mayor las provenientes de intestino y nódulos linfáticos.

Los ICH espontáneos en cultivos "in vivo" tienen una frecuencia menor que los reportados "in vitro" (117,118). Para valorar

Los ICH inducidos por drogas es importante determinar si éstos son de metabolismo directo o indirecto y si requieren de un agente activador (111,120,121).

Existen diferencias basales de ICH entre los cultivos de sangre total, cultivos de leucocitos de plasma y cultivos de leucocitos mononucleares (53,119).

Existen informes contradictorios acerca de la reproductibilidad en cuanto al número de ICH en cultivos repetidos de un mismo individuo y también entre varios (53,122).

La edad, el sexo y la raza aún actualmente esta en controversia como influyen en la frecuencia de ICH (123).

En cuanto a la edad los reportes llegan a ser muy contrastantes con respecto a la frecuencia de ICH. Algunos estudios indican que en condiciones normales la edad no afecta la frecuencia basal de ICH (123-131). Musilova y col han reportado que cuando las células jóvenes y viejas se exponen a agentes químicos inductores de ICH como la MMC (mitomicina C), las viejas tienen una frecuencia menor de ICH en comparación con las jóvenes (131). Wen y Liew (132) no encontraron efecto de la edad en individuos normales no fumadores por debajo de los 70 años, pero el nivel de ICH fue significativamente más bajo en individuos arriba de 70 años o más.

En contraposición a lo anterior, algunos estudios sugieren firmemente que el nivel basal de ICH es bajo en los individuos jóvenes en comparación con los viejos en donde es mayor (122,133-136).

Uno de los estudios más recientes y completo que apoya el hecho de que el ICH varía en función de la edad es el realizado

por Das y col en 1985, en individuos normales sanos de cuatro grupos de edad diferente, comenzando por recién nacidos hasta seniles (133).

Este efecto de la edad ha sido también reportado en cultivo de fibroblastos humanos (123).

4.- LOS ICH COMO INDICADORES DE DAÑO.

Los ICH pueden ser útiles como indicadores de daño ocasionado por agentes físicos, químicos y biológicos ya que es un método rápido, reproducible y que por su sensibilidad se controlan y diseñan cautelosamente todos los pasos metodológicos, hay técnicas de estudio para varios tejidos "in vivo" como "in vitro". para detectar mutágenos indirectos o directos, es decir, que requieren o no de la activación metabólica.

Los ICH pueden servir de apoyo diagnóstico en algunos padecimientos genéticos, entre los cuales pueden citarse al Síndrome de Bloom, en el que existe una frecuencia espontánea alta de ICH y que se incrementa hasta un número de 300 por célula en cultivos tratados con etilmetanosulfonato (137) y también la enfermedad de Xeroderma pigmentosum en la que se ha encontrado que la frecuencia basal de ICH es similar a la de las células normales, pero son más sensibles a la inducción de ICH por la luz ultravioleta y por agentes químicos (138), lo que explica una deficiencia en la reparación por escisión.

Se ha propuesto su utilidad también en la ataxia telangiectasia (139), anemia de Fanconi (140) y para detectar estados preneoplásicos y neoplásicos (141).

C) ABERRACIONES CROMOSOMICAS

1.- ESTRUCTURA DE LOS CROMOSOMAS

La mayor parte del núcleo en interfase lo constituye la cromatina que se observa teñida con colorantes básicos como un material granular y que corresponde a los cromosomas interfásicos. La cromatina esta compuesta por una larga hebra de ADN duplex asociada a proteínas histonas y no histonas, así como a ARN. La cromatina se divide en dos tipos: Eucromatina y Heterocromatina.

La eucromatina en el núcleo interfásico, es el material laxo que se tiñe homogéneamente, poco denso a los electrones y situado al centro del núcleo. Su composición de bases es generalmente de secuencia única y se replica en fase S temprana del ciclo celular, teniendo una transcripción activa.

La heterocromatina se ha definido, como los segmentos cromosómicos condensados en interfase, que muestran heteropicnosis llamativa en profase. que no desespiralizan como el resto del material cromosómico en telofase y cuya replicación es tardía en el período sintético del ciclo celular. Se ha clasificado en dos tipos:

- a) Heterocromatina facultativa, la cual resulta de la inactivación del cromosoma sexual X.
- b) Heterocromatina constitutiva, que se presenta en regiones específicas de todos los cromosomas (42).

Las grandes moléculas de ADN humano se pliegan para mantener el orden dentro del núcleo celular y determinar la actividad de los genes en 46 cromosomas.

FIGURA. AC-1

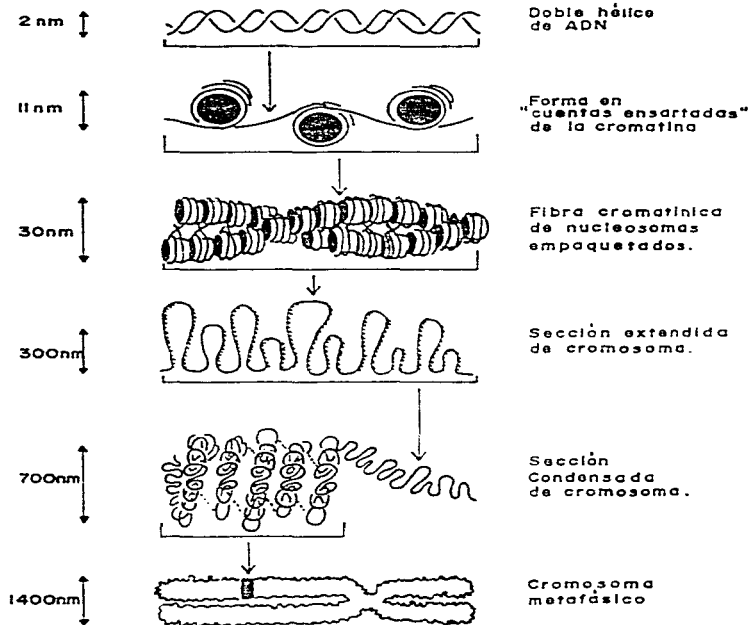


Ilustración esquemática de los numerosos
 órdenes diferentes de empaquetamiento -
 de la cromatina, postulados para el -
 cromosoma metafásico altamente condensado.

En metafase por medio de técnicas citogenéticas de bandeo podemos clasificar a cada uno de los pares de cromosomas por las características estructurales que adoptan por los numerosos empaquetamientos que ha sufrido la cromatina como se muestra en la figura AC₁ (143,144), gracias al cual podemos realizar el cariotipo (fig. AC₂) y analizar los cromosomas metafásicos o premetafásicos para determinar alteraciones o aberraciones cromosómicas de tipo numérico o estructural (145,146).

2.- EL CARIOTIPO HUMANO

Cada célula somática normal de la especie humana tiene cuarenta y seis cromosomas, lo que constituye su número diploide (2n), y que se mantiene constante por el fenómeno de la división llamado mitosis. De los 23 pares, 22 están presentes en las células femeninas y masculinas y se llaman autosomas y el par restante son los cromosomas sexuales o gonosomas, siendo en la mujer XX y en el hombre XY.

Los cromosomas no solamente tienen un número constante en cada especie, sino además una estructura y morfología definida: Mediante el cultivo y cosecha de linfocitos de sangre periférica (y otros tejidos), es posible observar los cromosomas bajo el microscopio durante la metafase, en la cual cada cromosoma consta de dos cromátides unidas por el centrómero. De acuerdo con el tamaño y localización del centrómero los cromosomas se pueden ordenar en siete grupos que se asignan por letras y es posible identificar con precisión por técnica de bandas cada par cromosómico que constituye al cariotipo humano (fig. AC-2).

FIGURA. AC-2

CARIOTIPO MASCULINO NORMAL CON BANDAS DE GIEMSA

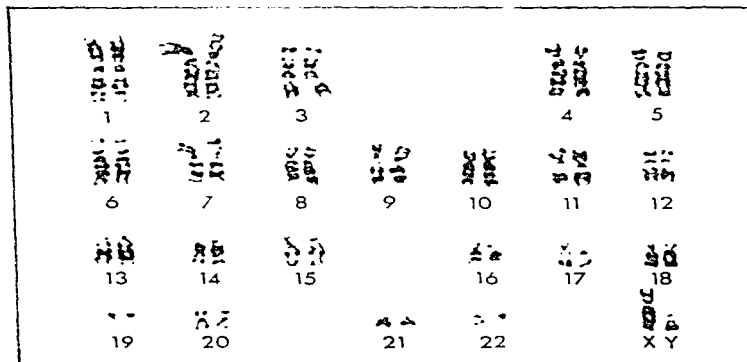
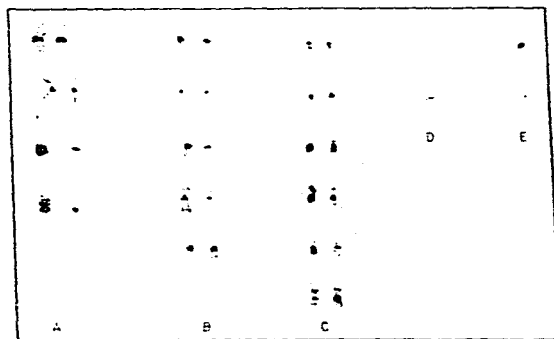


FIGURA. AC-3

POLIMORFISMOS CROMOSOMICOS CON BANDAS C EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE CROMOSOMAS.



3.- VARIANTES O POLIMORFISMOS CROMOSOMICOS.

Existen variaciones en la morfología de algunos segmentos cromosómicos que no necesariamente repercuten en una patología específica. Estas variantes reciben el nombre de polimorfismos, ya que su frecuencia es más elevada de lo que se esperaría sólo por la tasa de mutación recurrente.

Los polimorfismos de la heterocromatina constitutiva pueden ser visualizados por la técnica de bandas C, presentándose en las regiones centroméricas y pericentroméricas de todos los cromosomas, en las constricciones secundarias de los cromosomas 1, 9 y 16, en los brazos cortos y satélites de los acrocéntricos y en la porción distal del brazo largo del cromosoma Y (fig. AC₃).

4.- ABERRACIONES CROMOSOMICAS

A excepción de los polimorfismos de heterocromatina constitutiva, cualquier cambio numérico o estructural de los cromosomas representa una anomalía en el cariotipo y puede traer consecuencias tales como alteraciones fenotípicas, problemas de fertilidad y esterilidad, defectos congénitos, retraso psicomotor, etc.

Las aberraciones cromosómicas son de dos clases: (a) alteraciones del número y (b) alteraciones de la estructura.

a) Aberraciones cromosómicas numéricas.

Las células pueden tener variaciones en el número de sus cromosomas que impliquen múltiplos del número haploide, denominadas euploidías, o cambios en los cuales sólo uno o algunos cromosomas estén involucrados, a las que se conoce

como aneuploidías.

i) Poliploidías:

En las euploidías se repite varias veces el número haploide (n) de 23, por lo que una célula con $3n$ tendrá 69 cromosomas constituyendo la triploidía; si tiene $4n$ tendrá 92 y es tetraploidía; si tiene $5n$ tendrá 115 y será pentaploidía. En general, números mayores al diploide se denomina poliploidías. Dentro de ésta categoría estaría la endoreduplicación, que es el proceso por el cual los cromosomas se duplican sin ocurrir división celular la más común es la que tiene $4n$ y cada una de las 46 unidades cromosómicas presenta 4 cromátides hermanas unidas por el centrómero (AC-4).

Las poliploidías que se han detectado son triploidías y tetraploidías en algunos tejidos como el hígado; triploidías en abortos y algunos óbitos esporádicamente neonatos que mueren pronto y que muy probablemente sean mosaico (2 líneas celulares); en las molas se ha postulado que el producto triploide es a causa de una doble fertilización, como por ejemplo: cuando un óvulo con 46 cromosomas, por no haber eliminado el corpúsculo polar (diginia) es fecundado por un espermatozoide normal de 23 cromosomas, o cuando un óvulo normal es fecundado por un espermatozoide de 46 (diandria) o cuando un óvulo normal tiene una doble fertilización (dispermia).

ii) Aneuploidías:

Son las más conocidas por sus repercusiones como origen de las malformaciones congénitas al nacimiento. Se presentan

FIGURA. AC-4

E N D O R R E D U P L I C A C I O N

1er. CICLO CELULAR			2o. CICLO CELULAR			
G ₁	S → G ₂	M A-T	G ₁	S → G ₂	M A-T	



como resultado de una no separación cromosómica (no disyunción) o por rezago de un cromosoma durante la anafase de la división celular. Estas fallas pueden presentarse en mitosis o en meiosis, pudiendo ocurrir en la meiosis I o en la II y por supuesto en la ovogénesis o espermatogénesis (fig. AC-5).

Las aneuploidías más importantes son:

Trisomía.- Cuando hay un cromosoma adicional como el síndrome de Down o trisomía 21 (fig. AC-5a). Pueden existir dobles trisomías.

Monosomía.- Si falta un cromosoma, como el síndrome de Turner, 45, X. (fig. AC-5b).

Tetrasomías.- Los dos cromosomas adicionales son del mismo par, por ejemplo, cariotipo 48, XXXX.

b) Aberraciones cromosómicas estructurales.

En esta clase se agrupan todos aquellos cambios en la estructura normal de cualquier par o pares cromosómicos causados por agentes físicos, químicos o biológicos como el virus. Existen mecanismos de reparación celular que tratan de subsanar el daño, pero éste puede ser tan grave o los mecanismos de reparación no ser tan eficientes, que se produzcan las alteraciones estructurales.

Las alteraciones más importantes son:

- i) Deleción.- Es la pérdida de un segmento de la estructura y puede ser terminal o intercalar, si la deleción ocurre en los dos extremos se puede formar un cromosoma en anillo.
- ii) Duplicación.- Cuando un segmento o una misma secuencia de genes aparece en forma doble en el mismo cromosoma.

- iii) Inversión.- El cromosoma se rompe en dos sitios y el segmento rota 180° sobre sí mismo quedando la secuencia de genes invertida y por lo tanto alterada. La inversión paracéntrica si el segmento no incluye el centrómero o pericéntrica si el centrómero queda incluido.
- iv) Translocación.- Es el intercambio de segmentos entre cromosomas homólogos o no homólogos.
- v) Isocromosomas.- Se forma cuando el centrómero en vez de dividirse longitudinalmente lo hace en forma transversal. La citogenética tiene cada vez mayor utilidad para estudiar el efecto de sustancias carcinogénicas y mutagénicas valorando la presencia de aberraciones cromosómicas numéricas o estructurales de las ya descritas o tomando en cuenta algunas otras como son:
 - vi) Cromosomas dicéntricos.- Posee dos centrómeros, puede resultar de una translocación de dos cromátides de un mismo cromosoma y por translocación entre cromosomas homólogos o no homólogos.
 - vii) Fragmentos.- Son porciones de cromosomas rotos que no tienen centrómero y usualmente se localizan en posición cercana del cromosoma al que pertenecían.
 - viii) Fracturas.- Porciones de cromosomas rotos desplazados de su origen.
 - ix) Minútes.- Pequeños fragmentos cromosómicos de origen desconocido.
 - x) Brechas o gaps.- Son porciones no teñidas de una cromátide, probablemente a causa de una descondensación o cambios ADN-proteína.

xi) Isobrechas o Isogaps.- Porciones no teñidas a la misma altura de ambas cromátidas.

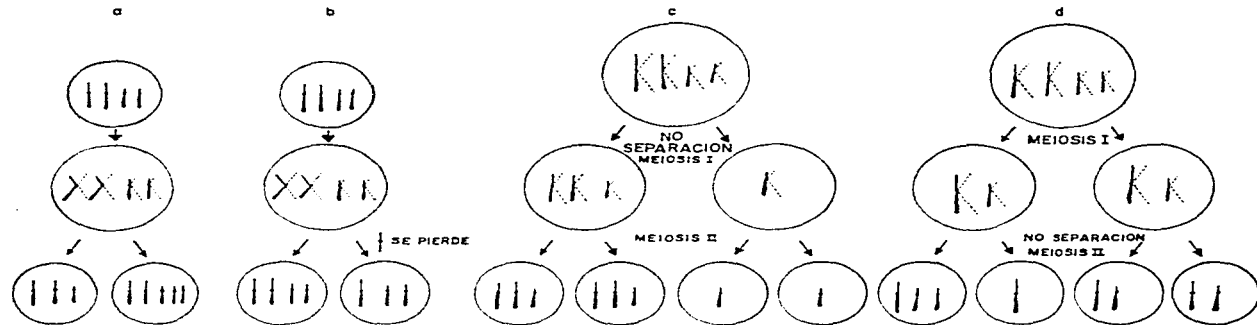
El mecanismo de producción en general de éstas aberraciones se muestra en las figuras AC-6, AC-7 y AC-8 y pueden ocurrir en la etapa G_1 del ciclo celular (147, 148) dónde los cromosomas se encuentran en forma monocromatídica o en la etapa G_2 en cromosomas dicromatídicos.

Otro tipo de alteraciones en los cromosomas pueden ser:

- i) Condensación cromosómica prematura.- Puede involucrar uno o pocos cromosomas del genoma completo.
- ii) Pulverización.- Por una condensación cromosómica prematura en la fase de síntesis del ADN.
- iii) Descondensación cromosómica.- Involucra generalmente solo algunas regiones del cromosoma.

FIGURA. AC-5

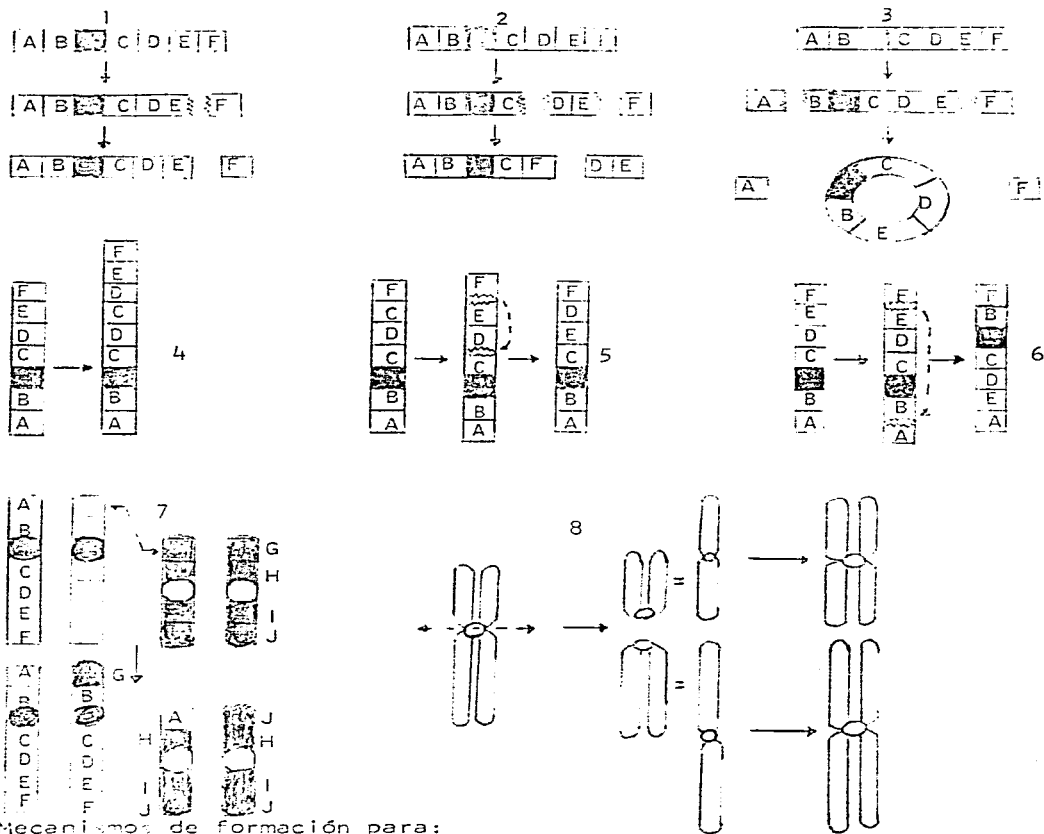
ORIGEN DE LAS ABERRACIONES CROMOSOMICAS NUMERICAS ANEUPLOIDES.



- a). NO DISYUNCION MITOTICA
- b). REZAGO ANAFASICO EN MITOSIS
- c). NO SEPARACION CROMOSOMICA EN MEIOSIS I
- d). NO SEPARACION CROMOSOMICA EN MEIOSIS II

Figura AC-6

ABERRACIONES CROMOSOMICAS ESTRUCTURALES



Mecanismos de formación para:

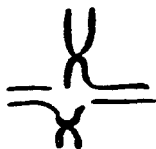
1. Deleción terminal
2. Deleción intercalar
3. Anillo formado por deleción intercalar
4. Duplicación
5. Inversión paracéntrica
6. Inversión pericéntrica
7. Translocación
8. Isocromosoma

47

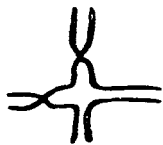
1.3 REARREGLOS
CROMATIDICOS
INTERCROMOSOMICOS



ASIMETRICO



SIMETRICO



DICENTRICO COMPLETO



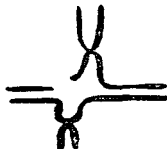
DICENTRICO INCOMPLETO



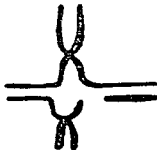
FRAGMENTOS CROMATIDICOS Y
DICENTRICO INCOMPLETO



TRANSLOCACION
COMPLETA

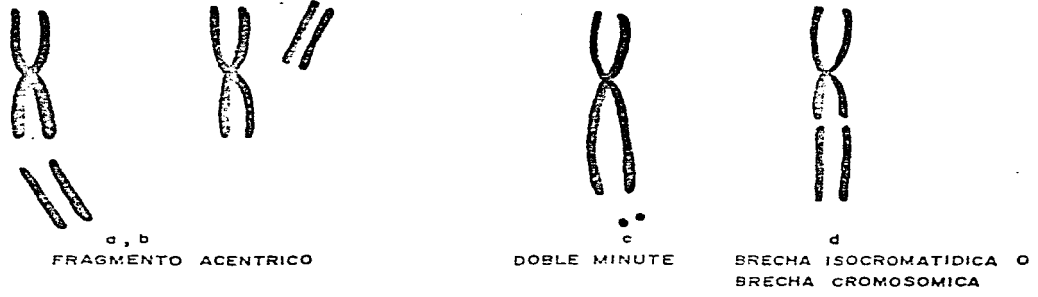


TRANSLOCACION
INCOMPLETA

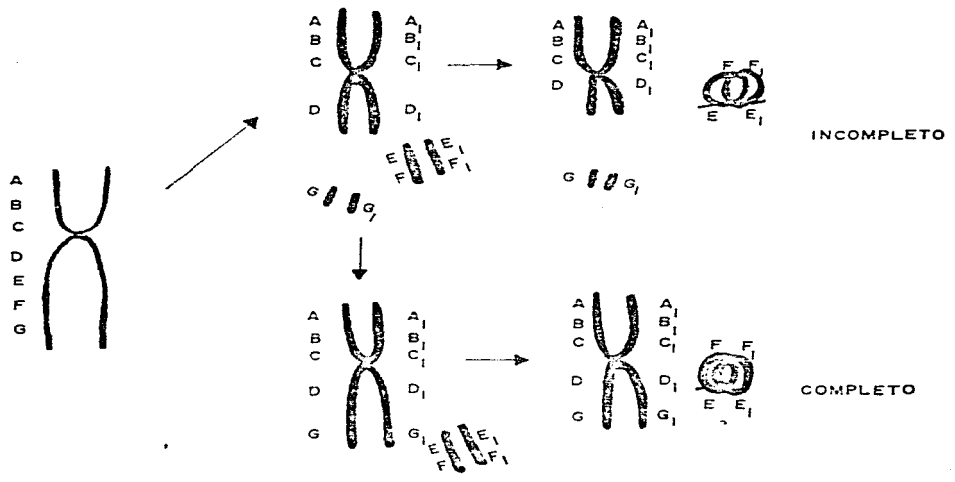


TRANSLOCACION
INCOMPLETA

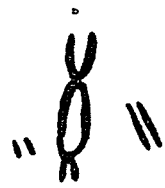
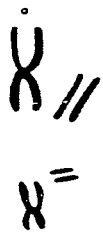
FIGURA. AC-8 ABERRACIONES TIPO CROMOSOMICO
2.1 RUPTURAS CROMOSOMICAS Y BRECHAS



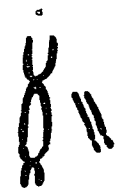
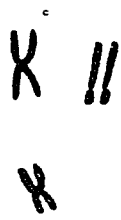
2.2 INTERCAMBIOS INTRACROMOSOMICOS



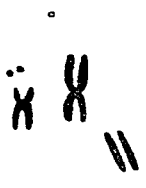
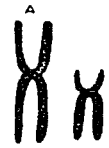
2.3 INTERCAMBIOS INTERCROMOSOMICOS



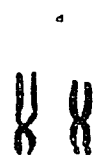
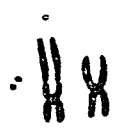
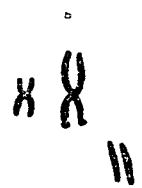
a,b,c INCOMPLETO



d COMPLETO



a,b,c INCOMPLETO



d COMPLETO

D) ETAPAS DEL DESARROLLO

Las etapas o los años de crecimiento y desarrollo están divididos en períodos basados en las características físicas y psicológicas. Estos períodos no están bien delimitados, sino que cada uno de ellos se adentra imperceptiblemente en el que sigue. Además existen distintas variaciones dentro de la normalidad, en el modo de transición.

El crecimiento y desarrollo físico incluye las modificaciones en el crecimiento, organización y diferenciación del organismo desde aquellos que tienen una significación molecular en la vida prenatal hasta las complejas modificaciones metabólicas que acompañan al individuo hasta su vejez.

La vida prenatal se caracteriza por la organogénesis y morfogénesis cuyo rasgo principal es el crecimiento diferencial de diversas partes en distinto momento, coordinado con diferenciación y especialización de las diversas células y clonas celulares. Por otro lado, la tendencia al crecimiento debe cesar en un momento dado, o cuando el órgano alcanza un determinado volumen. Durante este fenómeno las células adquieren diferencias estructurales, funcionales, bioquímicas e inmunológicas a pesar de contar con la misma dotación genética, gracias a la organización molecular y a los mecanismos de regulación que posee cada célula, lo que permite ser capaz de recibir mensajes, obedecer órdenes y "saber" que funciones se realizan a su alrededor y cuáles no debe efectuar.

El crecimiento se mantiene como una función de muchos tejidos del adulto, manifestándose en actividades regenerativas y

en el ⁱreemplazamiento programado de células en constante proliferación. Si bien algunos de estos procesos son actividades de mantenimiento, puesto que no hay un incremento neto en el tamaño del tejido o de su masa, en lo fundamental, el crecimiento esta acompañado por cambios que resultan, ya sea en aumento en el número de células (hiperplasticidad) o por un aumento en el tamaño celular (hipertrofismo).

El proceso de diferenciación celular en la vida post-natal muestra una estrategia, la cual permite que se verifique una secuencia armónica durante el desarrollo del organismo humano, esto es ser niño, adolescente, joven, adulto y senil.

ETAPA DE LA NIÑEZ

Comprende desde el período de recién nacido a 12 años.

En el recién nacido el largo total, que varía de 45 a 55 cm., aproximadamente, está representado en una cuarta parte por la cabeza y lo demás en partes aproximadamente iguales, por el tronco y las extremidades. En un niño de 5 años, la estatura puede variar de 1 a 1.5 m. representando la cabeza la octava parte del largo total y las extremidades más de la mitad del resto. Estas modificaciones en proporción similar a las del adulto, no son más que la continuación de un proceso que comenzó en el claustro materno (en el feto, la cabeza crece más rápidamente que el tronco y extremidades).

El desarrollo puberal empieza de los 8 a los 12 años, siendo más temprano en las niñas que en los niños.

ETAPA DE LA ADOLESCENCIA

Comprende el período de edad de los 13 a los 18 años.

En la adolescencia, el ritmo de crecimiento en las diversas partes del cuerpo y la aparición de caracteres sexuales secundarios varían en los dos sexos, aumentando la armonía de proporciones corporales al final de esta etapa de la adolescencia y originando las diferencias características de los dos sexos.

ETAPA DE LA JUVENTUD

Va de los 18 o 20 años a los 30.

En esta etapa, en el período de edad entre los 18 a 30 años el hombre alcanza su máxima capacidad física, llega a su máximo el crecimiento estatural, se alcanza la máxima eficiencia en todas las actividades que requieren habilidad y rapidez; siendo el período óptimo para la reproducción.

En los jóvenes predominan los procesos anabólicos, a diferencia de los ancianos en que se tornan proporcionalmente más importantes los procesos degenerativos que llevan a la disminución de las actividades químicas y de la elasticidad de los tejidos de todo el organismo.

ETAPA DEL ADULTO

Puede considerarse de los 30 a los 50 años.

Alcanzando el vértice de la parábola, el hombre empieza en un punto no bien determinado de su cuarto decenio, a recorrer el tramo descendente. Los procesos de crecimiento dejan de producir efectos evidentes y aparecen las primeras señales

de envejecimiento. En realidad el crecimiento no se detiene, continúa durante toda la vida, mientras que el envejecimiento y la muerte celular actúan desde el nacimiento (149-154).

ETAPA DE LA SENILIDAD. VEJEZ O ADULTO MADURO.

Los criterios de admisión para protocolos de estudio sobre envejecimiento consideran una edad de 65 años (155), aunque como se dijo antes, este proceso puede acelerarse y un individuo presentar características de senil a una edad más temprana. El género humano aún no sabe con exactitud cuáles son los límites de su propia vida. Tampoco puede asegurarse que algún día lo sepa, pero sin duda seguirá siendo una de las preocupaciones centrales de la existencia. Actualmente el mejor promedio de vida se halla en los países escandinavos y en Japón: 79 años para las mujeres y 74 para los hombres. En el libro de los récords de Guinness figura el japonés Izumi, quien vivió hasta los 119 años. Pero el mayor número de longevos se encuentra en la URSS, donde se calcula que unas 20 mil personas sobrepasan el siglo de edad. En México la edad promedio límite se calcula en los 60 años.

E) ENVEJECIMIENTO

1.- DEFINICION

Entre las investigaciones más relevantes de la humanidad, se encuentra lo concerniente a los problemas involucrados en el envejecimiento como parte del entendimiento de la naturaleza humana y a la conservación de la salud.

En la generalidad de los organismos vivientes, los procesos de envejecimiento, se caracterizan por su universalidad, por su iniciación y aceleración que tienen lugar durante etapas determinadas de la vida en las poblaciones de una misma especie, son además, progresivos y no reversibles en condiciones naturales.

El envejecimiento es un proceso gradual de deterioro, que se acompaña en general por modificaciones estructurales y fisiológicas en la mayor parte de los sistemas de órganos. (156)

2.- HIPOTESIS DEL PROCESO DE ENVEJECIMIENTO

El proceso de envejecimiento es sumamente complejo e intervienen en él muchos factores, de ahí que las múltiples teorías que en apariencia pudieran parecer contradictorias no se excluyen mutuamente. La investigación gerontológica verifica hipótesis intentando determinar cuáles son válidas y cuáles ofrecen mayores promesas de llegar a comprender el envejecimiento y "combatirlo".

El envejecimiento puede visualizarse en los individuos, tiene su expresión a nivel celular, pero es claro que los eventos iniciales que conducen al deterioro de un organismo con el

transcurso del tiempo ocurren a nivel molecular. Las diferentes teorías propuestas para explicar el envejecimiento incluyen como componentes el genético y el ambiental (157, 158) y difieren en lo que se refiere a defectos genéticos intrínsecos o acumulación al azar de mutaciones somáticas.

Las principales hipótesis del envejecimiento basadas en las propiedades de las moléculas portadoras de la información genética son:

- i) Hipótesis sobre la existencia de "errores catastróficos" (159). Propone que con el tiempo, la información transmitida en los procesos de transcripción y traducción podría estar sujeta a un número progresivamente mayor de errores que conducen a un declive de la capacidad funcional celular. No hay pruebas adecuadas para sostener dicha hipótesis, en cambio se puede hablar con base en investigaciones confirmadas de la disminución de la capacidad para la reparación del ADN en cultivos de células normales a medida que se aproximan al límite de su capacidad de replicación.
- ii) Se ha propuesto una 2a. hipótesis, basada en que la redundancia del ADN podría proporcionar un mecanismo protector, reemplazando por un gen idéntico a un gen activo dañado a causa de accidentes moleculares. Al final, sin embargo, todos los genes repetidos serían utilizados, los errores se acumularían y las deficiencias fisiológicas determinantes del envejecimiento irían apareciendo.
- iii) La tercera hipótesis del envejecimiento propone que

los cambios producidos por la edad son simplemente una continuación de las señales genéticas normales que regulan el desarrollo. Supone incluso la existencia de genes de envejecimiento que frenarían vías bioquímicas de forma secuencial y conducirían a una expresión programada de los cambios propios del envejecimiento (156-164).

3.- EVIDENCIAS DEL COMPONENTE GENETICO EN EL ENVEJECIMIENTO.

i) Existen evidencias en el humano, que sugieren que la longevidad tiene una base genética, algunas de ellas son:

- a) Cada especie muestra un período de vida medio y máximo, lo que implica factores genéticos. Una explicación a este fenómeno reside en los genomas, ya sea por el contenido de programas genéticos diferentes, o bien por diversos grados específicos de mutabilidad.
- b) Hay correlación positiva entre el período de vida máximo de los progenitores y la de sus descendientes.
- c) Los gemelos monocigotos tienen un período de vida más similar entre sí que el de los dicigotos, quienes a su vez tienen mayor semejanza en su período de vida máximo que con los individuos de una población aleatoria. Las causas de muerte en gemelos monocigotos son similares en una proporción dos veces mayor que en los gemelos dicigóticos, aunque se desarrollen en condiciones ambientales diferentes.
- d) Las mujeres viven más tiempo que los hombres, aunque no parece estar involucrado con genes ligados al sexo en la determinación de la longevidad, pero sí con la expresión

influenciada por el sexo.

- e) Existen enfermedades hereditarias que disminuyen significativamente la duración máxima de vida, como son la progeria, la enfermedad de Werner, el síndrome de Cockayne, el síndrome de Rothmund-Thompson, la distrofia miotónica, etc.

ii) Se ha informado que "in vivo" existe de acuerdo con la edad:

- a) Aumento en el número de rompimientos cromosómicos y aneuploidías.
- b) Senectud prematura en los pacientes de síndrome de Turner, Down y Klinefelter.
- c) Aumento espontáneo de isoanticuerpos específicos.
- d) Las principales proteínas fibrosas del tejido conectivo, que son la colágena, elastina y reticulina presentan alteraciones en su composición y en sus propiedades produciendo efectos observables en el organismo relacionados con el envejecimiento (fibrosis arteriocapilar, arterioesclerosis, hipertensión, etc.).
- e) Una de las alteraciones celulares más generales que se relacionan con el envejecimiento son los gránulos de lipofucsina, los cuales constituyen el llamado "pigmento del envejecimiento", al parecer derivados de los procesos de desecho en el citoplasma. Su acumulación guarda una relación cuantitativa con la edad, ya que está ausente en individuos jóvenes, pero se encuentra casi sin excepción en el corazón de sujetos envejecidos sin enfermedad cardiaca, lo que hace que se considere un proceso básico en el envejecimiento (161-163).

iii) Los hallazgos "in vitro" realizados con linfocitos y fibroblastos han demostrado la existencia de cambios asociados con la edad tales como las siguientes:

- a) Los fibroblastos diploides de origen humano presentan un número finito de divisiones, degenerando o perdiéndose las células al final del cultivo (164). La declinación celular y la mayor edad asociada incrementan el número de aberraciones cromosómicas (165), acompañados por otros cambios en el metabolismo del ADN como el retardo en la velocidad de reparación por escisión y la elongación de la cadena en el templete de cromatina activa y en la fidelidad de la ADN polimerasa (166).
- b) Todo cultivo empieza con "células no comprometidas" con el proceso de senectud, pero al cabo de cierto número de subcultivos éstas se comprometen con el proceso.
- c) Cuando un tejido comienza a volverse senil acumula enzimas termolábiles (163, 167, 168).
- d) Las poblaciones de células de seniles son diferentes a las de los jóvenes, ya que muestran una disminución en el porcentaje de células que sintetizan ADN y aumentan su tiempo de ciclo celular (169).
- e) El número de aberraciones cromosómicas encontrados en subcultivos de fibroblastos de pacientes con síndrome de Down, síndrome de Bloom y anemia de Fanconi se correlacionan con los datos epidemiológicos acerca de un aumento de enfermedades neoplásicas y mayor susceptibilidad a la transformación viral conforme avanza la edad.
- f) Un incremento de aneuploidías en los cultivos de linfocitos

de individuos seniles ha sido informado por algunos autores y se ha demostrado la pérdida preferencial del cromosoma X inactivo en mujeres a medida que aumenta la edad (170). Por otra parte existen evidencias convincentes de que la inactivación del cromosoma X está relacionado con la metilación diferencial de citosina en los dos X y que un gene silencioso de un cromosoma X inactivo puede reactivarse al fallar la metilación, siendo una activación indeseable que puede causar envejecimiento (171, 172).

- g) La sensibilidad a la inducción de ICH se incrementa con la edad (173).
- h) Se ha comprobado "in vitro" que las enfermedades con envejecimiento prematuro muestran en sus poblaciones celulares un menor número de divisiones celulares (174).

4.- CAMBIOS EN LOS LINFOCITOS RELACIONADOS CON LA EDAD.

El reloj biológico del cuerpo se encuentra en el hipotálamo. Esta porción del cerebro contiene centros claves de control para numerosas funciones corporales, que secretan una amplia variedad de hormonas que controlan y coordinan a otras glándulas relacionadas con el proceso de envejecimiento como es la pituitaria (175), cuya extirpación en ratas viejas parece rejuvenecerlas si al mismo tiempo se les administra dosis de la hormona del tiroides. Otra glándula endocrina que tiene que ver con el envejecimiento es el timo, el cual desempeña un papel clave en las defensas inmunológicas del organismo. Alcanza su mayor tamaño y grado de actividad al principio de la vida, atrofiándose gradualmente con la edad. Su involución

comienza en la madurez sexual y termina alrededor de los 50 años en el humano (176, 177, 178).

El timo actúa como órgano endocrino y como sitio de diferenciación celular.

En el timo se sintetizan diversas hormonas polipeptídicas que se liberan hacia la sangre; estas hormonas son importantes en la diferenciación de linfocitos pretímicos y postímicos; entre los péptidos de timosina reportados se encuentran los que estimulan la liberación de neuropéptidos, hormona de crecimiento, prolactina y beta-endorfina, la timosina α 1 en unión con antígenos apropiados y/o lectina; es un potente inductor de un número de linfoquininas entre las cuales se encuentra la IL-2.

En el ser humano, la concentración de hormonas tímicas en el suero se mantiene hasta los 20 o 30 años de edad y después disminuye su concentración.

Lo anterior y los hechos de que la timectomía apresure el comienzo de los cambios relacionados con la edad en animales de laboratorio, que los timocitos jóvenes o las hormonas tímicas pueden aumentar la reacción de anticuerpos IgG, IgE y de anticuerpo de alta afinidad en ratones viejos, señalan la aportación de la involución tímica a la senescencia inmunitaria (179).

Los linfocitos de médula ósea entran en la corteza del timo. Con la edad disminuye este paso de linfocitos inmaduros de la médula ósea al timo (180). Aunque al avanzar los años llegan menos linfocitos inmaduros al timo, aumenta el porcentaje de linfocitos inmaduros dentro de esta glándula (181), pareciendo

que ésta pierde capacidad para diferenciar linfocitos inmaduros. Los linfocitos T inmaduros que conjugan eritrocitos autólogos, aumentan en los ancianos (182). En consecuencia, la incapacidad del timo para sostener la diferenciación de los linfocitos inmaduros se manifiesta por aumento del número de ellos en la glándula y en la sangre periférica.

Existe controversia en cuanto a que si se modifica con la edad el número total de linfocitos y el número en subpoblaciones de linfocitos T ó B en la sangre periférica del ser humano. Debe destacarse que en todos los estudios se han hecho análisis cuantitativos de los linfocitos de un número único o limitado de compartimientos linfoides. Ello es importante, ya que existe una redistribución significativa de los linfocitos según la edad. Por ejemplo, con la edad disminuyen los centros germinativos de los ganglios linfáticos y aumentan las células plasmáticas y los linfocitos en la médula ósea. Por este motivo, el número de linfocitos en cualquier compartimiento quizá no manifieste el complemento total de linfocitos en el organismo. También es posible que, aunque el número de linfocitos no se modifique con la edad, estas células de vida duradera circulen en estado postmaduro, esto es, que sean viables pero que carezcan con capacidad de duplicación necesaria para la competencia inmunitaria.

En la sangre periférica de ancianos se ha informado un aumento de linfocitos T inmaduros (183), T gamma (184), T auxiliares o inductores identificados por el anticuerpo monoclonal OKT4, en tanto que disminuye el número de linfocitos T supresores o citotóxicos identificados por el anticuerpo monoclonal

OKT8 (183).

En cuanto a las enzimas presentes en los linfocitos, se ha informado que a mayor edad aumenta la adenilatociclasa linfocítica y disminuye la guanilatociclasa (185). Se ha advertido una disminución en la actividad enzimática de la exto-5'-nucleotidasa en linfocitos de ancianos y algunos estados de deficiencia inmunológica (186).

La concentración total de inmunoglobulinas en el suero se modifica poco con la edad, pero si cambia la distribución de clases de inmunoglobulinas, se ha reportado en individuos de edad avanzada concentraciones séricas de IgA e IgE aumentadas y disminuidas las de IgM (182, 187).

La disminución de los anticuerpos naturales para determinantes extraños que ocurre con la edad se acompaña de aumento de autoanticuerpos e inmunoglobulinas monoclonales (188, 189). Se ha reportado en el suero de ancianos autoanticuerpos para ácidos nucleicos, músculo liso, mitocondria, linfocitos, células parietales gástricas, inmunoglobulina y tiroglobulina (187).

La disminución funcional de los linfocitos T en sujetos ancianos pudiera guardar relación con la menor capacidad para producir y conjugar factor de crecimiento de células T (190), aunque la reacción de proliferación de linfocitos T no aumenta por el factor de crecimiento exógeno de células T.

Cuando se compara la reacción de proliferación de células T y células B, en la mayor parte de los informes el defecto de las células T es mayor que el de las células B.

En cuanto a lo macrófagos se necesitan para la presentación

de antígenos, la proliferación de linfocitos, fagocitosis y la síntesis de anticuerpos, en varios estudios se ha informado que el número de ellos, su capacidad para sostener la proliferación de linfocitos y su capacidad para procesar antígenos no se modifican con la edad (191).

La inmunidad mediada por células depende de la integridad funcional de los linfocitos que dependen del timo. Como la involución tímica es acompañamiento general del envejecimiento, en muchos estudios de la senescencia inmunitaria se han investigado las funciones de los linfocitos T con la edad. Los ancianos presentan reacciones de hipersensibilidad tardía menos intensas a antígenos corrientes de dermoreacción que los individuos jóvenes (192), esto pudiera manifestar una reacción modificada al desafío antigénico, pérdida de memoria inmunológica o ambos factores.

La reacción de proliferación de linfocitos T "in vitro" de sujetos ancianos presenta una respuesta modificada a mitógenos de linfocitos T (187).

El defecto de proliferación observado en cultivo de linfocitos de seres humanos ancianos no puede explicarse por deficiencia del número de linfocitos T, puesto que la reacción alterada de proliferación permanece en preparados purificados de linfocitos Y en individuos de edad avanzada.

Se ha demostrado que los iones calcio son importantes en la activación celular y se ha informado que ésta junto con otros procesos dependientes de calcio exhiben un deterioro relacionado con la edad.

Se ha descubierto que los preparados de linfocitos T de seres

humanos ancianos contienen sólo un 20 al 50 % de células que reaccionan a mitógenos en comparación con los procesos de jóvenes (193). No manteniéndose la capacidad para dividirse sucesivamente, al cabo de 96 horas de cultivo con fitohemaglutinina, el número de linfocitos de ancianos que se dividieron por tercera vez sólo fue el 25 % en relación con los cultivos de jóvenes, el número que se dividía por segunda vez era el 50 %, pero en número de células que se dividían por vez primera fue semejante en cultivos de jóvenes y viejos.

Por último, sea la senescencia inmunitaria contribuyente primario o secundario a la patología del envejecimiento, es probable que los mayores conocimientos del envejecimiento inmunitario y la mayor capacidad para corregir los defectos inmunitarios que ocurren en los ancianos den la oportunidad de un mejor control de las enfermedades del envejecimiento, no para prolongar la vida, sino para mejorar la calidad de ella mientras estemos "disfrutando" (194).

F) SINDROME DE HUTCHINSON-GILFORD O PROGERIA (HGPS).

El síndrome de Hutchinson-Gilford o progeria (HGPS) es uno de los desórdenes de envejecimiento prematuro congénito y el mejor conocido debido principalmente a la semejanza que tienen los niños que lo padecen con individuos de edad avanzada. Jonathan Hutchinson fue el primero en describirlo en 1886, resaltando en el título la "ausencia congénita de cabello" (195). Este primer paciente y un segundo que reportó en 1885 fueron reexaminados por Gilford en 1897 y 1904, quien describió los cambios patológicos de la enfermedad y propuso el término de "progeria" para el síndrome (196). Subsecuentemente otros 75 pacientes han sido reportados (197-200) y algunos estudios específicos comparan los mecanismos del envejecimiento natural con el prematuro (201-202).

La incidencia estimada de HGPS es de aproximadamente de 1 x 4 a 8 millones de nacidos vivos con una relación de sexo de 2:1 masculino/femenino (199-200), no hay características raciales o distribución geográfica, sin embargo, ningún paciente ha sido reportado en China o Australia. El Registro Internacional de Progeria incluía en 1985 cerca de 20 personas afectadas viviendo en el mundo (202).

En la progeria la duración máxima de vida disminuida, ocurriendo la muerte de los 7 a los 27.5 años, con una edad media de 13.4 años (199). El único caso reportado en la literatura como progeroide con una sobrevida de 45 años ha sido un paciente japonés. Generalmente éstos pacientes mueren en la segunda década de su vida por un desorden cardiovascular debido a

arterioesclerosis prematura o infarto del miocardio (203). La etiología de este síndrome es desconocida, la ocurrencia familiar de HGPS entre los pacientes sugiere ser de naturaleza genética, sin embargo el modo exacto de herencia no es claro, ya que la mayor parte de los casos son esporádicos. Hay cierta inclinación por describirla con un patrón de herencia autosómica recesiva, lo cual es apoyado por los estudios en dos familias, cada una de las cuales reportan dos hermanas con hijos afectados (200, 203-207). También se ha propuesto un patrón de herencia autosómico dominante debido a una mutación germinal de novo dependiente de la edad paterna (199, 208, 209).

La literatura describe como características invariables del síndrome: Falla en el crecimiento o baja talla, enfermedad vascular profunda y función celular anormal (199). Otras características clínicas reportadas son: Alopecia, facies anormal de características de un individuo de edad avanzada, micrognatia, cavidades orbitales pequeñas simulando ojos prominentes, tejido subcutáneo disminuido, piel seca y delgada y mala dentición (200).

Entre los resultados de pruebas especiales realizadas a algunos sujetos con progeria podemos mencionar: Diámetro exagerado en el canal auditivo externo, niveles de testosterona en plasma bajos, la bioquímica sanguínea, el estudio de función tiroidea, la determinación urinaria, el electroencefalograma y la prueba audiométrica son normales. La radiología ha mostrado hipoplasia marcada de huesos faciales, desproporción craneofacial, cierre tardío de fontanela anterior, clavículas hipoplásicas con áreas de reabsorción, coxa valga (199, 210).

A través de estudios con fibroblastos y linfocitos el HGPS ha sido conocido y comparado molecularmente y citológicamente con el envejecimiento natural, entre los hallazgos informados tenemos:

En el HGPS existen al igual que en el envejecimiento natural anomalías en las fibras de colágena y elastina (211-213). Expresión elevada de protooncógenes como c-myc, no habiendo diferencias significativas con c-erbB o c-src (214).

En fibroblastos de pacientes con HGPS y fibroblastos de sujetos sanos controles en edad se han determinado los efectos de factores de crecimiento que median la proliferación celular como son: Factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), plasma pobre de plaquetas (PPP) y suero fetal de bovino (FBS). Se ha encontrado solo diferencia significativa en la respuesta de proliferación con PDGF lo cual es más baja en los pacientes con progeria (174). Existe una sensibilidad menor en células de fibroblastos de individuos de edad avanzada y en pacientes con progeria a la preparación de factores con actividad insulínica de plasma humano (ILA), decreciendo la síntesis de ADN con la edad "in vitro" (191,215).

Las poblaciones de células de fibroblastos en cultivo de HGPS tienen un promedio de generaciones o una duración máxima de vida (DMV) menor a la de las células de individuos sanos controles en edad (210,216) y similar a fibroblastos de individuos seniles (164,165).

Se ha demostrado un incremento en la fracción de enzimas lábiles al calor y otras proteínas alteradas en fibroblastos

de HGPS (217-219) como el envejecimiento natural (167).

Algunos de los estudios en linfocitos que se han realizado en los individuos con progeria informan que:

Tienen una porción alta de los subgrupos de linfocitos T de OKT4 y bajo el de OKT8.

La respuesta de proliferación de linfocitos medida por la incorporación de timidina tritiada a mitógenos tales como fitohemaglutinina, concanavalina A y Pokeweed fue reducida con respecto a los controles.

En cuanto a los niveles de inmunoglobulinas plasmáticas (IgA, IgM, IgG) determinadas por electroforesis se ha reportado incremento en IgA (210).

En los casos en que se ha realizado cariotipo este ha sido normal, lo mismo que su patrón de bandas, no existen estudios de frecuencia basal o inducida de aberraciones cromosómicas (174,210).

Un solo informe en la literatura trata de la frecuencia basal e inducida de ICH por mitomicina-C en linfocitos de sangre periférica, el cual fue realizado en tres pacientes con progeria, no habiendo diferencias significativas entre el grupo de pacientes y sus controles normales (220).

V. MATERIAL Y METODOS

Se estudió un grupo de tres pacientes en edad pediátrica que presentaban envejecimiento prematuro o síndrome de progeria, dos de sexo femenino y uno de sexo masculino, cuyo promedio de edad fue de 7.6 años y un rango de 5 a 13 años; seis niños normales con un promedio de edad de 6.7 años y un rango de 4 a 13 años, la relación de sexos fue de 4 femeninos y 2 masculinos; diecisiete jóvenes con un promedio de edad de 29.7 años y un rango de 22 a 41 años, cabe mencionar que el rango de 15 jóvenes seleccionados al azar fue de 25 a 33 y que los dos individuos restantes de 22 y 41 años eran padres de un niño progeria, la relación de sexos fue de 9 femeninos y 8 masculinos; en el grupo de los seniles se logró la colaboración voluntaria de diez individuos cuyo promedio de edad fue de 64.3 años y un rango de edad de 55 a 80 años. la relación de sexos fue de 7 femeninos por 3 masculinos (tabla 1). Para cada uno de los individuos seleccionados se realizó una historia clínica para descartar aquellos individuos con infecciones, inflamaciones, procesos malignos u otros padecimientos que interfirieran con el sistema inmune. Los exámenes generales de laboratorio practicados durante los últimos seis meses deberían ser normales y no debía haber interferencia farmacológica. sobre todo con medicamentos que interfirieran con el sistema inmune y que se conociera que tuviesen una acción clastogénica o de inducción de intercambio de cromátides hermanas.

Las muestras de sangre para el análisis cromosómico de los

cuatro grupos de estudio se procesaron simultáneamente, en la Unidad de Investigación Clínica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional y en el Hospital de Gineco-Obstetricia No. 4 del Instituto Mexicano del Seguro Social.

A) TOMA DE LA MUESTRA

De cada individuo se extrajeron 16 ml. de sangre periférica con jeringa heparinizada estéril, la cual se mantuvo a temperatura ambiente y 17 horas en oscuridad.

Se realizó cultivo de linfocitos según la técnica de Arakaki y Sparkes (221) para la siembra y la de Moorhead (222) en la cosecha con algunas modificaciones en nuestro laboratorio.

B) SIEMBRA

En condiciones óptimas de esterilidad se sembraron por duplicado para cultivo sin BrdU y cultivo con BrdU y por cada intervalo horario 0.5 ml. de sangre total heparinizada en cada frasco conteniendo: 4.0 ml. de medio de cultivo Mc Coy 5a; 1.0 ml. de suero fetal de ternera; 0.30 ml. de fitohemaglutinina y 0.02 ml. de antibiótico (10 UI/ml de penicilina y 20 µg/ml de estreptomina).

La muestra fue homogeneizada y los frascos rotulados para su identificación, con un código que se mantuvo oculto hasta la interpretación de las laminillas.

Se incubó a 37° C en oscuridad.

A los cultivos destinados para tinción diferencial de cromátides hermanas se adicionó 20µg de 5 bromo-deoxiuridina (BrdU)

y se reincubaron a 37° C en oscuridad.

C) COSECHA

A partir de las 48 horas de cultivo (en caso de cultivos con BrdU corresponde esta hora a 24 horas post-incorporación BrdU) se cosechó cada 6 horas, durante el intervalo de tiempo de 48 a 84 horas para los cultivos sin BrdU lo cual corresponde simultaneamente en los cultivos con BrdU al período de tiempo comprendido de 24 a 60 horas post-incorporación de BrdU. Se agregó a cada cultivo 30 µg de colchicina 30 minutos antes de procesarlo. Se pasó a tubos cónicos y se centrifugó durante 10 minutos a 1 200 rpm. Se desechó el sobrenadante, desintegró el botón suavemente y resuspendió en 10.0 ml. de solución hipotónica KCL 0.75M, dejandola actuar durante 15 minutos a 37° C. Se centrifugó y desechó el sobrenadante.

Se resuspendió el botón en 10 ml. de solución fijadora de metanolácido acético 3:1, haciendo 2 cambios más de fijadora para eliminar restos celulares, teniendo en el último cambio un paquete celular limpio y blanco resuspendido en un volumen final de 1.0 ml.

D) PREPARACION DE LAMINILLAS PARA LA TECNICA DE TINCION DIFERENCIAL DE CROMATIDES HERMANAS.

La técnica de tinción diferencial de cromátides hermanas de Perry y Wolff (68) con algunas modificaciones de nuestro laboratorio se realizó para determinar la cinética celular y los intercambios de cromátides hermanas en las metafases de los linfocitos de los individuos de cada grupo estudiado. Se hicieron las preparaciones dejando caer 0.2 ml. por gotco

de la suspensión sobre portaobjetos fríos y humedecidos en etanol al 70%, secando a la flama y enjuagando con agua corriente de la llave.

Se cubrieron las laminillas con solución Hoechst 33258 a una concentración de 0.5 $\mu\text{g/ml}$ durante 30 minutos, lavadas después con agua de la llave. Las laminillas fueron puestas en contacto con buffer de Sorensen pH 6.8, para exponerlas a la luz negra durante 1 hora o a la luz solar durante 2 horas. Se lavaron de nuevo con agua corriente, se secaron al aire y se colorearon con Geimsa al 2.0 % en buffer de Sorensen pH 8.0 durante 2.5 minutos.

E) PREPARACION DE LAMINILLAS PARA VISUALIZAR LAS ABERRACIONES CROMOSOMICAS.

Se realizó la técnica habitual para bandas G de Seabright (223) con mínimas modificaciones, constando de los siguientes pasos: Sumergir las laminillas en una solución salina isotónica 0.9 % conteniendo solución de tripsina-EDTA 0.0025 % a 37°C a baño María de .3 a 4 minutos. Enjuagar 2 veces en solución salina isotónica a temperatura ambiente. Teñir con colorante de Giemsa al 2 % en buffer de fosfatos Sorensen pH 6.8 durante 3 a 5 minutos.

F) ANALISIS AL MICROSCOPIO

El análisis citogenético se realizó en forma ciega por solo observador, verificándose al azar la codificación de algunos resultados por dos observadores independientes que desconocían el grupo al que pertenecía la preparación.

Las metafases se analizaron en un fotomicroscopio Carl Zeiss Universal III, tomando fotografía en todos los casos de duda y a los hallazgos importantes.

Los análisis al microscopio fueron:

Porcentaje de metafases en 1a, 2a, y 3a o más divisiones de cada intervalo horario en cada uno de los individuos de los diferentes grupos, para determinar la cinética celular, en cultivos con BrdU.

La frecuencia de Intercambios de Cromátides Hermanas se determinó contando 25 metafases en 2a. división en cultivos con BrdU por individuo, obteniéndose así el ICH/células.

Las aberraciones cromosómicas se clasificaron siguiendo el criterio de Savage (224), contándose 100 metafases en cultivo normal, 100 metafases de cultivo con BrdU en 1a. división celular y 100 metafases en 2a. división celular.

G) METODOS DE OBSERVACION Y MEDICION DE PARAMETROS.

1.- Tiempo de ciclo celular

a) El tiempo de duración del ciclo celular se determinó por el método propuesto por Dutrillaux, 1976 (59), el cual consiste en:

- i) Clasificación de 100 metafases consecutivas en cada tiempo de cosecha, siendo las de primera división aquellas con ambas cromátides oscuras, las de segunda división las que presentan la mitad de cromátides oscuras y la otra mitad claras y como de tercera división las que presentan la cuarta parte o menos de cromátides oscuras y por lo tanto tres cuartas

partes o más mostrarán cromátides claras, es decir, se consideran las contadas como tercera división más las de cuarta o más divisiones celulares.

- ii) Se graficó el porcentaje de células en cada división contra cada uno de los tiempos de cosecha.
- iii) Sobre la gráfica de cada individuo en los diferentes grupos, se midió el intervalo de tiempo comprendido entre el momento en que el 50% de las células de segunda división es alcanzado y el momento en que las células de la tercera división alcanzan también el 50%, el resultado se considera como el tiempo de ciclo celular (tcc).

Ejemplo: En base a la gráfica 38 del grupo de los niños normales tenemos que: $tcc = 12.46$

- b) Este mismo tiempo de ciclo celular puede ser determinado matemáticamente con la siguiente ecuación (Tudón y Palma 1989)

$$tcc = (X_{32} - X_{22}) + \left(\frac{Y_{22} - 50}{Y_{22} - Y_{21}} - \frac{Y_{32} - 50}{Y_{32} - Y_{31}} \right) =$$

donde:

X_{22} y X_{32} son los puntos de las horas de cosecha entre los que se encuentra o han sobrepasado el 50% de las células en segunda o tercera división.

Y_{21} , Y_{22} porcentajes de células en segunda división entre los que se encuentra el 50% de metafases en segundo ciclo.

Y_{31} , Y_{32} porcentajes de células en tercera división

entre los que se encuentra el 50% de metafases en tercer ciclo.

Ejemplo: En base a los datos de la tabla 4 con que se graficó al grupo de niños normales tenemos que:

$$tcc = (X_{32} - X_{22}) + 6 \left(\frac{Y_{22} - 50}{Y_{22} - Y_{21}} - \frac{Y_{32} - 50}{Y_{32} - Y_{31}} \right) =$$

$$tcc = (42 - 30) + 6 \left(\frac{56 - 50}{56 - 17.80} - \frac{52 - 50}{52 - 23.66} \right) = 12.52$$

c) El análisis y cuantificación de la cinética de proliferación celular se realizó por el método propuesto por Ivett y Tice (2), denominado Tiempo de Generación Promedio (TGP), el cual consiste en:

- i) Obtención de los porcentajes de células en primera, segunda y tercera o más generaciones clasificadas de acuerdo a la tinción diferencial dada por la 5-Bromodeoxiuridina (BrdU), en cada tiempo de cosecha, de cada uno de los individuos de los diferentes grupos.
- ii) Obtención del Índice de Replicación (IR) por el método de Shneider y Lewis, el cual se obtiene por la fórmula siguiente:

$$IR = \frac{1 \times \% \text{ de } 1as + 2 \times \% \text{ de } 2as + 3 \times \% \text{ de } 3as}{100}$$

iii) El IR sirve de base para obtener el TGP siguiendo la ecuación propuesta por Ivett y Tice:

$$TPG = \frac{\text{TIEMPO DE COSECHA POST-INCORPORACION BrdU}}{IR}$$

iv) Para comparar los tiempos promedios de generación se utilizó la prueba de comparación múltiple no paramétrica de Kruskal-Wallis y la prueba de U de Mann-Whitney con el nivel de significancia propuesto por Bonferroni para comparar los grupos de 2 en 2 y formar los horizontes estadísticos en base a los resultados de probabilidad significativa o no significativa (225,226).

2.- Frecuencia de intercambio de cromátides hermanas.

La frecuencia de ICH se determinó en cultivos de 36 y 42 horas post-incorporación de BrdU, contándolos en 25 células como mínimo y en ocasiones verificando la frecuencia por duplicado o triplicado obteniendo la media de éstos. Obteniéndose de esta manera el número de ICH/célula de cada individuo en los diferentes grupos estudiados.

En base a las frecuencias de ICH/célula por grupo de estudio se determinó el promedio (\bar{x}) y error estandar (s_x) y éstas se muestran en la tabla 7.

Las frecuencias se compararon con la prueba No paramétrica de Kruskal-Wallis y la prueba de U de Mann-Whitney con la desigualdad de Bonferroni para comparar los grupos de 2 en 2 (225,226).

3.- Determinación de la frecuencia de aberraciones cromosómicas y el efecto de la BrdU en los diferentes grupos de estudio.

Por medio de la técnica habitual y para bandas GTG de Seabright con algunas modificaciones del laboratorio de la Unidad de Investigación Clínica en Genética Humana, se visualizaron las aberraciones cromosómicas en 100

metafases de la primera cosecha sin BrdU la cual correspondía a 48 horas post-cultivo y en las 100 primeras metafases localizadas en 1a. división y en las 100 metafases de la segunda división desde la cosecha de 48 horas post-cultivo o su correspondencia de 24 horas post-incorporación de BrdU hasta la cosecha en donde se completaba el número. Las alteraciones cromosómicas se clasificaron según Savage (224), tomando en cuenta la nomenclatura del Sistema Internacional para Citogenética Humana (146).

La frecuencia de aberraciones cromosómicas de las 300 células tanto de cultivo normal como con adición de BrdU, se determinó globalmente para analizarla intergrupalmente en los diferentes grupos por medio de la prueba no paramétrica de comparación múltiple de Kruskal-Wallis y el análisis de grupos de 2 en 2 se realizó por la prueba de U de Mann-Whitney con el nivel de significancia dado por la desigualdad de Bonferroni para formar los horizontes estadísticos.

Las distribuciones de frecuencia de las alteraciones cromosómicas se compararon intragrupalmente, las 100 metafases del cultivo sin BrdU con las 100 metafases de 1a. división del cultivo con BrdU y las 100 metafases de la 1a. división con las 100 de la 2a. división, analizándose estadísticamente con la prueba de χ^2 (225,226).

TABLA. M-1

M E T O D O L O G I A

DIA	HORA	MANIOBRA
I	12:00	OBTENER POR VENOPUNCION SANGRE PERIFERICA MANTENER A TEMPERATURA AMBIENTE EN OBSCURIDAD
II	5:00	CULTIVO DE SANGRE - INCUBAR A 37°C EN OBSCURIDAD
III	5:00	TECNICA NORMAL T. DE TINCION DIFERENCIAL DE CROMATIDES ADICIONAR 20 μ g DE BROMO DEOXIURIDINA REINCUBAR A 37°C EN OBSCURIDAD
IV	5:00	COSECHAR CADA <u>6</u> HORAS POR DUPLICADO
V		
VI		PREPARACIONES SOBRE PORTAOBJETOS EN ETANOL FRIO AL 70%.
VII		BANDAS G SE CONTINUA LA TECNICA DE TINCION DE CROMATIDES HERMANAS.

0
24
48
54
60
66
72
78
84

24
30
36
42
48
54
60
horas post-incorporación BrdU

ANALISIS AL
MICROSCOPIO

CINETICA CELULAR
(100 metafases en 1a., 2a., y 3a. o más divisiones
en cada hora de cosecha).

INTERCAMBIO DE CROMATIDES HERMANAS
(25 metafases en 2a. división).

ABERRACIONES CROMOSOMICAS
(100 metafases de cultivo normal de 48 hs.,
100 metafases de cultivos con BrdU en 1a. división y
100 metafases en 2a. división celular).

VI RESULTADOS

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Las características generales de los cuatro grupos de estudio se observan en la tabla 1.

los datos correspondientes a cada uno de los treinta y seis individuos estudiados en cuanto a edad, sexo y los resultados para cada una de la mediciones realizadas en el estudio como son: Determinación del tiempo de ciclo celular (tcc) por el método de Dutrillaux y Fosse o con la ecuación matemática propuesta por Tudón y Palma, determinación del tiempo promedio de generación (TPG) por el método de Ivett y Tice; determinación de la frecuencia de intercambio cromosómico por célula (ICH/cel) y la determinación de la frecuencia total de aberraciones cromosómicas (A.C.) para cada individuo en cultivos sin y con adición de bromodeoxiuridina (BrdU), se muestran en la tabla 2.

Las gráficas 1 a 36 de cada uno de los individuos de los cuatro grupos de estudio mostraron en su cinética celular características de comportamiento diferente, tanto intergrupalmente como intragrupalmente.

Se determinó para cada uno de los individuos de los diferentes grupos el tiempo de ciclo celular (tcc) a excepción de los jóvenes 1 y 5 y los seniles 1 y 3, por no alcanzar la curva de segunda división el valor del 50% requerido por el procedimiento de Dutrillaux y Fosse. Los valores del tcc se obtuvieron tanto gráficamente según Dutrillaux y Fosse, como matemáticamente en base a la ecuación que proponen Tudón y Palma y se muestran en la tabla 3 los valores individuales y promedio en cada

grupo.

La tabla 4 y las gráficas 37-40 se elaboraron en base al promedio de los porcentajes de células en primera, segunda y tercera o más divisiones celulares de los individuos que componían cada grupo de estudio.

Solo la gráfica de los valores promedio de la cinética celular de los niños fue comparativamente igual su tcc obteniendo graficamente y con la ecuación de Tudón y Palma a la media de los tcc individuales, las tres gráficas restantes de los valores promedio no se corresponden. Con estos mismos valores promedio se elaboró el idiograma del esquema 1, demostrando que los patrones de respuesta son similares dentro de cada grupo de estudio (intragrupalmente), pero diferentes entre los grupos de estudio (intergrupalmente).

Se observa en general en todos los grupos y conforme progresa el tiempo de cultivo que: La proporción de metafases en primera división disminuye conforme pasa el tiempo, la proporción de las segundas divisiones tiende a formar una curva de distribución normal, con excepción del grupo de los seniles, en donde la proporción siempre es menor con respecto al resto de los grupos y que la proporción de terceras divisiones aumenta conforme pasa el tiempo.

La tabla 5 y gráfica 41 se elaboraron con los datos de los Tiempos Promedio de Generación (TPG) obtenidos por el procedimiento de Ivett y Tice de cada uno de los tiempos de cosecha analizados por grupo de estudio. Se tiene un TPG para las células de niños progeria de 21.7 ± 1.5 horas, un TPG para los niños normales de 19.4 ± 1.5 horas, un TPG para los jóvenes

de 22.7 ± 0.7 horas y por último en el caso de los seniles un TPG de 28.3 ± 1.9 horas.

Siguiendo el mismo procedimiento de IVett y Tice para determinar el TPG, la tabla 6 presenta los valores para cada individuo de los diferentes grupos de estudio, siendo el TPG promedio, como era de esperarse, iguales a los encontrados en cada tiempo de cosecha (tabla 5), 21.65 para progeria, 19.34 para los niños normales, 22.75 para los jóvenes y de 28.27 para los seniles. La prueba no paramétrica de comparación múltiple de Kruskal-Wallis mostró que había diferencia entre los grupos con una $p < 0.001$ y con la prueba de U de Mann-Whitney y el nivel de significancia dado por la desigualdad de Bonferroni $\alpha = 0.0083$ al hacer las 6 comparaciones posibles entre los grupos, mostró que no había diferencia estadística de la progeria ni con niños normales, ni con jóvenes, ni con seniles, existiendo diferencias entre las 3 restantes comparaciones formandose entre los grupos los horizontes de distribución estadísticas que se muestran en el esquema 4a, ya que:

P & N p = ns (no significativa)

P & J p = ns

P & S p = ns

N & J p < 0.001

N & S p < 0.001

J & S p < 0.0001

El esquema 2 muestra la frecuencia de ICH/célula, analizados en las 25 metafases de linfocitos en los grupos estudiados. La tabla 7 presenta los datos correspondientes a la frecuencia de ICH/célula observados en los individuos estudiados. La prueba

de comparación múltiple no paramétrica de Kruskal-Wallis demostró que los grupos son diferentes con una $p < 0.005$, la prueba de U de Mann-Whitney y el nivel de significancia dado por la desigualdad de Bonferroni $\alpha^* = 0.0083$ comparando los grupos de 2 en 2 formó los horizontes de distribución estadística (225) que se muestran en el esquema 4b al encontrarse que:

- P & N p = ns
- P & J p = ns
- P & S p = ns
- N & J p < 0.002
- N & S p < 0.002
- J & S p = ns

La tabla 8 muestra los tipos y número de aberraciones cromosómicas encontradas en los diferentes grupos, como son: Brechas (gaps), isobrechas (isogaps), deleciones cromatídicas (cr) y cromosómicas (cs), fragmentos (frag.), tetraploidías (tetra), endorreduplicaciones (endo) y aneuploidías de tipo monosómico (-1).

El esquema 3 muestra la distribución de frecuencias de aberraciones cromosómicas y su error estandar en cultivos normales a las 48 horas de cosecha y cultivos en primera y segunda división celular medidas a las 48 horas de cultivo, lo que corresponde a 24 horas post-incorporación de BrdU en cada grupo estudiado. La tabla 9 presenta éstos datos para cada uno de los individuos estudiados.

La tabla 10 presenta los datos individuales de la frecuencia basal de aberraciones cromosómicas en las 100 células de

P & N p = ns
 P & J p < 0.003
 P & S p = ns
 N & J p = ns
 N & S p < 0.003
 J & S p < 0.002

En cada grupo de estudio de los datos presentados en la tabla 9 se comparó estadísticamente con la prueba de χ^2 el número de aberraciones cromosómicas encontradas en los cultivos normales (C.N.) contra las aberraciones cromosómicas de cultivos con BrdU en primera división (1^a BrdU) contra las de segunda división (2^a BrdU). La tabla 12 muestra estas comparaciones estadísticas y los resultados de χ^2 (1) experimental con un grado de libertad (χ^2 (1) exp) y de tablas (χ^2 (1) tablas), así como sus probabilidades significativas y no significativas. El esquema 4 presenta los horizontes de distribución estadística en los diferentes grupos de estudio para las frecuencias basales del tiempo promedio de generación (TPG), intercambio de cromátides hermanas (ICH) y de aberraciones cromosómicas (AC) y la tabla 13 resume las medias (\bar{X}) de cada uno de los parámetros.

Puesto que parecía existir una relación directamente proporcional de los TPG con los ICH en los diferentes grupos de estudio (esquema 4a, 4b y tabla 13), se elaboraron los diagramas de dispersión con los datos individuales de los TPG contra los ICH como se muestra en las gráficas 42 a 45, habiendo habiendo solo correlación e inversa en el grupo de seniles.

Tabla 1.

CARACTERISTICAS GENERALES DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

GRUPOS DE ESTUDIO	EDAD		RELACION FEMENINO/MASCULINO	NO. DE CASOS
	PROMEDIO	RANGO		
NIÑOS PROGERIA	7.6	5-13 años	2/1	3
NIÑOS	6.7	4/12-13 años	4/2	6
JOVENES	29.7	22-41 años	9/8	17
SENILES	64.3	55-80 años	7/3	10
			T o t a l	36

Tabla 2.

CARACTERÍSTICAS Y RESULTADOS GENERALES PARA CADA INDIVIDUO
EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO

INDIVIDUO	CARACTERÍSTICA	NIÑOS PROGERIA	NIÑOS NORMALES	JOVENES	SENILES
1	EDAD (años)	5	4/12	29	65
	SEXO	F	M	M	M
	tcc	12.02	14.75	ND	ND
	TPG	19.43	19.75	28.25	26.71
	ICH	6.04	4.60	5.76	13.04
	AC	6.00	15.00	1.00	15.00
2	EDAD (años)	13	6	25	75
	SEXO	F	F	M	M
	tcc	6.45	12.84	13.20	14.46
	TPG	21.70	18.65	23.10	26.55
	ICH	8.40	4.50	9.52	11.52
	AC	7.00	7.00	2.00	24.00
3	EDAD (años)	5	5	28	80
	SEXO	M	F	M	M
	tcc	6.08	10.90	19.30	ND
	TPG	23.82	19.82	23.42	24.42
	ICH	6.48	5.40	6.48	9.84
	AC	27.00	12.00	2.00	30.00
4	EDAD (años)		11	28	61
	SEXO		F	F	F
	tcc		8.61	10.50	11
	TPG		18.36	22.23	25
	ICH		2.50	7.96	11.1
	AC		5.00	2.00	19.00
5	EDAD		13	29	80
	SEXO		F	M	F
	tcc		17.78	ND	12.69
	TPG		20.29	23.05	27.78
	ICH		4.50	9.76	5.20
	AC		6.00	2.00	17.00
6	EDAD		5	28	58
	SEXO		M	M	F
	tcc		9.88	17.12	18.25
	TPG		19.44	20.91	30.88
	ICH		6.30	5.96	9.40
	AC		2.00	1.00	9.00
7	EDAD			29	57
	SEXO			F	F
	tcc			21.05	15.07
	TPG			20.58	31.40
	ICH			5.92	7.30
	AC			1.00	25.00

F = Femenino; M = Masculino; ND = No Determinado.

Características y resultados generales para cada individuo en los diferentes grupos de estudio

INDIVIDUO	CARACTERISTICA	NIÑOS PROGERIA	NIÑOS NORMALES	JOVENES	SENILES
8	EDAD (años)			26	57
	SEXO			F	F
	tcc			16.95	17.33
	TPG			20.98	30.83
	ICH			4.68	8.40
	AC			2.00	19.00
9	EDAD (años)			29	55
	SEXO			F	F
	tcc			11.85	11.72
	TPG			24.63	27.90
	ICH			6.00	8.50
	AC			3.00	10.00
10	EDAD (años)			27	55
	SEXO			F	F
	tcc			17.57	12.75
	TPG			20.70	31.13
	ICH			7.24	7.50
	AC			2.00	24.00
11	EDAD (años)			41	
	SEXO			M	
	tcc			13.76	
	TPG			21.08	
	ICH			10.44	
	AC			4.00	
12	EDAD (años)			22	
	SEXO			F	
	tcc			12.15	
	TPG			22.93	
	ICH			9.08	
	AC			9.00	
13	EDAD (años)			33	
	SEXO			M	
	tcc			15.99	
	TPG			23.27	
	ICH			10.00	
	AC			3.00	
14	EDAD (años)			33	
	SEXO			F	
	tcc			11.90	
	TPG			20.42	
	ICH			6.68	
	AC			3.00	

Características y resultados generales para cada individuo en los diferentes grupos de estudio.

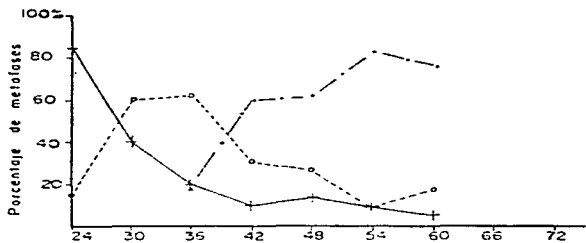
INDIVIDUO	CARACTERISTICA	NIÑOS PROGERIA	NIÑOS NORMALES	JOVENES	SENILES
15	EDAD (años)			33	
	SEXO			M	
	tcc			12.04	
	TPG			23.77	
	ICH			8.44	
	AC			4.00	
16	EDAD (años)			33	
	SEXO			F	
	tcc			12.93	
	TPG			23.22	
	ICH			7.60	
	AC			3.00	
17	EDAD (años)			32	
	SEXO			F	
	tcc			13.31	
	TPG			24.19	
	ICH			8.36	
	AC			4.00	

tcc = Tiempo de ciclo celular
 TPG = Tiempo promedio de generación
 ICH = Intercambio de cromátides hermanas
 AC = Aberraciones cromosómicas.

KINETICA CELULAR DE CADA INDIVIDUO

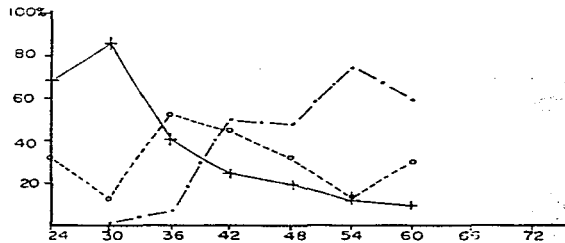
GRAFICA. 1

NIÑO PROGERIA - 1



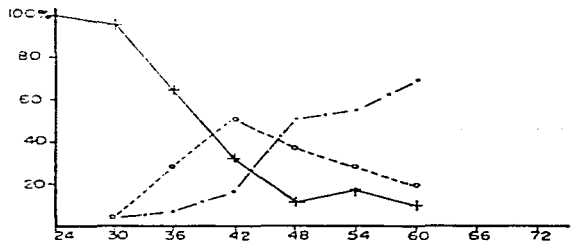
GRAFICA. 2

NIÑO PROGERIA - 2



GRAFICA. 3

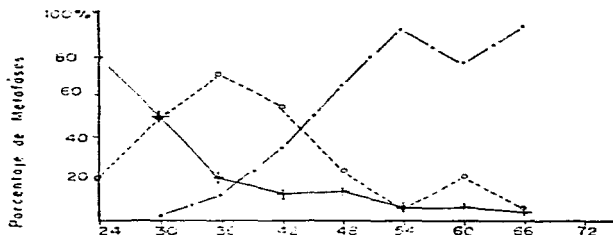
NIÑO PROGERIA - 3



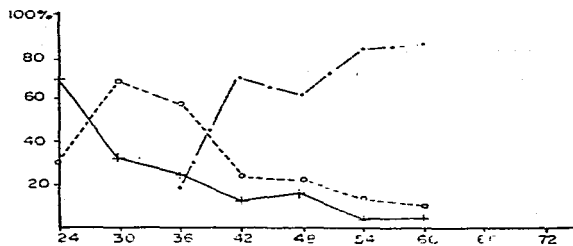
Tiempo de cosecha después de incorporar BrdU

- + — + 1a. División
- o - - - o 2a. División
- x x 3a. División

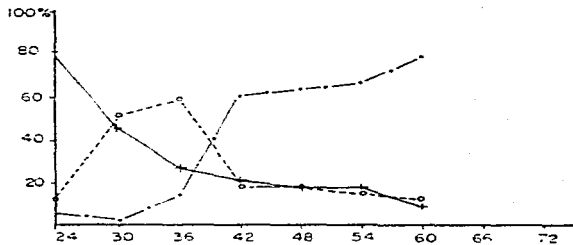
GRAFICA. 4
NIÑO - 1



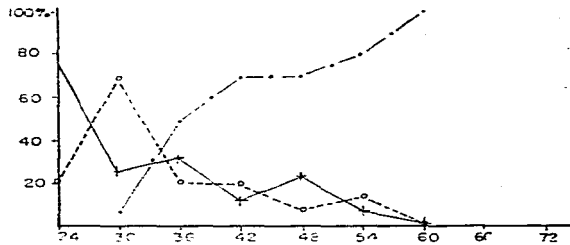
GRAFICA. 5
NIÑO - 2



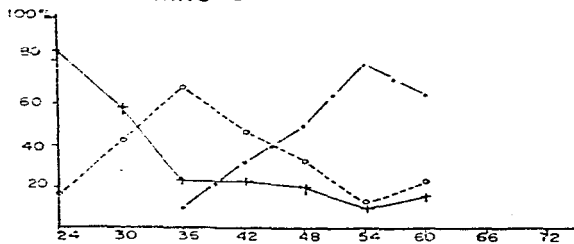
GRAFICA. 6
NIÑO - 3



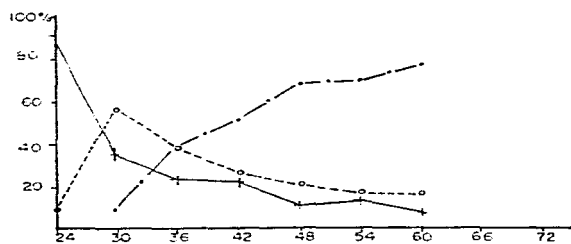
GRAFICA. 7
NIÑO - 4



GRAFICA. 8
NIÑO - 5



GRAFICA. 9
NIÑO - 6

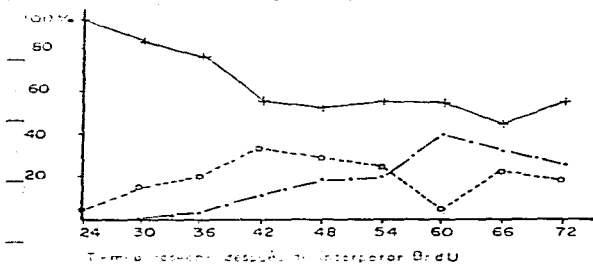


Tiempo de cosecha después de incorporar BRJU

—+— 1a. División
- - - - - 2a. División
- . - . - 3a. División ó más

GRAFICA.10

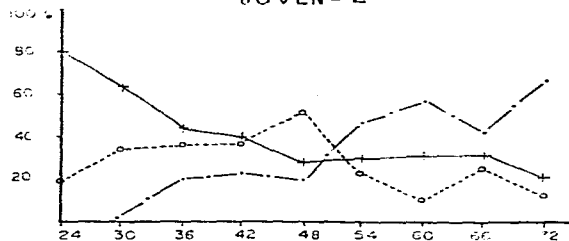
JOVEN - 1



Temps. result. desu. 1. Interper. B. U.

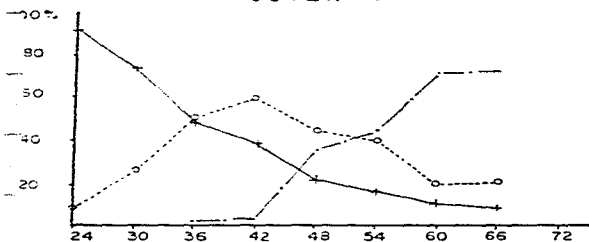
GRAFICA.11

JOVEN - 2



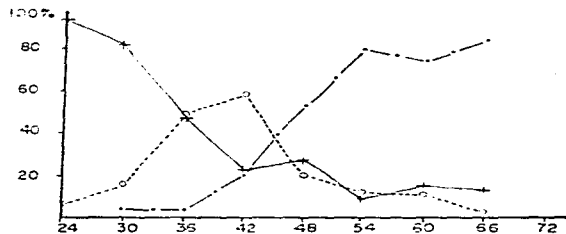
GRAFICA.12

JOVEN - 3



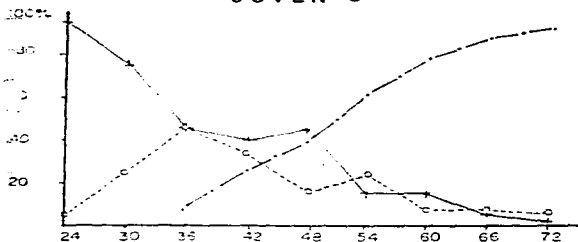
GRAFICA.13

JOVEN - 4



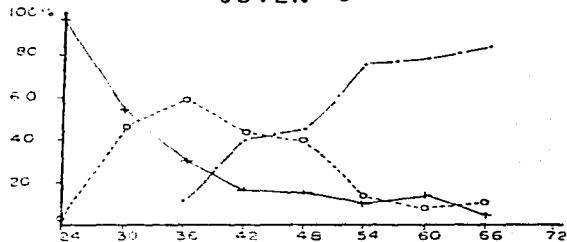
GRAFICA.14

JOVEN - 5



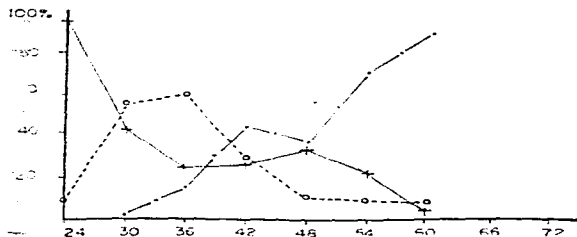
GRAFICA.15

JOVEN - 6



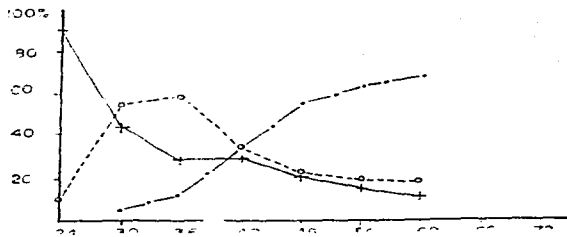
GRAFICA.16

JOVEN - 7



GRAFICA.17

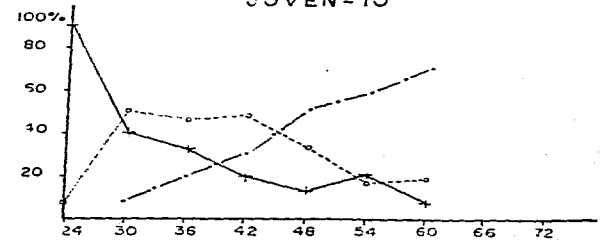
JOVEN - 8



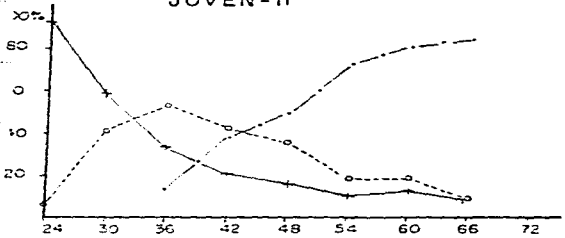
GRAFICA. 18 JOVEN-9



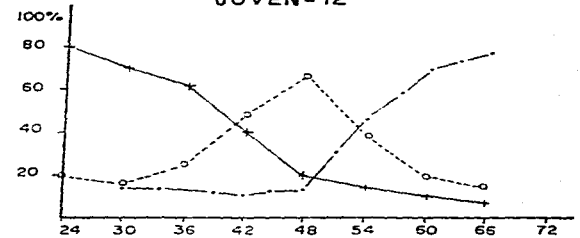
GRAFICA. 19 JOVEN-10



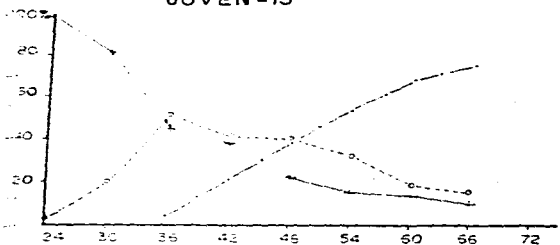
GRAFICA. 20 JOVEN-11



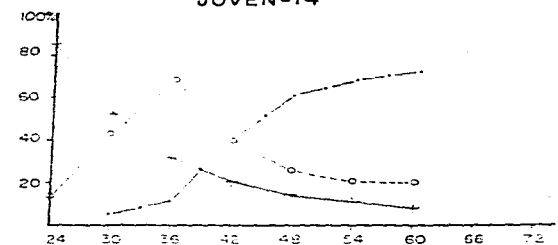
GRAFICA. 21 JOVEN-12



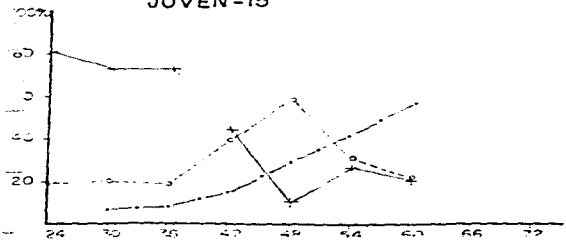
GRAFICA. 22 JOVEN-13



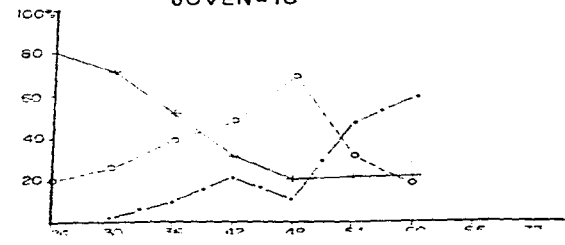
GRAFICA. 23 JOVEN-14



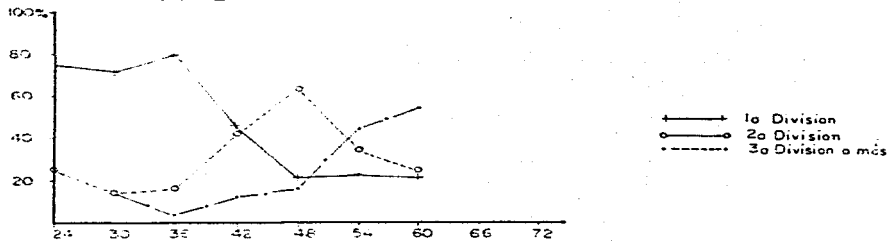
GRAFICA. 24 JOVEN-15



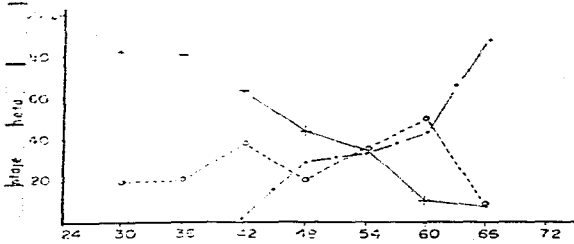
GRAFICA. 25 JOVEN-16



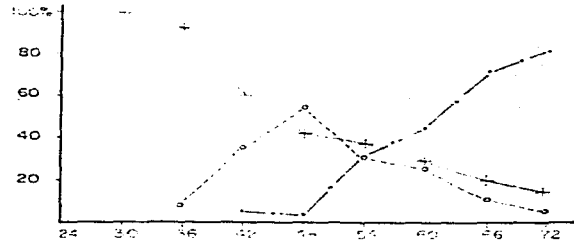
GRAFICA. 26
JOVEN-17



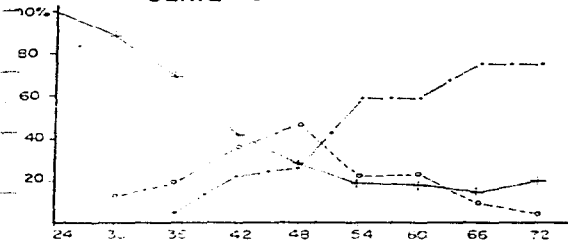
GRAFICA.27
SENIL - 1



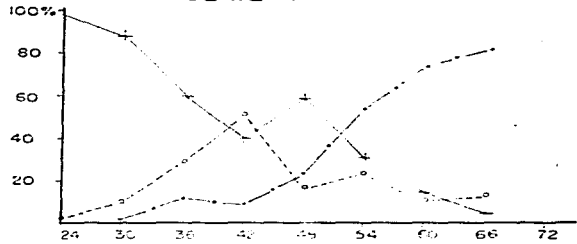
GRAFICA.28
SENIL - 2



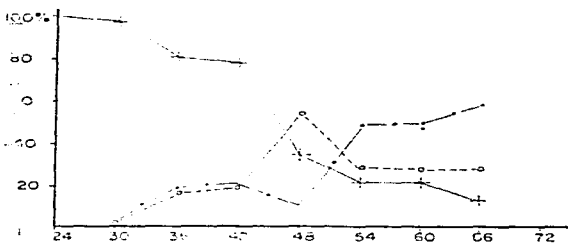
GRAFICA.29
SENIL - 3



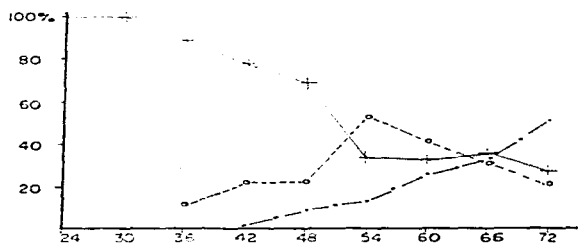
GRAFICA.30
SENIL - 4



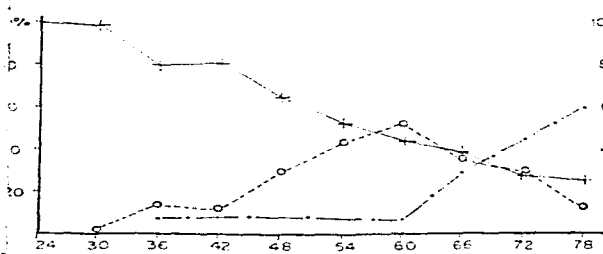
GRAFICA.31
SENIL - 5



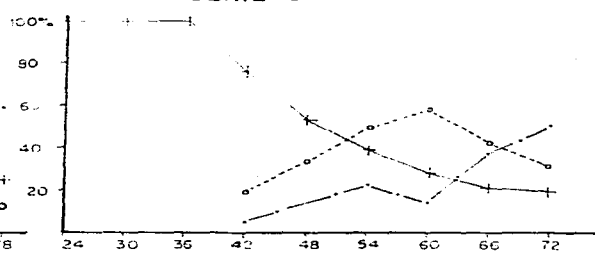
GRAFICA.32
SENIL - 6



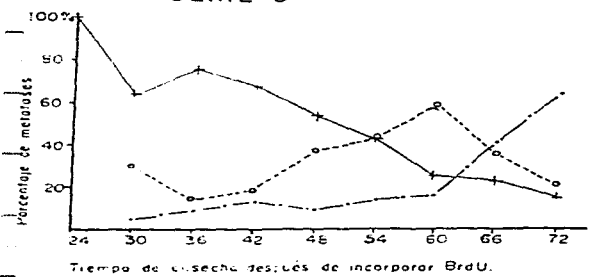
GRAFICA.33
SENIL - 7



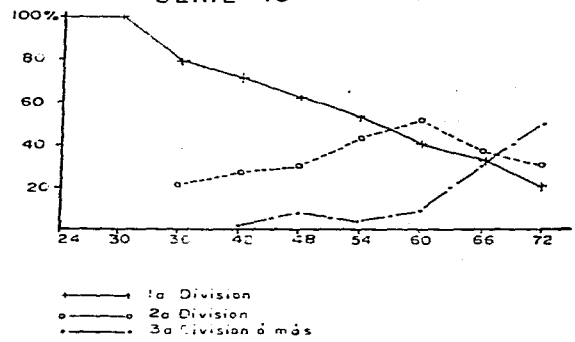
GRAFICA.34
SENIL - 8



GRAFICA. 35
SENIL - 9



GRAFICA. 36
SENIL - 10



—+— 1a Division
-o- 2a Division
...x... 3a Division o más

Tabla 3.

TIEMPO DE CICLO CELULAR (tcc). EN HORAS PARA CADA INDIVIDUO

INDIVIDUO	NINOS			
	PRJGERIA	NORMALES	JOVENES	SENILES
1	12.02	14.75	ND	ND
2	6.45	12.84	13.20	14.46
3	6.08	10.90	19.30	ND
4		8.61	10.50	11.29
5		17.78	ND	12.69
6		9.88	17.12	18.25
7			21.05	15.07
8			16.95	17.33
9			11.85	11.72
10			17.57	12.75
11			13.76	
12			12.15	
13			15.99	
14			11.90	
15			12.04	
16			12.93	
17			13.31	
Promedio tcc:	8.18	12.46	14.64	14.20
S	2.72	3.10	3.03	2.40
s \bar{x}	1.57	1.27	0.78	0.85

ND = No determinado por no alcanzar la curva de segunda división el valor del 50% de metafases, requerido para obtener el valor del tcc por el procedimiento de Dutrillaux y Fosse.

Tabla 4.

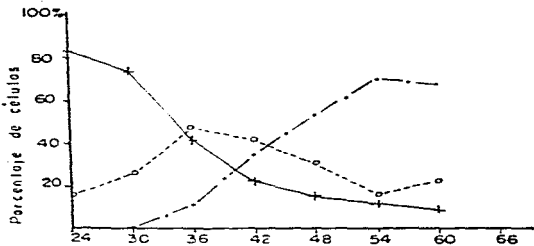
PROMEDIO DEL POR CIENTO DE METAFASES EN PRIMERA, SEGUNDA Y TERCERA O MAS DIVISIONES
 PARA CADA GRUPO EN LAS DIFERENTES HORAS DE COSECHA DESPUES DE LA INCORPORACION DE Brdu

TIEMPO Hs.	NIÑOS PROGERIA DIVISION CELULAR			NIÑOS DIVISION CELULAR			JOVENES DIVISION CELULAR			SENILES DIVISION CELULAR		
	1a.	2a.	3a.	1a.	2a.	3a.	1a.	2a.	3a.	1a.	2a.	3a.
24	84.30	15.70	0.00	81.20	17.80	1.00	89.20	10.80	0.00	99.80	0.20	0.00
30	74.00	25.66	0.33	40.83	56.00	3.17	66.12	30.18	3.70	91.70	7.60	0.70
36	41.67	47.67	10.67	24.83	51.50	23.66	47.53	42.71	9.76	80.50	15.20	4.30
42	22.33	42.33	35.33	17.00	31.00	52.00	33.94	42.88	23.18	65.60	27.50	6.90
48	15.00	31.67	53.33	17.00	20.50	62.50	24.18	40.35	35.47	50.80	34.10	15.10
54	12.67	16.67	70.67	9.67	12.67	77.67	19.94	24.53	55.53	36.40	36.90	26.90
60	8.67	22.67	68.67	6.83	13.33	79.83	16.88	15.82	67.29	26.40	39.50	34.10
	n = 3			n = 6			n = 17			n = 10		

VALORES PROMEDIO DE LA KINETICA CELULAR EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO

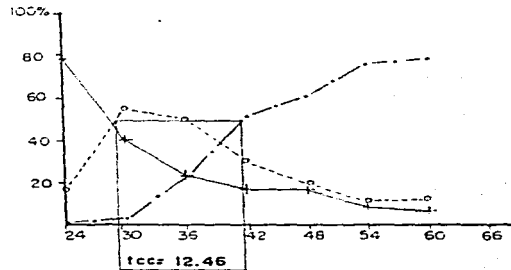
GRAFICA.37

NIÑOS PROGERIA



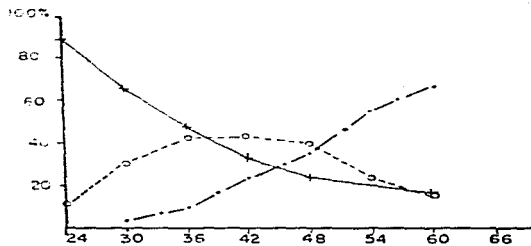
GRAFICA.38

NIÑOS



GRAFICA.39

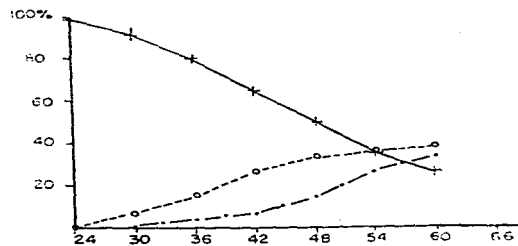
JOVENES



Tiempo de cosecha post-incorporación BrdU.

GRAFICA.40

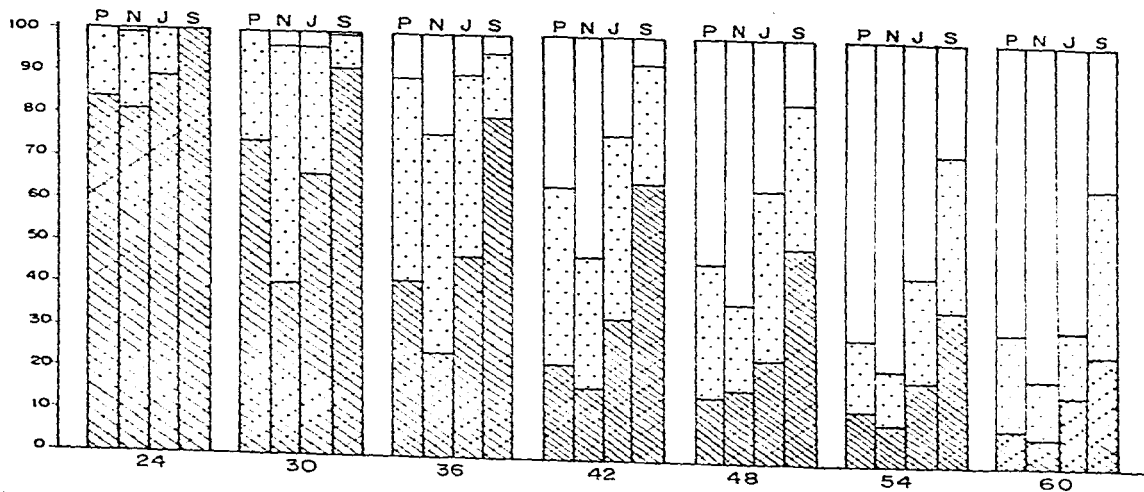
SENILES



- +—+—+— 1a. División
- o—o—o— 2a. División
- 3a. División o más

ESQUEMA. I

PROMEDIO DEL PORCENTAJE DE METAFASE EN 1a, 2a, 3a, O MAS DIVISIONES PARA CADA GRUPO EN LAS DIFERENTES HORAS DE COSECHA DESPUES DE LA INCORPORACION DE BrdU.



1a. División
2a. División
3a. División

P= NIÑOS PROGERIA
N= NIÑOS NORMALES
J= JOVENES
S= SENILES

Tabla 5.

TIEMPO PROMEDIO DE GENERACION (TPG) PARA CADA HORA DE COSECHA
POST-INCORPORACION DE BrDU EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO

TIEMPO Hs.	NIÑOS PROGERIA	NIÑOS	JOVENES	SENILES
24	21.01	19.88	21.74	23.95
30	24.56	18.61	22.05	27.84
36	21.70	17.40	22.56	28.26
42	20.02	17.96	22.53	30.18
48	20.16	19.58	22.99	29.52
54	21.00	20.19	23.20	28.61
60	23.10	22.05	24.17	29.52
n	3	6	17	10
\bar{x}	21.650	19.385	22.749	28.272
s	1.53	1.45	0.74	1.92
$s\bar{x}$	0.48	0.46	0.24	0.61

TPG obtenido por el procedimiento de Ivett y Tice.

GRAFICA. 41

TIEMPO PROMEDIO DE GENERACION (TPG) PARA CADA HORA DE COSECHA
 POST- INCORPORACION DE BrdU EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO

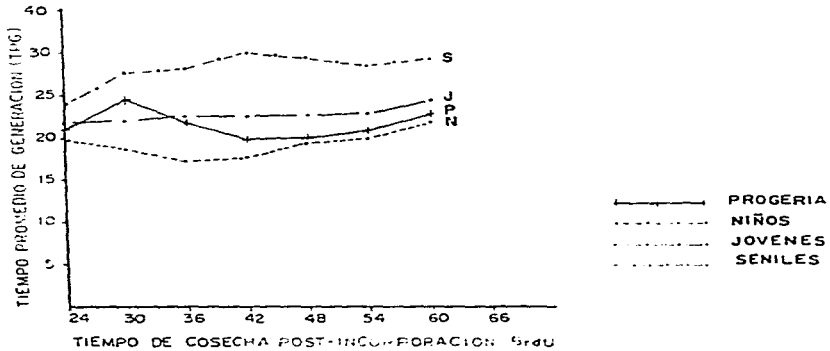


Tabla 6.
DURACION EN HORAS DEL TIEMPO PROMEDIO DE GENERACION (TPG) PARA CADA INDIVIDUO

INDIVIDUO	NIÑOS			
	PROGERIA	NORMALES	JOVENES	SENILES
1	19.43	19.75	28.25	26.71
2	21.70	18.65	23.10	26.55
3	23.82	19.82	23.42	24.42
4		18.36	22.23	25.12
5		20.29	23.05	27.78
6		19.44	20.91	30.88
7			20.58	31.40
8			20.98	30.83
9			24.63	27.90
10			20.70	31.13
11			21.08	
12			22.93	
13			23.27	
14			20.42	
15			23.77	
16			23.22	
17			24.19	
Promedio TPG*	21.650	19.385	22.749	28.272

*La prueba no paramétrica de comparación múltiple de Kruskal-Wallis mostró que había diferencia entre los grupos con una $p < 0.001$. La prueba de U de Mann-Whitney al comparar los grupos de 2 en 2, en base a la significancia estadística formó los horizontes de distribución estadística que se muestran en el esquema 4a.

ESQUEMA. 2

FRECUENCIA DE ICH/CELULA EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO

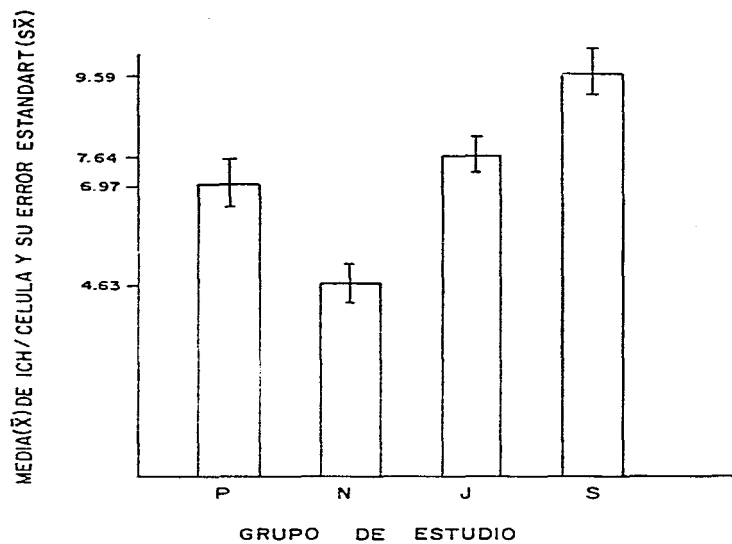


Tabla 7.
 FRECUENCIA DE ICH/CELULA PARA CADA INDIVIDUO

INDIVIDUO	NIÑOS			
	PROGERIA	NORMALES	JOVENES	SEÑILES
1	6.04	4.64	5.76	13.04
2	8.44	4.48	9.52	11.52
3	6.48	5.44	6.48	9.84
4		2.52	7.96	11.16
5		4.48	9.76	9.20
6		6.28	5.96	9.40
7			5.92	7.32
8			4.68	8.44
9			6.00	8.48
10			7.24	7.60
11			10.44	
12			9.08	
13			10.00	
14			6.68	
15			8.44	
16			7.60	
17			8.36	
\bar{X} ICH/CELULA	6.97	4.63	7.64	9.59
Error estándar	0.59	0.47	0.41	0.55

La prueba de comparación múltiple no paramétrica de Kruskal-wallis mostró que había diferencia entre los grupos con una $p < 0.005$. La prueba de U de Mann-Whitney al comparar los grupos de 2 en 2 formó los horizontes de distribución estadística que se muestran en el esquema 4b.

TABLA. 8

TIPO Y NUMERO DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS (A3) EN CADA GRUPO.
NIÑOS PROGERIA

	Gap Isoqap		Delección			Tetra Endo - 1			T r
	Cr	Cs	Cr	Cs	Frag	Cr	Endo	- 1	
1a. División con BrdU.	7	3				5	1		16
2a. División con BrdU.	7	2					1		10
Sin BrdU	5	5				1	3		14

NIÑOS

1. División con BrdU.	16	4	4	1	1		2		28
2a. División con BrdU.	8	6							14
Sin BrdU.	2					1	2		5

JOVENES

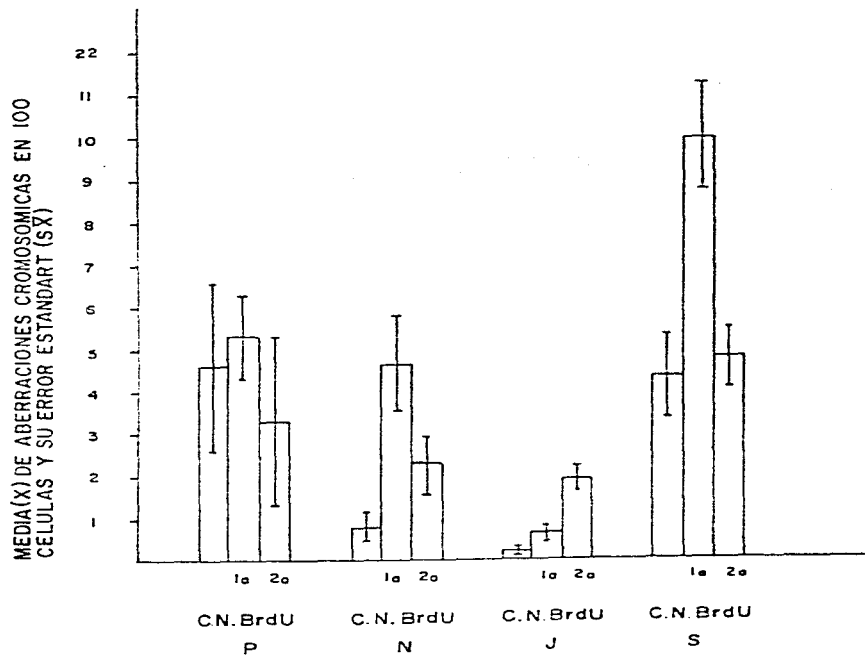
1. División con BrdU.	8	2					1		11
2a. División con BrdU.	14	4	2			10	3		33
Sin BrdU.	1					3			4

SEÑILES

1. División con BrdU.	53	23	4		1	10	7	2	100
2a. División con BrdU.	24	4	1			9	6	4	48
Sin BrdU.	24	13				4	2	1	44

ESQUEMA.3

FRECUENCIA DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN CULTIVOS NORMALES Y CULTIVOS CON BrdU EN PRIMERA Y SEGUNDA DIVISION EN CADA GRUPO DE ESTUDIO.



C.N. CULTIVO NORMAL
1a, 2a.
BrdU. CULTIVO CON BrdU.

Tabla 9.

FRECUENCIA DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN CULTIVOS NORMALES (CN) Y CULTIVOS CON BrdU EN PRIMERA Y SEGUNDA DIVISION PARA CADA INDIVIDUO

INDIVIDUO	NIÑOS						JOVENES			SEÑILES		
	PROGERIA			NORMALES			BrdU			BrdU		
	CN	1a.	2a.	CN	1a.	2a.	CN	1a.	2a.	CN	1a.	2a.
1	1	4	1	0	10	5	0	1	0	5	8	2
2	3	4	0	0	5	2	0	1	1	7	13	4
3	10	8	9	2	6	4	0	0	2	11	15	4
4				0	4	1	0	0	2	4	11	4
5				2	2	2	0	0	2	5	11	1
6				1	1	0	0	0	1	1	4	4
7							0	0	1	4	14	7
8							1	0	1	2	9	8
9							0	1	2	0	2	8
10							0	1	1	5	13	6
11							0	2	2			
12							2	3	4			
13							0	1	2			
14							1	0	2			
15							0	0	4			
16							0	1	2			
17							0	0	4			
\bar{x}	4.66	5.33	3.33	0.83	4.67	2.33	0.24	0.65	1.94	4.44	10.00	4.8
Error estándar	2.23	1.09	2	0.37	1.19	0.69	0.13	0.20	0.27	0.94	1.29	0.72

Tabla 10.

FRECUENCIA BASAL DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN CULTIVOS NORMALES
(CN) SIN BrdU PARA CADA INDIVIDUO

INDIVIDUO	N I Ñ O S			
	PROGERIA	NORMALES	JOVENES	SEÑILES
1	1	0	0	5
2	3	0	0	7
3	10	2	0	11
4		0	0	4
5		2	0	5
6		1	0	1
7			0	4
8			1	2
9			0	0
10			0	5
11			0	
12			2	
13			0	
14			1	
15			0	
16			0	
17			0	
\bar{x}	4.66	0.83	0.24	4.44

La prueba de comparación múltiple no paramétrica de Kruskal-wallis mostró diferencia entre los grupos con una $p < 0.0001$ y la prueba de análisis de grupos de 2 en 2 de Conover formó los horizontes de distribución estadística que se muestran en el esquema 4c.

Tabla 11.

FRECUENCIA DE LOS PROMEDIOS DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS TOTALES DE CULTIVOS NORMALES Y CULTIVOS CON ADICION DE BpDU PARA CADA INDIVIDUO

INDIVIDUO	NIÑOS			
	PROGERIA	NORMALES	JOVENES	SENILES
1	6	15	1	15
2	7	7	2	24
3	27	12	2	30
4		5	2	19
5		6	2	17
6		2	1	9
7			1	25
8			2	19
9			3	10
10			2	24
11			4	
12			9	
13			3	
14			3	
15			4	
16			3	
17			4	
\bar{x}	13.33	7.83	2.82	19.20

La prueba de comparación múltiple no paramétrica de Kruskal-Wallis mostró que había diferencia entre los grupos con una $p < 0.005$. La prueba de U de Mann-Whitney al comparar los grupos de 2 en 2 formó los horizontes de distribución estadística en que existe un traslape de los niños progeria con el grupo de niños normales y seniles.

Tabla 12.

COMPARACIONES ESTADISTICAS POR MEDIO DE χ^2 DEL NUMERO DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS EN CULTIVOS NORMALES Y CULTIVOS CON BrdU EN CADA GRUPO DE ESTUDIO

	METAFASES CON ABERRACIONES CROMOSOMICAS				Esperado	$\chi^2(1)$ Tablas	P
	CN		1a. BrdU				
	sí	no	sí	no			
NIÑOS PROGERIA	14	286	16	284	0.14	< 7.88	NS
NIÑOS NORMALES	5	555	28	572	14.41	> 10.83	< 0.001
JOVENES	4	1696	11	1689	3.28	< 3.84	NS
SENILES	44	956	100	900	23.47	> 10.83	< 0.001

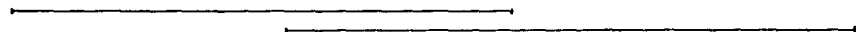
	1a. BrdU		2a. BrdU				
NIÑOS PROGERIA	16	284	10	290	1.45	< 7.88	NS
NIÑOS NORMALES	28	572	14	586	4.84	> 3.84	< 0.05
JOVENES	11	1689	33	1667	11.14	> 10.83	< 0.001
SENILES	100	900	48	952	19.73	> 10.83	< 0.001

Esquema 4.

HORIZONTES DE DISTRIBUCION ESTADISTICA EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO PARA LAS FRECUENCIAS BASALES DEL TIEMPO PROMEDIO DE GENERACION (TPG), INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS (ICH) Y ABERRACIONES CROMOSOMICAS (AC)

4a
TPG

NIÑOS NORMALES NIÑOS PROGERIA JOVENES SENILES



4b
ICH

NIÑOS NORMALES NIÑOS PROGERIA JOVENES SENILES



4c
AC

JOVENES NIÑOS NORMALES NIÑOS PROGERIA SENILES



Tabla 13.

RESULTADOS GENERALES DE LAS MEDICIONES CITOGENETICAS EN LOS
DIFERENTES GRUPOS DE ESTUDIO

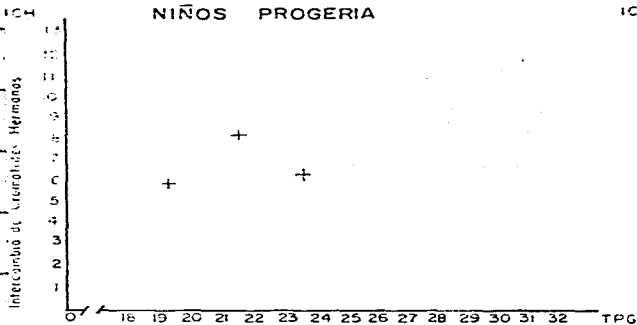
Grupo	TPG (\bar{x})	ICH (\bar{x})	AC (\bar{x})
PROGERIA	21.65	6.97	4.66
NIÑOS	19.39	4.63	0.83
JOVENES	22.75	7.64	0.24
SENILES	28.27	9.59	4.44

TPG = Tiempo Promedio de Generación
 ICH = Intercambio de Cromátides Hermanas
 AC = Aberraciones Cromosómicas

CORRELACION TPG & ICH

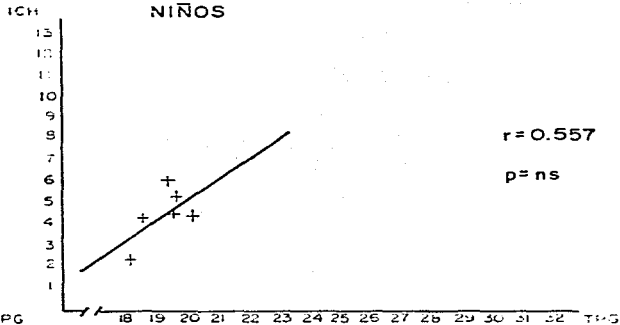
GRAFICA.42

NIÑOS PROGERIA



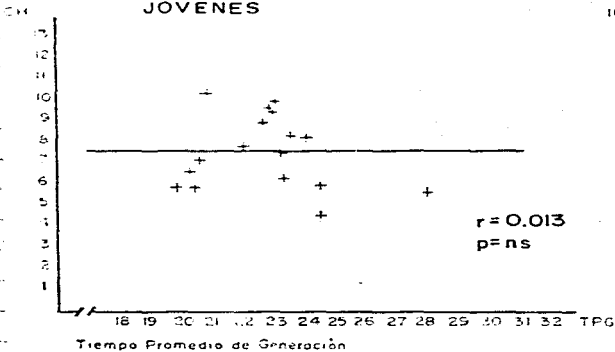
GRAFICA.43

NIÑOS



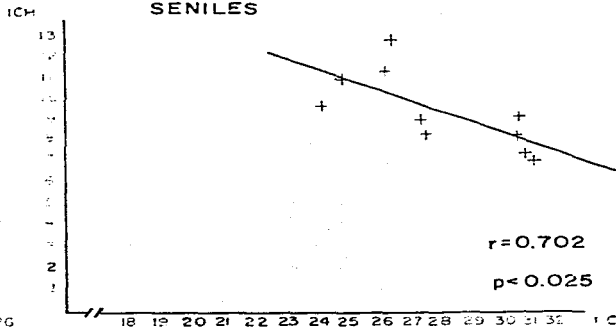
GRAFICA.44

JOVENES



GRAFICA.45

SENILES



VII. DISCUSION.

El rigor científico con que puede ser diseñada una investigación en el humano no es tan fácil de llevarse a la práctica, como sucede en el resto de las especies en las que podemos lograr un número de muestras iguales, ~~los~~ apareamientos experimentales y estudiar varias generaciones. En el hombre es la naturaleza quien verifica las experiencias y el hombre mismo el que decide si colabora o no para un mejor conocimiento de su especie, quedando - el investigador muchas veces como un mero registrador de datos - hasta el momento en que se presentan. Sin embargo, a pesar de todo los obstáculos, resulta compensatorio el esfuerzo, ya que es fascinante para el hombre conocerse por medio de sí mismo.

El cultivo de linfocitos de sangre periférica es un sistema de prueba que requiere relativamente poca infraestructura, la muestra de la cual obtención, es rápido, poco costoso y detecta varias parámetros citogénéticos: al utilizar fitohemaglutinina (FHA) se estimulan principalmente los linfocitos T, sus subgrupos de células T_H y T_H17 de la respuesta inmunitaria y se actualizan todo el organismo. El estudio citogénético de los linfocitos T, que con poca inversión económica y técnica se va un importante contribución en la patología del envejecimiento por medio de obtener un mayor conocimiento y entendimiento de los mecanismos del envejecimiento natural y patológico.

Durante esta investigación, los parámetros citogénéticos que se evaluaron fueron:

1. Tiempo del ciclo celular (Frecuencia basal del TSG).
2. Frecuencia basal del Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH).
3. Frecuencia basal de Aberraciones cromosómicas (AC).
4. Efecto del estímulos de la FHA medido por AC.
5. Relación del Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICH) y la duración del ciclo celular (TSG).

a. TIEMPO DEL CICLO CELULAR (RESUMEN DE LA PARTE DEL TFG).

Los estudios del tiempo del ciclo celular en humanos se han hecho fundamentalmente en fibroblastos y linfocitos en cultivo, los datos muestran una variación con un rango de 10 a 30 hrs. y en promedio 18 hrs. (46-58), esta variabilidad se debe probablemente a las condiciones metodológicas, siendo también fuente de variación de los datos el tipo de análisis.

El tiempo del ciclo celular en el presente trabajo fue analizado, utilizando el método gráfico propuesto por Dutrillaux y Trosse (59) y con los mismos parámetros con un método matemático diseñado por nuestro grupo (Ruán y Palma), utilizando el método propuesto por Ivatt y Tice del tiempo promedio de generación (TPG) para la determinación y comparación estadística.

El método de Dutrillaux y Trosse (59) que también otros han empleado (227) para el análisis estadístico del tiempo del ciclo celular no pudo aplicarse en el caso individual por la insuficiencia de células en 2^a división al no alcanzar el valor del 50% requerido para el procedimiento. Cabe hacer notar que cuando no se pudo aplicar gráficamente por el método de Dutrillaux y Trosse pudo aplicarse para la obtención matemática el método de Ruán y Palma.

En cada uno de las gráficas individuales de los niños normales se obtuvo por ambos métodos el tcc (gráficas 4-9, tabla 3) y su media del tcc por grupo (gráfica 10, tabla 3). El tcc para los niños normales fue de 12.46 hrs., lo cual es comparable con los tiempos descritos por otros autores para linfocitos normales que utilizan un método similar (47, 58, 228).

En cuanto al tcc de los niños progeria este pudo ser obtenido en cada uno de los individuos, pero ^{la} media de los tcc individuales no correspondió al tcc gráfico o matemático y esto se explica, porque al bien las curvas de 2^a división alcanzan un valor del 50%, este se encuentra en diferente hora o punto de cosecha, por lo cual el valor de tcc no es confiable.

Tratando de relacionar los costos de la proliferación o cinética celular con la edad y fisiología de individuos normales y con el síndrome de progeria nuestro laboratorio en un estudio piloto controló los resultados por medio de análisis discriminante por el método, el cual toma en cuenta todas las características clínicas y resultados citogenéticos de los individuos de los cuatro grupos formando un mapa territorial con contornos y horizontales de localización para cada grupo, mostrando los niños, niñas, un tiempo de ciclo celular con la duración mínima, los índices intermedios, los niveles de células y los pacientes que presentarían un tiempo intermedio entre los niños y los niñas. Probo que este análisis no es la duración del ciclo celular en horas y que al igual que otros modelos propuestos con puntuación (43, 30, 41), no son esenciales de cooperación si no se tiene un programa, se eligió determinar el tiempo del ciclo celular con base en el tiempo promedio de generación (TPG), método propuesto por Ivatt y Rice (32), el cual toma en cuenta cada uno de los puntos de control, los índices de replicación que concuerdan a las diferentes poblaciones celulares y el tiempo de cultivo en presencia de la BrdU incorporada. Con estos TPG se realizó el análisis estadístico formando los horizontales de distribución para relacionar el ciclo celular con la edad y el envejecimiento prematuro.

Las diferencias en la cinética de proliferación celular en cada uno de los individuos de los cuatro grupos de estudio (gráficas 1-36) pudo deberse intragrupalmente a una predisposición genética que les daría una susceptibilidad diferente a la respuesta de proliferación o una eficiencia fisiológica que cambia según el estado clínico de estos individuos aparentemente sanos, que pueden estar respondiendo a algún agente biológico, químico o físico.

Cabe mencionar que en uno de los individuos jóvenes en que se evaluó su cinética celular en cuatro muestreos a lo largo de 5 años (gráficas 17, 19, 23 y 25), llama la atención que al aumentar la edad del individuo estudiado aumenta el TPG, encontrándose un TPG mínimo de 20.42 y uno máximo de 23.22 (individuos 8, 10, 14 y 20 de la tabla 5). Variaciones en la respuesta de la litocentrifugina (PEA) en un mismo individuo en muestras repetidas en tiempos cortos han sido informadas por otros autores (53, 230), los cuales opinan que estas diferencias pueden deberse a cambios sutiles de la respuesta inmunológica, la cual se vería reflejada en la actividad de proliferación de los linfocitos. Nosotros consideramos además que como el TPG máximo se dió en el mismo individuo a mayor edad, esto pudiera deberse por efecto de la edad en el TPG. Si bien este hallazgo es sólo en un individuo sería de interés el analizar el efecto de la edad y la contribución genética individual para los cambios en la duración del ciclo celular con más detalle realizando un estudio longitudinal desde una edad temprana hasta avanzada en un mismo individuo o genotipo, lo cual permitiría una evaluación de las variaciones de la eficiencia fisiológica y de las distintas adaptaciones en los seres durante el desarrollo y el envejecimiento. El análisis operacional de la forma de las curvas de 1^a, 2^a y 3^a división celular en la sinóisis celular de cada uno de los individuos (gráficas 1-33), nos muestra patrones muy definidos en el caso de los niños normales (gráficas 38) y en los seniles (gráfica 40). La cinética celular de los niños nos hace suponer que antes de la incorporación de la BrdU existían células en tránsito, es decir estaban dividiéndose o comenzaban a dividir tempranamente y que además un número mayor de subpoblaciones celulares de linfocitos responderían a la acción de la litocentrifugina (PEA), ya que hay un buen número de células en 2^a o 3^a división a tiempos de cosecha temprana, lo que trae como consecuencia una proliferación celular más rápida comparativamente.

En cuanto a la cinética celular de los seniles en comparación con el resto de los grupos éstos pudieran poseer el menor número de células en tránsito y una menor cantidad de subpoblaciones celulares de linfocitos que responden a la fitohemaglutinina, ya que las células en 2ª y 3ª división aparecen también en el cultivo de cosechas post-incorporación BrdU, ocasionando un incremento del ciclo celular lo cual se evidencia por el mayor TPE en todos los tiempos de cosecha en el grupo (gráfico 11) y su medida en los TPE individuales (tabla 6). Por otro lado se debe tener en cuenta en la curva de 1ª división que algunas células que están en cinética o no lo están sinte- tizan ADN en cultivo, por lo que se visualiza en la cinética celular una gran cantidad de células en 2ª división en las diferentes horas de cosecha, la replicación post-trépano y el porcentaje bajo de células en 2ª y 3ª división. No se pueden correlacionar los hallazgos del presente trabajo en cuanto a la división celular de la cinética de una con interacciones en la duplicación o en la reparación del ADN, sin embargo la proliferación celular posterior puede haberse de cambio en la expresión y control de la proliferación por el genotipo y la edad, que se reflejan en un aumento fisiológico de invasión hacia la fitohemaglutinina que está como antígeno.

A pesar de la variabilidad en la cinética celular en los diferentes individuos (gráficos 1-35), que puede explicarse por la activación de diferentes poblaciones celulares por la fitohemaglutinina (FHA), se puede sugerir una homogeneidad relativa en cada grupo de estudio, ya que los TPE fueron estadísticamente diferentes y significativos en los individuos normales niños, jóvenes y seniles, observándose que a mayor edad en grupo, mayor TPE, no así en los niños con progeria, los cuales presenta

ron en la atribución estadística de traslape tanto con niños - como con jóvenes y seniles, en los que se puede sugerir una mayor heterogeneidad celular.

Los tiempos promedio de generación (TPGs) sugieren que la proliferación subsiguiente a la activación celular con la fitohemaglutinina (PHA) posee una velocidad diferente a lo largo del tiempo en el cultivo, encontrándose que el TPG es un poco menor en las primeras horas de cultivo, mientras que las células que permanecen en cultivo más tiempo tienden a que el TPG sea mayor (tabla 5, gráficos 41). Esto concuerda con el trabajo de Pace en linfocitos (228) y con los estudios de cinematografía en fibroblastos de Sollyn (231).

La velocidad de proliferación media en TPGs de los niños presentó un comportamiento diferente, ya que en las primeras horas de cultivo presentó un tiempo máximo, teniendo un traslape en los jóvenes y seniles, disminuyendo posteriormente y manteniendo su velocidad de proliferación entre los TPGs de niños y jóvenes, esto puede deberse a una habilidad diferente de las células de responder al mitógeno.

El incremento en la duración del ciclo celular se ha relacionado con la edad, tanto en estudios in vivo como in vitro; In vivo, en poblaciones celulares renovables principalmente en ratón (232-235) y in vitro en fibroblastos humanos, en función del número de recultivos (236, 237) o en linfocitos en función de la edad del donador (228, 238, 239). Los datos no permiten concluir acerca de cual fase del ciclo es la que se está alargando o si son todas. Algunos autores señalan a la G₁ como responsable de este atraso, puesto que es en ella donde principalmente radica la regulación e inicio de la cascada de reacciones bioquímicas para el ciclo celular (233, 236, 237, 240-245).

si esta es el cierto y extrapolando a los linfocitos los resultados de las estimaciones realizadas en fibroblastos en los que se ha observado que las diferencias son de ligeros en la longitud del período G_1 se deben a la falta de algunas genes para entrar a ser inducidos por G_2 (9, 240, 244, 245), podría suponerse que - por lo tanto - el tipo celular en estudio en forma similar los - otros tipos celulares con el caso.

El hecho de que el TFG sea más rápido en los niños puede explicarse a la luz de que hay una programación genética para una proliferación celular en el momento del crecimiento postnatal y también de la inmunología inmadura que se inicia, el cual - es muy notable, al estar estudiando la presencia de inmunoreactivos específicos por primera vez, lo que provoca proliferación - acelerada del linfocito y por consiguiente una mayor disponibilidad de los factores de crecimiento tales como las interleucinas. Ciertamente lo anterior debe ser confirmado en forma experimental tanto in vivo como in vitro.

Los resultados de la cinética celular en los seniles medida por los TFG, muestran una disminución de la capacidad de los linfocitos para reconocer la PHA, y así aparentemente actúa con una actividad mitogénica reducida, lo cual concuerda con información sobre el defecto en células T y los factores de crecimiento en los casos en el envejecimiento (191, 194).

Es importante hacer notar que las células en cultivo tan solo se multiplican hasta un número definido de subcultivos generalmente 50, después de los cuales no continúa la proliferación, - por lo tanto se ha propuesto al que el envejecimiento y la muerte es un programmedo genéticamente.

Muchas de las características de las líneas celulares de fibroblastos utilizadas como modelo de estudio para el envejecimien

to (S), por lo que en algunos casos se han observado cambios en la regularidad del crecimiento con los cambios de medio de cultivo. Otros autores han observado en las células de mamíferos que los cultivos en suspensión se utilizan. Datos estadísticos son:

- 1.- El tiempo de latencia de división varía considerablemente en cultivo.
- 2.- El crecimiento en la fase G₁ de células de mamíferos en fase de suspensión.
- 3.- Las células capaces de ciclar, después de su actividad proli-ferativa, muestran un crecimiento que casi en su totalidad es de crecimiento.
- 4.- El envejecimiento in vitro de estas células está relacionado por una declinación exponencial en el porcentaje de la población capaz de sintetizar ADN y un incremento en el tiempo de ciclo celular.
- 5.- El incremento primario en el tiempo de ciclo celular ocurre en la fase G₁, lo cual propiamente se prolonga hasta que las células eventualmente llegan a detenerse.
- 6.- Evidencias en varias líneas celulares sugieren que las células seniles que están en división, por lo menos en la fase G₁ tardía más que en la fase G₀, como entrarían las células en reposo. Estas evidencias son:
 - a) El nivel de actividad de timidina cinasa (TK) en las células seniles, en los cultivos que proliferan lentamente en células: las células de las células jóvenes que se dividen rápidamente.
 - b) El aumento en la cantidad de unidades de timidina cinasa de la síntesis de ADN es similar en las células jóvenes y seniles.
 - c) El patrón de fluorescencia nuclear de las células seniles después de la tinción con tetracina (tetra) es similar a la típica de células que están bloqueadas en el G₁ tardío o en el límite de los periodos G₁/S.

en el caso de trabajo al comparar las velocidades de los EPGs de los niños con progeria con los de niños normales se encuentra por tanto diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, se debe decir que los individuos progeria que se pudieron estudiar y si - bien en un grupo de progeria con los 3 grupos normales, al analizar los EPGs individuales podemos observar que el individuo que presentó el TPG más bajo y comparable con los valores de los EPGs individuales de los niños normales (tabla 6), este puede estar influyendo para el trabajo con los niños norma - les, cuando se explica su suena respuesta proliferativa por - tar el "mejor" estado clínico o el menos afectado, ya que tie - ne la misma edad cronológica que el que tuvo el TPG más alto en el grupo de progeria.

Pensando que un número mayor de individuos progeria inclinaría - nuestros datos hacia un TPG estadísticamente diferente y signifi - cativo del de los niños normales, esto con base a los TPGs de - los individuos 2 y 3 en que su media estadística de TPG es seme - jante a los jóvenes (tabla 6), y por que el TPG de los niños pro - geria estudiado en el tiempo de 30 hrs. de cosecha por grupo (ta - bla 5 y gráfica 41) presenta un valor ~~menor~~ más alto que la me - dia (\bar{X}) del grupo de jóvenes normales. La sensibilidad de los - linfocitos de niños con progeria a la activación con la fitohema - glutina (PHA) es menor que la de los linfocitos de los niños - normales en los primeros horas de cosecha (tabla 5 y gráfica 41), lo que indica que puede existir un defecto en la fase G₁ del ci - clo del ciclo celular de los defectos genéticos que afectan la res - puesta proliferativa, ya que ha sido señalado por algunos autores que en el ciclo celular puede encontrarse una respuesta alterada al factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) el cual actúa en G₁ y en fases posteriores con actividad insulínica de plasma humano (HPA) los cuales se relacionan con la estimulación de la síntesis de - ADN (17, 21, 215).

b. FRECUENCIA BASAL DEL INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS (ICH).

Al igual que la conversión del ciclo celular, la frecuencia basal de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) en linfocitos humanos está influenciada por los factores genéticos (59, 21-22), físicos, químicos y químicos (27-33), en condiciones fisiológicas normales de vida. Además de la edad total, se han reportado diferencias y leucocitos sanguíneos de plasma (53, 129). El presente estudio comparará la frecuencia de ICH con los resultados globales de diferencias de ICH reportados en la literatura en grupos de estudio niños, jóvenes y seniles.

Existe controversia en cuanto a cómo influye la edad de individuos sanos en la frecuencia de ICH (123). Al usar reportes informan que la edad afecta la frecuencia basal de ICH (123-131) y otros estudios señalan firmemente que el nivel basal de ICH es más bajo en individuos jóvenes, comparado con los individuos de mayor edad (122, 129, 132-134).

Nuestros resultados muestran una frecuencia de ICH más baja en los niños y con una diferencia estadísticamente significativa con el grupo de jóvenes y adultos. Debe señalar, que hay otros estudios en niños y adolescentes que muestran un aumento de la edad de Dar y más (132), así como que la frecuencia de ICH varía en función de la edad, incluso los niños que representan la edad más joven.

Con relación a los resultados obtenidos en jóvenes y adultos en quienes se han reportado diferencias estadísticas significativas en la frecuencia basal de ICH, el hallazgo está de acuerdo con los informes en los que se reporta un aumento en el nivel de ICH en individuos sanos por incrementar la frecuencia de ICH (123-131).

Este punto merita cierto detenimiento, ya que aunque nuestros resultados no muestran diferencias estadísticamente significativas, los datos estadísticos muestran algunas diferencias. Ahora bien, al utilizar nuestros datos con la prueba de análisis de varianzas (ANOVA) y de comparación múltiple de Newman-Keuls resultaron las siguientes asociaciones:

H & A $p < 0.025$

H & S $p < 0.001$

H & P $p = ns$ (no significativo)

J & S $p < 0.01^*$

J & P $p = ns$

S & P $p = ns$

Con lo cual nuestros resultados estarían de acuerdo con aquellos que indican que la edad afecta la frecuencia basal de ECH, siendo más baja en los niños y aumentando gradualmente en los jóvenes y seniles (122, 133 - 136).

Es difícil satisfacer todos los supuestos y requisitos para realizar una prueba estadística, en lo que se refiere al análisis de varianzas los mismos requisitos consisten en que se asuma una aproximación en lugar de estar exacta (225, 226). Para por datos cumplen con los requisitos de ser datos independientes, tener una escala de medición continua, las varianzas son homogéneas y el requisito faltante es el de que los datos no muestren una distribución normal, se hubiera podido normalizar los datos, como algunos autores lo recomiendan (240), pero se prefirió manejar los datos con la frecuencia de ECH/célula como lo reportan la mayoría de los informes y se analizaron con la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y la de U de Mann-Whitney para comparar grupos de 2 en 2.

Lo anterior comprueba que si bien la estadística es un elemento indispensable para el análisis de datos científicos, estos deben tomarse con cierta cautela, pensando más bien en el significado biológico del fenómeno que estamos estudiando. Por supuesto que

nuestra diferencia en el número de individuos para cada grupo puede estar afectando a los resultados estadísticos obtenidos, pero es difícil en poblaciones humanas y particularmente en algunas entidades clínicas como ya se ha comentado, homogenizar las muestras en los grupos de estudio.

Un trabajo muy interesante que apoya lo anterior es el de Waksvit (135) en el que estudiando un número mayor de sujetos, con solo dos poblaciones una de jóvenes (18 casos) y otra de seniles (24 casos), encontró que la media (\bar{X}) de ICH para jóvenes era de 6.8 y para seniles de 8.0, existiendo con análisis de varianzas una diferencia estadísticamente significativa, como podría haberla en nuestro grupo en que la frecuencia para los jóvenes fue de $\bar{X} = 7.64$ y para los seniles 9.59 al manejarlos con este mismo método y aislando los dos grupos del resto estudiado.

De cual de ellas manera, es recomendable el aumento y homogenización de la muestra tanto para confirmar nuestros hallazgos como para la mejor relación del método estadístico.

Si en realidad no existen diferencias reales y estadísticamente significativas entre los ICH de jóvenes y seniles e inclusive los jóvenes tienen un valor más alto de ICH/célula que los seniles, no obstante autores han informado (135), podemos pensar que durante la etapa de la juventud, los anticuerpos ya se han expuesto a una gran variedad de agentes tanto ambientales, entre los que se encuentran los mutagénicos y han acumulado un número de mutaciones tal que puede elevar y aumentar el ICH con respecto a los niños, pero estas mutaciones que no han sido anuladas con la edad y que pudieran expresarse en los ICH, pudieran sin embargo, no expresarse porque, como ya se discutió, hay una disminución en la capacidad de los linfocitos para procesar la fitohemaglutinina (PHA) y una actividad mitogénica disminuida (191-194). Esto

ocurre solo en ciertas clones, y que se ha visto que la proporción de subclones de linfocitos varía con la edad (193, 194), por lo que podemos suponer que las células más dañadas o en que se encuentran alterados sus mecanismos para progresar en el ciclo celular (específicamente G_1), o para la síntesis o reparación del ADN, son las que no responden al estímulo incorporando, por lo que no incrementarían la elevación de ICH en los seniles.

La formación de ICH está relacionada principalmente con la fase de síntesis del ciclo celular y como durante la niñez existe una muy importante proliferación celular con el fin de aumentar la masa corporal, se puede pensar que las células poseen su máxima eficiencia en cuanto a los mecanismos de síntesis del ADN, lo que explicaría la baja frecuencia de ICH en los niños y su incremento en los adultos jóvenes y seniles, cuando disminuye la proliferación celular.

Estos resultados podrían apoyar el hecho de que el fenómeno de producción de ICH está relacionado más con la síntesis del ADN que con su reparación.

Se ha planteado que la duración del ciclo celular afecta la frecuencia de ICH (247). Los datos obtenidos de los TPE e ICH en las diferentes etapas del desarrollo (tablas 6 y 7) mostró en los niños la correlación de $r=0.557$ (no significativa), es decir no hay correlación entre TPE e ICH, en los jóvenes sucede lo mismo, ya que $r=0.13$, no así en el grupo de seniles donde la correlación es inversa y además significativa, es decir al aumentar TPE el ICH disminuye, siendo su $r = -0.702$ y la significancia de $p < 0.001$ (Métodos de-45).

La correlación estadística no significativa en niños y jóvenes podría deberse al hecho de que los ICH se analizaron en las primeras horas de cosecha post-incorporación de 3H U (24 y 30 hrs.)

en que las poblaciones celulares de ambos grupos presenten los TFG menores, lo cual corresponde a una duración del ciclo celular de las más cortas que se observan a lo largo de la cinética celular (gráfica 41), las células de cosechas tempranas son poblaciones celulares en tránsito (243), muy eficientes en proliferar con el estímulo mitogénico y son las menos expuestas en tiempo a la BrdU que es citotóxica y causa por sí sola ICH (83-86), así las menos dañadas en sus mecanismos de síntesis o reparación del ADN, lo cual se ha relacionado con el fenómeno de preservación de ICH (74-82).

La correlación inversa y significativa en los seniles podría explicarse en su parte de que al estar alterada y disminuida la proliferación celular estimulada con fitohemaglutinina (PHA) sólo se detectaría los ICH en aquellas células que son más eficientes y logran activarse con la fitohemaglutinina (PHA). Los resultados de la frecuencia promedio de ICH por célula por los 2 tipos con progeria no presentaron diferencias significativas con las que de los grupos de individuos normales, existiendo en el momento de distribución estadística un traslape (según se ve 42), semejante al formado con las PHA (ver cuadro 4).

Ha sido reportado que el ICH presenta una frecuencia anormal en algunos procedimientos genéticos en donde probablemente los mecanismos de reparación no son eficientes (137-140) y dado que existen informes en individuos con progeria con una disminución en la capacidad de sus fibroblastos para reparar daño inducido por rayos X en una sola cadena de ADN (240) y de retraso en la velocidad de síntesis de ICH en individuos con envejecimiento prematuro (250), esperaba los encontrar una frecuencia total elevada en los niños progeria con respecto a los niños control y que fuera esta frecuencia de ICH de los progeria similar a jóvenes o seniles. Esto no se observó y

gudo cubren de nuevo, como en la determinación de los TPG, a que el número de individuos en el grupo de niños progeria dificulta el análisis estadístico, lo que constituye un problema que viene de mayoría de los autores dada la frecuencia tan baja del síndrome (199-200).

Nuestros datos coinciden con el libro respecto en cuanto a la frecuencia basal de IGH en progeria (220). Estos autores al igual que nosotros reportan diferencias no significativas con niños o con jóvenes. Además nosotros informamos por primera vez, ya que no existe ningún informe al respecto, que la frecuencia basal de IGH de los niños con envejecimiento prematuro o progeria no presentan diferencias estadísticamente significativas con los individuos envejecidos naturalmente o seniles.

De lo anterior podemos concluir que la frecuencia de IGH basal no se encuentra alterada en los tres pacientes con progeria y que si existen anomalías en los mecanismos de reparación del ADN y en la velocidad de replicación del ADN. Esto no se ve reflejado en la frecuencia de IGH en esta entidad genética que se ha propuesto como modelo para el estudio del envejecimiento.

c. FRECUENCIA BASAL DE ABERRACIONES CROMOSÓMICAS (AC).

El tipo y la frecuencia de aberraciones cromosómicas (AC) en cultivos normales y con BrdU en 1^a y 2^a división en cada grupo de estadio (tablas 8 y 9, esquema 3), se evaluó en las primeras horas de cosecha para medir en lo posible el efecto basal de la edad y el citotóxico de la BrdU en las AC, ya que se sabe que todo cultivo comienza con "células no comprometidas" con el proceso de senescencia y que al paso de cierto número de subcultivos éstas se comprometen "an vitro" con el proceso (153, 157, 159, 251). Las AC encontradas en los diferentes grupos de estudio (tabla 8) fueron principalmente de tipo inespecíficas: brechas (gp), isocrecchas (isogap), delecciones cromosómicas (cr) y cromosómicas (cs), fracturas (frag), tetraploidías (tetra), aneuploidiasaciones (-) (enlo) y aneuploidías de tipo monosómico (-1).

Con base en los modelos que existen del mecanismo de producción general de las aberraciones (figuras A3-4 - A3-8), se puede apreciar que se detectaron tanto las ocurridas en la etapa G₁ del ciclo celular, como las cromosómicas se encuentran en forma monocromática (ej. isobrechas, delecciones cromosómicas), como las producidas en la etapa G₂ en cromosomas dicromáticos (ej. brechas, delecciones cromosómicas) y durante la división celular o mitosis (ej. tetraploidías, aneuploidiasaciones y aneuploidías). La frecuencia basal de AC en individuos normales (tabla 10, esquema 4c) de cultivos normales sin BrdU, observada en el presente estudio fue menor y no es significativa en jóvenes y jóvenes normales y fue significativamente mayor en los seniles, lo que concuerda y apoya lo descrito previamente en el sentido de que en las diferentes etapas del desarrollo humano pueden existir cambios cromosómicos y que la edad de un individuo está relacionada con la variación en la frecuencia de AC espontáneas o inducidas de las células in vivo o in vitro (252-253). Existen también evi

dencias en otros organismos de que las Δ aumentan con la edad (259-261). Esto permite pensar que tanto en el envejecimiento natural como en el prematuro los mecanismos de reparación celular son menos eficientes y las células más susceptibles a sufrir daño a causa de agentes clastogénicos, lo cual refuerza la teoría que afirma que el ciclo vital depende de la herencia y de las circunstancias en que se desarrolla esa programación genética en los propios genes de cada individuo.

En la tabla 6 resulta el hecho de haber encontrado un porcentaje mayor de brechas e incisiones en cultivos sin brujá de seniles en comparación con el resto de los grupos normales. Como no se conocen el significado biológico y los mecanismos íntimos de producción para las brechas e incisiones podría considerarse que la edad afecta al mecanismo de síntesis e insula e reparación lo por un mecanismo no establecido aún y de la formación de estas brechas, como ya se ha sugerido (262), pueda afectar el número y la función celular, llama la atención que también en este grupo existe un mayor número de aberraciones del tipo de tetraciclitas, endorreducciones y aneuploidías. Con respecto a las otras alteraciones se debe decir que se encuentran distribuidas indistintamente en los diferentes grupos y puede considerarse que cada individuo aún siendo más o menos expuesto a mutágenos y responde de manera distinta a los diferentes agentes medio ambientales con los que tiene contacto.

En cuanto a los resultados en los cultivos sin brujá de niños con progeria (tabla 10, cuadro 40) podemos ver que la frecuencia basal de Δ es semejante y no significativamente comparable con el envejecimiento natural, por lo que se puede suponer que cualquiera que sea el mecanismo que intervenga para prevenir daño clastogénico, se encuentra alterado en los dos grupos y muy probablemente en forma similar, ya que en ambos se observó tan

bien un número mayor de brochas e isobrochas. Esto es de interés, porque siendo la progeria un modelo de estudio del envejecimiento cabe estudiarse más detalladamente, ya que solo existe un informe sus bases de la existencia de AG, entre las que se incluyen la presencia de lesiones de varias translocaciones e hipocaplicias en cultivo de fibroblastos (203).

Las diferencias globales de AG en los diferentes grupos de estudio (tabla II) así como el total de 303 células estudiadas en cada individuo tanto de cultivos sin y con adición de BrdU en 1^a y 2^a división mostraron diferencias estadísticas entre los grupos. Tal como ocurrió en la frecuencia basal de AG, los niños normales y jóvenes tienen frecuencias similares, pero los niños con progeria no difieren estadísticamente ni con los niños normales ni con los seniles. Esto puede ser explicado por sus como vemos en el esquema 3, las frecuencias basales de AG en cultivos sin BrdU de progeria y seniles son estadísticamente similares, pero no así el dato de los datos de la BrdU ya que en los cultivos con BrdU en 1^a división, la BrdU no parecería ser tan mitotómicamente en los individuos con progeria. En la mayoría de los estudios acerca del efecto de la BrdU in vitro se ha demostrado su citotoxicidad, por lo cual nos inclinamos a pensar que la frecuencia de AG que entre los sobrevivientes corresponden a células células menos sensibles y capaces de dividirse. Esto puede ser sustentado con base al estudio preliminar en que se midió la duración del ciclo celular por la inclusión con BrdU y por el índice mitótico, el cual se encontró disminuido en los niños progeria con respecto a sus controles en casa (229).

d. EFECTO MITOTICO DE LA BRDU LLIBDO POR ABERRACIONES CROMOSOMICAS (43).

El número de aberraciones cromosómicas en los grupos de los individuos normales niños y niñas fue significativamente más alto en los cultivos con BrdU que en los cultivos normales, lo cual de nuevo es el efecto citotóxico de la BrdU.

El número de aberraciones cromosómicas en células en metafases de primera división fue de segunda en los cultivos con BrdU - (esquema 3, tabla 14), por lo que coincide con reportes previos (264) de que el caso citotóxico debe ser analizado y regido en metafases de primera división en cultivos in vitro con BrdU lo cual concuerda con la experiencia citogenética de que en cultivos normales debe usarse el caso citotóxico o la presencia de un marcador en cultivos de 48 horas y no en los de 72 hrs. en donde usualmente se realizan los estudios citogenéticos de rutina.

Las cifras no significativas de las frecuencias (tabla 12) de las ab de cultivo normales y cultivos en 1^a división con BrdU y de 1^a a 2^a división en cultivos con BrdU, puede sugerir como se parte ya se mencionó, que el número de progenia presenta una mayor fase latencia tóxica a factores físicos - (como la BrdU así estudiada) y que las células de los normales aunque presentaron una resistencia como más pronto a la BrdU en 1^a división, toleran mejor el caso y puede haber menos muerte celular y menor efecto citotóxico por la BrdU.

Tanto la frecuencia basal (esquema 4b) como la frecuencia global (tabla 11) nos muestran en un mismo momento de distribución estadística a los jóvenes y niñas y llama la atención que inclusive la media aritmética de los jóvenes es menor (tablas 10 y 11). Una explicación para este hecho no es obvio, es que

Los jóvenes presentan un sistema inmunológico de alerta y mecanismos celulares entre los cuáles estarían los de síntesis y reparación del ADN mucho más masivos o funcionales que el de los niños y mucho más eficientes que el de los seniles para poder contrarrestar los efectos de agentes clastogénicos. Así mismo es el único grupo que presenta una diferencia estadísticamente significativa y mayor entre los cultivos de 1^a división a 2^a división con BRAU, lo cual puede deberse a un efecto tóxico citotóxico por inhibición de la BRAU en las células en división suando al mecanismo de envejecimiento celular in vitro.

e. RELACION DEL INTERCAMBIO DE GRUPOS TIPOS HEMBRAS (ICH) Y LA DURACION DEL CICLO ESTRAL (TPG).

Los horizontes de distribución estadística del esquema 4 y las medias aritméticas (\bar{X}) de los datos generales de la tabla 13 - obtenidos en los diferentes grupos de estudio para las acciones realizadas en el presente trabajo como son el tiempo promedio de generación (TPG), intercambio de prométicas hembras - (ICH) y aberraciones cromosómicas (AC) - muestran que los TPG y los ICH están directamente relacionados, es decir, a mayor TPG mayor ICH, por lo que se hizo un análisis de regresión lineal entre los dos parámetros para determinar si existía tal correlación: en los niños se realizó por un bajo número de casos no se obtuvo la línea de regresión; en los niñas la correlación fue de $r=0.557$, no significativa, es decir sin correlación ICH e ICH; en los jóvenes sucedió lo mismo, ya que $r=0.013$ pero no así en el grupo de los hembras donde la correlación es inversa y además significativa, es decir, al aumentar el TPG, el ICH disminuye ya que a tal efecto se obtuvo una $r=0.702$ y un $p < 0.02$.

Estos resultados no muestran de manera general que no existe relación entre la duración del ciclo estral medida en el presente estudio por TPG basal y el ICH basal, pero sí que los dos parámetros se encuentran alterados y aumentados en los individuos seniles, lo mismo que las aberraciones cromosómicas.

f. ABERRACIONES CROMOSÓMICAS Y CICLO CELULAR.

La falta o el exceso de un cromosoma o parte de él puede trastornar el balance génico ya que faltan o sobran cientos de genes que podrían entorpecer la síntesis de proteínas, otros que podrían actuar como reguladores de funciones de genes estructurales o bien que podrían regular las vías de genes sobre los procesos de letalidad o inhibiciones celulares de la división y el ciclo mitótico. Por tanto en la literatura no son concluyentes, sin embargo queda remarcando que las aberraciones cromosómicas que se producen por anomalías cromosómicas, pueden afectar el tiempo de ciclo celular y las tasas de proliferación celular.

g. ABERRACIONES CROMOSÓMICAS E INDUCCIÓN DE UN INICIO MUR-RIAS.

Por la producción de aberraciones cromosómicas realizadas en cultivos marcados con brdU, expuestos a diferentes agentes físicos, se han desarrollado otras hipótesis acerca del mecanismo de producción de IIR. Así se ha postulado que el IIR puede originarse por lo menos por dos diferentes mecanismos, el primero ocurriría en el momento de la re-iliación y el segundo en un lapso inmediato a la post-reiliación del ADN, probablemente en una forma similar al modelo de producción del entrecruzamiento en los eucariotes. Algunos resultados que tratan de las delecciones cromosómicas son el resultado de la falla de producir un IIR originado a través de estos mecanismos. De cual manera todos los modelos que se han propuesto para la producción de IIR están relacionados con el fenómeno de revivimiento de las cadenas de ADN, de ahí la importancia de buscar la relación entre aberraciones cromosómicas e IIR.

VIII CONCLUSIONES

Existe variabilidad en la cinética de proliferación celular individual, pero con un comportamiento de homogeneidad relativa en cada grupo. observándose que a mayor edad en grupo, mayor duración del ciclo celular (medido en tiempo promedio de generación, T_G).

El nivel basal de intercambio de cromátidas hermanas (ICH), es más bajo en los niños que en los individuos normales de mayor edad. A pesar de no haber encontrado diferencias significativas entre los jóvenes y los seniles, puede inferirse con base en los resultados de la cinética celular (T_G), que en las células de los seniles se encuentran alterados - los mecanismos para progresar en el ciclo celular, de síntesis o reparación del ADN y que la lesión puede resultar citotóxica, ocasionando muerte celular y otros fenómenos de elevación de ICH en los seniles.

No hay correlación significativa entre los T_G e ICH, sin embargo, los T_G varían en relación directamente proporcional con los ICH conforme aumenta la edad de los grupos de estudio.

La frecuencia basal de roturas de los cromosomas (RC) en individuos normales es menor y no significativa en niños normales y jóvenes y es significativamente mayor en los seniles.

Los linfocitos de individuos con envejecimiento prematuro o progeria tienen un tiempo de ciclo celular (TFC), y un número de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) distinto al de los niños normales, ya que si bien estadísticamente las diferencias no son significativas, existe un traslape con jóvenes y seniles y el número de aberraciones cromosómicas (AC) es significativamente mayor que el de las células del grupo de niños normales. Esto permite suponer que algunos mecanismos del ciclo celular en el envejecimiento natural y en el prematuro están alterados y probablemente en forma si milar.

Estos resultados favorecen la teoría de que el envejecimiento y el ciclo vital dependen de la herencia y de las circuns tancias en que se expresa la programación contenida en el genoma de cada individuo.

A manera de epiflogo:

Después de que cada ser humano ha trabado lazos íntimos con su familia y sus amigos, de haber logrado una superación académica, y una estabilidad financiera, y alcanzado cierta madurez, resultando todo esto fructífero para sí mismo y los que lo rodean, se encuentra atrapado en una inexorable decadencia, en un cuerpo que degenera, una vitalidad que disminuye y una capacidad mental que se esfuma, hasta llegar finalmente a la nada, aunque se haya vivido con cierta plenitud. Parece que la vida apenas ha empezado cuando ya se acaba. Individualmente esto puede llegar a ser una tragedia, pero para la naturaleza es algo indiferente, ya que ella misma ha programado la maquinaria genética en todos los seres vivos para la muerte, la cual desde siempre ha sido una característica necesaria para la misma vida, puesto que sólo cuando son exterminadas las modalidades más viejas y menos eficientes de vida, pueden entrar en acción y multiplicarse organismos mejor adaptados, transmitiendo nuevos rasgos adaptativos a generaciones futuras y favorecer el proceso evolutivo. Como podemos ver, después de una vida plena y acorde con la naturaleza:

" EL ENVEJECER TIENE MUCHAS VIRTUDES ".

IX. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Howard D. y Pelc BR. Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity*, London 1953; 6(supl): 261-273
- 2.- Mitchison JM. The biology of the cell cycle. Cambridge University Press, Cambridge 1971; pp. 313
- 3.- Prescott DM. Reproduction of Eukaryotic Cells. Acad Press New York U.S.A. 1976; 1-177
- 4.- Kojima I., Nishimoto I. y Matsunaga H. Role of calcium influx in the mitogenic action insulin-like growth factors. En *Growth Factors, Cell Growth and Differentiation*. Institute of Endocrinology, Gunma University, Ed. Center for Academic Publications Japan and Utrecht, VSP Science Press BU, Tokyo 1988; 21: 69-80
- 5.- Hoshijima M., Kawahara Y. y Takai Y. Negative actions of protein kinase C in the regulation of cell proliferation. *Growth Factors, Cell Growth and Differentiation*. Institute of Endocrinology, Gunma University, Ed. Japan and Utrecht, VSP Science Press BU, Tokyo 1988; 25: 51-68
- 6.- Baserga R. The biology of cell reproduction. Harvard University Press, Cambridge 1985; pp. 251
- 7.- Baserga R. Molecular biology of the cell cycle. *Int J Radiat Biol* 1988; 49: 219-226
- 8.- Eplifanova OI. y Polunovsky VA. Cell cycle controls in higher eukaryotic cells: Resting state or a prolonged G1 period? *J Theor Biol* 1986; 120: 467-477
- 9.- Rittling SR., Brooks KM., Cristofalo VJ. y Baserga R. Expression of cell cycle-dependent genes in young and senescent WI-38 fibroblasts *Proc Nat Acad Sci USA* 1986; 83: 3316-3320
- 10.- Czerniak B., Herr F., Werten RP. y Koss LG. Expression of Ha-ras oncogene p21 protein in relation to the cell cycle of cultured human tumor cells. *Am J Pathol* 1987; 126: 411-416
- 11.- Lacy J., Sarkay SN. y Summers WC. Induction of C-myc expression in human B lymphocytes by B-cell growth factor and anti-immunoglobulin. *Proc Nat Acad Sci USA* 1986; 83: 1458-1462
- 12.- Campisi J., Gray HE., Pardee AB., Dean M. y Sonenshein GE. Cell-Cycle control fo C-myc but no C-ras expression is lost following chemical transformation. *Cell* 1984; 36: 241

- 13.- Land H., Parada LF. y Weinberg RA. Cellular oncogenes and multistep carcinogenesis. Science 1983; 222: 771
- 14.- Yamamoto T. Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. Nature 1986; 319: 230
- 15.- Sap J., Muñoz A., Dawn K., Goldberg Y., Ghysdad J., Lentz A., Beng H. y Vennstrom B. The c-erb-A protein is a high-affinity receptor for thyroid-hormone. Nature 1986; 324: 635
- 16.- Black A., Freeman JW., Zhou G. y Busch H. Novel cell cycle related nuclear proteins founded in rat and human cells with monoclonal antibodies. Cancer Res 1987; 47: 3266-3272
- 17.- Sans J., Gimenez-Martin G. y De la Torre C. Onset of cell proliferation in dormant roots of Allium cepa L. Bulbs Kinetic Analysis. Biologia Celullaire 1980; 36: 95-103
- 18.- Baserga R. Molecular biology of the cell cycle. Int J Radiat Biol 1986; 49(2): 219-226
- 19.- Pardee AB. Biochemical and molecular events regulating cell proliferation. J Pathol 1985; 149: 1-2
- 20.- Holliday R. Ageing: X-chromosome reactivation. Nature 1987; 325: 661-662
- 21.- Rao PN. y Adlakha RC. Chromosome condensation and decondensation factors in the life cycle of eukaryotic cells. En: Mediators in cell growth and differentiation. Ford RJ and Maizel A. Eds. Raven Press, New York 1985; pp. 45-69
- 22.- Kihlman BA. y Hartley B. Effect of hydroxyures and other inhibitors of DNA synthesis on Vicia chromosomes previously exposed to X-rays or radiometric chemicals. Hereditas 1968; 59: 439-463
- 23.- Moretta L., Webb SR., Grossi CE., Lydyard PM. y Cooper MD. Funtional analysis of two human T-cell sub-populations: help and suppression of B-cell responses by T cells bearing receptors for IgM or IgG. J Exp Med 1977; 146: 184-200
- 24.- Klaus OGB. y Hawrylowicz MC. Cell-cycle control in lymphocyte stimulation. Immunology Today 1984; 5(1): 15-19
- 25.- Kung PC., Goldstein G., Reinherz EL. y Schlossman SF. Monoclonal antibodies defining distinctive human T cell surface antigens. Science 1979; 206: 347-349
- 26.- Hoffmann RA., Kung PC., Hansen WP. y Goldstein G. Simple and rapid measurement of human T lymphocytes and their subclasses in peripheral blood. Proc Natl Acad Sci USA 1980; 77: 4914-4917
- 27.- Foon KA., Gale RP. y Todd RF. Recent advances in the Immunologic classification of leukemia. Semin Hematol 1986; 23: 257-283

- 28.- Oppenheim JJ., Kovacs EJ., Matsushima K. y Durum SK. There is more than one interleukin 1. *Immunol Today* 1986; 7: 45-56
- 29.- Maino VC. y Watson KA. Analysis of IL-2 producing subsets of human lymphocytes. *Lymphokine Res* 1986; 5(supl 1): 61-66
- 30.- Ashman RF. Lymphocyte activation. En: Paul WE. (Ed) *Fundamental Immunology*. Raven Press, New York 1984; pp. 267-300
- 31.- Fainsod A., Diamond G., Marcus M. y Ruddle F. Cloning of a human S-phase cell cycle gene: Use of transient expression for screening. *Mol Cell Biol* 1987; 7: 775-779
- 32.- Yagita H., Masuko T., Takahashi N. y Hashimoto Y. Monoclonal antibodies that inhibit activation and proliferation of lymphocytes. *J Immunol* 1986; 136: 2055-2061
- 33.- Matsui Y., Shapiro HM., Sheehy MJ., Christenson L., Staunton DE., Eynon EE. y Yunis EJ. Differential expression of T cell differentiation antigens and major histocompatibility antigens on activated T cells during the cell cycle. *Eur J Immunol* 1986; 16: 246-251
- 34.- Pringle JR. y Hartwell LH. The Saccharomyces cerevisiae cell cycle. In the molecular biology of the yeast Saccharomyces. JN Strathern, E Jones, JR Broach (Eds) Cold Spring Harbor, NY., Cold Spring Harbor Laboratory 1981; pp. 97-142
- 35.- Pardee AB., Dubrow R., Hamlin JL. y Kletsien F. Animal cell cycle. *Ann Rev Biochem* 1978; 47: 715-750
- 36.- Kaefer V. y Resch K. Are cyclic nucleotides involved in the initiation of mitogenic activation of human lymphocytes? *Biochim Biophys Acta* 1985; 846: 210-225
- 37.- Watson JD. y Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids. A structures for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 1953; 171: 737
- 38.- Meselson M. y Stahl FW. The replication of DNA in Escherichia coli. *Proc Nat Acad Sci* 1957; 44: 178-189
- 39.- Taylor JH., Woods PS. y Hughes WL. The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic. Studies using tritium-labeled thymidine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1957; 43: 122-128
- 40.- Taylor JH. The organization and duplication of Genetic material. En: Taylor JH (Ed) *Selected papers on molecular Genetics*. Academic Press, New York 1965; pp. 296-311
- 41.- Melamed MR. Cytology automation. *Clin Bull* 1971; 2: 136-141
- 42.- Latt AS., Allen J., Bloom ES., Carrano A., Falke E., Kram D., Schneider E., Schreck R., Tice R., Whitfields B. y Wolff SH. Sister-chromatid exchanges: a report of the gene-tox program. *Mutation Res* 1981; 87: 17-62

- 43.- Gray JW., Bogart E., Gavel D., George Y. y Moore DH. Rapid cell cycle analysis: II. Phase durations and dispersions from computer analysis of RC curves. *Cell Tissue Kinet* 1983; 16: 457-471
- 44.- Gray JW., Dolbeare F., Pallavicini M., Beisker W. y Waldman F. Cell cycle analysis using flow cytometry. *Int J Radiat Biol* 1985; 49(2): 237-255
- 45.- Schneider EL., Tice RR. y Kram D. Bromodeoxyuridine differential chromatid staining technique: A new approach to examining. En: *Methods in cell biology*. Vol. XX Prescott DM (Ed) Acad Press, New York 1978; pp. 379-409
- 46.- Kato H. y Sandberg AA. The effect of sera on sister chromatid exchanges in vitro. *Exp Cell Res* 1977; 109: 445-448
- 47.- Mutchnick O., Ruz L. y Casas L. Time of first-generation metaphases. I. The effect of various culture media and of fetal calf serum in human lymphocyte cultures. *Mutation Res* 1980; 72: 127-134
- 48.- Morgan WF. y Crossen PE. Factors influencing sister chromatid exchange rate in cultured human lymphocytes. *Mutat Res* 1981; 81: 395-402
- 49.- Wolff S., Afzal V. y Lindquist PB. Cultured human lymphocytes proliferate faster in medium lacking fetal calf serum and antibiotics. *Mutation Res* 1984; 129: 207-213
- 50.- Taylor IW. y Hodson PJ. Cell cycle regulation by environmental pH. *J Cell Physiol* 1984; 121: 517-525
- 51.- Gerson MF. The relation between intracellular pH and DNA synthesis rate in proliferating lymphocytes. En: Nuccitelli R y Deamer DW (Eds) *Intracellular pH: its measurement, regulation and utilization in cellular functions*. Alan R Liss, New York 1982; pp. 375-383
- 52.- Gerson MF. y Kiefer H. Intracellular pH and the cell cycle of mitogen-stimulated murine lymphocytes. *J Cell Physiol* 1983; 114: 132-136
- 53.- Szeit G., Düring R. y Melmert K. Variation in the frequency of sister chromatid exchanges in repeated human lymphocyte cultures. *Hum Genet* 1986; 72: 179-181
- 54.- Beck E. y Übe G. Sister chromatid exchanges in human leukocyte chromosomes: Spontaneous and induced frequencies in early- and late-proliferating cells in vitro. *Hum Genet* 1979; 49: 51-61
- 55.- Chen HH., Hsueh JL., Siriani SR. y Huang CC. Induction of sister chromatid-exchanges and cell cycle delay in cultured mammalian cells treated with eight organophosphorus pesticides. *Mutat Res* 1981; 89: 307-317

- 56.- Singh NP. y D'Ambrosio SM. Sister chromatid exchange frequency and cell cycle kinetics in cancer patients treated with cytostatic drugs. En: Tice RR y Hollaender A (Eds) Sister Chromatid Exchanges, 25 years of experimental research. Part B Plenum Press, New York 1984; pp. 885-893
- 57.- Becher R., Schmidt CG. y Sandberg AA. SCE and cell cycle studies in leukemia. En: Tice RR y Hollaender A (Eds) Sister Chromatid Exchanges, 25 years of experimental research. Part B Plenum Press, New York 1984; pp. 839-853
- 58.- Frias VS. Ciclo celular en pacientes con alteraciones cromosómicas. Tesis para obtener el grado de Doctor en Ciencias (Biología). UNAM 1988; pp. 67
- 59.- Dutrillaux B. y Fosse AM. Utilisation du BrdU dans l'étude du cycle cellulaire de sujets normaux et anormaux. Ann Génét 1976; 19(2): 95-102
- 60.- Tice R., Schneider EL. y Rary JM. The utilization of bromodeoxyuridin incorporation into DNA for the analysis of cellular kinetics. Exp Cell Res 1976; 102: 232-236
- 61.- Tice R., Thorne P. y Schneider EL. Bisack analysis of the phytohaemagglutinin-induced proliferation of human peripheral lymphocytes. Cell Tiss Kinet 1979; 12: 1-9
- 62.- Ivett JL. y Tice RR. Average generation time: A new method of analysis and quantitation of cellular proliferation kinetics. Environ Mutagen 1982; 4: 356 (abstract)
- 63.- McClintock B. The production of homozygous deficient tissues with mutant characteristics by means of the aberrant mitotic behaviour of ring shaped chromosomes. Genetics 1938; 23: 315
- 64.- Huang CC. Induction of a high incidence of damage to the X chromosomes of *Rattus (Mastomys) natalensis* by base analogues, viruses and carcinogens. Chromosoma 1967; 23: 162-179
- 65.- Zakharev AF. y Egolina NA. Differential spirilization along mammalian mitotic chromosomes. I. BUdR-revealed differentiation in chinese hamster chromosomes. Chromosoma 1972; 38: 341-365
- 66.- Latt SA. Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. Proc Natl Acad Sci USA 1973; 70: 3395-3399
- 67.- Latt SA. Localization of sister chromatid exchanges in human chromosomes. Science 1974; 185: 74-76
- 68.- Perry P. y Wolff S. New giemsa method for the differential staining of sister chromatids. Nature 1974; 251: 156-158

- 69.- Korenberg JR. y Freedlander EF. Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchanges. *Chromosoma* 1974; 48: 355-360
- 70.- Goto K., Akematsu T., Shimazu H. y Sugiyama T. Simple differential giemsa staining of sister chromatids after treatment with photo-sensitive dyes and exposure to light and the mechanism of staining. *Chromosoma (Berl)* 1975; 53: 223-230
- 71.- Goto K., Maeda S., Kane Y. y Sugiyama T. Factors involved in differential Giemsa-staining of sister chromatids. *Chromosoma* 1978; 66: 351-359
- 72.- Buys CH CM. y Van der Veen AY. Different effects of 33258 Hoechst and DAPI in fluorescent staining of sister chromatids differentially substituted with Bromodeoxyuridine. *Histochem* 1982; 75: 169-177
- 73.- Chen JF. y Lin YJ. Improved light sources for induction of sister chromatid differentiation. *Cytobios* 1985; 43: 73-87
- 74.- Wolff S., Bodycote J. y Painter RB. Sister chromatid exchanges induced in chinese hamster cells by U.V. irradiation at different stages of the cell cycle the necessity for cells to pass through S. *Mutat Res* 1974; 25: 73-81
- 75.- Wolff S., Bodycote J., Thomas GH. y Cleaver JE. Sister chromatid exchange in Xeroderma pigmentosum cells that are defective in DNA-excision repair or post replication repair. *Genetics* 1975; 31: 343-355
- 76.- Kato H. Possible role of DNA synthesis in formation of sister chromatid exchanges. *Nature* 1974; 252: 739-741
- 77.- Kato H. Evidence that the replication point is the site of sister chromatid exchange. *Cancer Genet Cytogenet* 1980; 2: 69-77
- 78.- Painter RB. A replication model for sister-chromatid exchange. *Mutat Res* 1980; 70: 337-341
- 79.- Ishii Y. y Bender MA. Effects on inhibitors of DNA synthesis on spontaneous and ultraviolet light-induced sister chromatid exchanges in chinese hamster cells. *Mutat Res* 1980; 79: 19-32
- 80.- Conner RM., Cheng M. y Biegel AJ. A path probability model for sister-chromatid exchanges induced by alkylating agents. *Mutat Res* 1984; 126: 35-46
- 81.- Tice R., Schneider LE. y Rary M. The utilization of bromodeoxyuridine incorporation into DNA for the analysis of cellular kinetics. *Exp Cell Research* 1976; 102: 232-236
- 82.- Latt SA., Schreck RR., D'Andrea A., Kaiser TN., Schlesinger A., Lester E. y Sakai K. Detection significance, and mechanism of sister chromatid exchange formation: Past Experiments, Current Concepts, Future Challenges. En: *Sister Chromatid Exchanges*. Tice R and Hollaender (Eds) Plenum Press, New York 1984; pp. 11-40

83.- Kato H. Spontaneous sister chromatid exchanges detected by a BUdR-labelling method. Nature 1974; 251: 70-72

84.- Tice R., Chaillet J. y Schneider EL. Demonstration of spontaneous sister chromatid exchanges in vivo. Exp Cell Res 1976; 102: 426-428

85.- Tsuchi H. y Kato H. Three-way differential staining of sister chromatids in M2 chromosomes. Evidence for spontaneous sister chromatid exchanges in vitro. Exp Cell Res 1981; 134: 433-444

86.- Nagaya T. y Toriumi H. Spontaneous and induced sister chromatid exchanges in lymphocytes of healthy persons. Environ Res 1986; 40(1): 181-187

87.- Carrano AV., Minkler JL., Stetka DG. y Moore DH. II. Variation in the sister chromatid exchange frequency in human lymphocytes. Environ Mutagen 1980; 2: 325

88.- Tice RR., Lambert B., Marimoto K. y Hollaender A. A review of the international symposium on sister chromatid exchanges: Twenty-five years of experimental research. Environ Mutagen 1984; 6: 752-767

89.- Das BC. Factors that influence formation of sister chromatid exchanges in human blood lymphocytes. Critical Reviews in Toxicology 1983; 19(1): 43-86

90.- Sharma T. y Das BC. The effect of storage of blood on the yield of X-ray-induced chromosome aberrations and spontaneous sister chromatid exchanges. Int J Radiat Biol 1984; 45: 151

91.- Hampel KE. y Levan A. Breakage in human chromosomes induced by low temperature. Hereditas 1964; 51: 315

92.- Rao PN. y Engelberg J. HeLa cells: effects of temperature on life cycle. Science 1955; 148: 1092

93.- Speit G. Effects of temperature on sister chromatid exchanges. Hum Genet 1980; 55: 333

94.- Pandita TE. Effect of temperature variation on sister chromatid exchange frequency in cultured human lymphocytes. Hum Genet 1983; 63: 189

95.- Das BC. y Sharma T. Effects of temperature on the frequency of sister chromatid exchanges (SCEs) in peripheral blood lymphocytes of man and muntjac. Environ Mutagen 1984; 6: 25

96.- Whorton EB Jr., Tice RR. y Stetka DG. Statistical design, analysis and influence issues in studies using sister chromatid exchanges. Basic Life Sci 1984; 29(Part A): 431-440

97.- Wolf RL., Husan B., Engberg-Pedersen H. y Niebuhr E. Guidelines for the statistical evaluation of SCE. Basic Life Sci 1984; 29(Part A): 441-458

- 98.- Vercauteren P., Meulepas E., Vlietinck R., Cassiman JJ. y Van den Berghe H. Statistical evaluation of sister chromatid exchanges: refined method. *Basic Life Sci* 1984; 29(Part A): 457-468
- 99.- Moore H DH. y Carrano AV. Statistical analysis of high SCE frequency cells in human lymphocytes. *Basic Life Sci* 1984; 29(Part A): 469-475
- 100.- Sharma T. y Das BC. Culture media and species related variations in the requirements of 5-bromodeoxyuridine for differential sister chromatid staining. *Mutat Res* 1983; 81: 357
- 101.- Kato H. y Sandberg AA. The effect of sera on sister chromatid exchanges in vitro. *Exp Cell Res* 1977; 109: 445
- 102.- McFee AF. y Sherrill MN. Mitotic response and sister chromatid exchanges in lymphocytes cultured in sera from different sources. *Experientia* 1981; 37: 27
- 103.- Deknudt G. y Kamra G. Influence of various mitogens on the yield of sister chromatid exchanges, induced by chemicals, in human lymphocytes. *Mutat Res* 1983; 111: 161
- 104.- Deknudt G. Importance of mitogen in sister chromatid exchange studies. *Basic Life Sci* 1984; 29 (Part B): 695
- 105.- Das BC. y Sharma T. Reduced frequency of baseline sister chromatid exchanges in lymphocytes grown in antibiotics and serum-excluded culture medium. *Hum Genet* 1983; 64: 249
- 106.- Tucker JD. y Christensen ML. Effects of anticoagulants upon sister chromatid exchanges, cell cycle kinetics, and mitotic index in human peripheral lymphocytes. *Mutat Res* 1987; 190: 225
- 107.- Mazrimas JA. y Stetka DG. Direct evidence for the role of incorporated BrdU in the induction of sister chromatid exchanges. *Exp Cell Res* 1978; 117: 23-30
- 108.- Latt SA. Sister chromatid exchange formation. *Ann Rev Genet* 1981; 15: 11-55
- 109.- Goyanes-Villaescusa VJ., Ugarte M. y Vazquez A. Sister chromatid exchange in babies treated by phototherapy. *Lancet* 1977; 19: 1084-1085
- 110.- Crossen EP. y Morgan FW. The effects of B-radiation on sister-chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. *Mutat Res* 1979; 62: 125-129

- 111.- Ferry F. y Evans HJ. Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature* 1975; 258: 121-125
- 112.- Beccetti F., Paletti F. y Kihlman B. Studies on the induction of sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations by chemical mutagens. *Mutat Res* 1976; 38: 103
- 113.- Galloway SM. y Wolff S. The relation between chemically induced sister chromatid exchanges and chromatid breakage. *Mutat Res* 1979; 61: 297-307
- 114.- Knuutila S., Mäki-Paakkanen J., Kähkönen M. y Hokkanen M. An increased frequency of chromosomal changes and SCEs in cultured blood lymphocytes of 12 subjects vaccinated against small-pox. *Hum Genet* 1978; 41: 89
- 115.- Ishii Y. y Bender MA. Factors influencing the frequency of mytomycin C-induced sister chromatid exchanges in 5-bromodeoxyuridine substituted human lymphocytes in culture. *Mutat Res* 1978; 51: 419
- 116.- Giulotte E., Mottura A., Giorgi R. y Nuzzo F. Frequencies of sister-chromatid exchanges in relation to cell kinetics in lymphocyte cultures. *Mutat Res* 1980; 70: 343-350
- 117.- Tice RR. e Ivett JL. Cytogenetic analysis of bone marrow damage. En: *Toxicology of the blood and bone marrow*. Irons RD (Ed) Raven Press, New York 1985; pp. 119-140
- 118.- Latt SA., Schreck ER., Lovesay KS. y Shuler CF. In vitro and in vivo analysis of sister chromatid exchange. *Pharmacol Rev* 1979; 30: 501-535
- 119.- Larramendy ML., Reigosa AM. y Bianchi SM. Erythrocytes modulate the basal frequency of sister chromatid exchanges and the kinetics of lymphocyte division in culture. 1989; (en prensa)
- 120.- Henderson L. y Col. Sister chromatid exchange and micronucleus induction as indicators of genetic damage in maternal and foetal cells. *Mutat Res* 1984; 126: 47-52
- 121.- Stetka GD. y Wolff SH. Sister chromatid exchange as an assay for genetic damage induced by mutagen-carcinogens. I. In vivo test for compounds requiring metabolic activation. *Mutat Res* 1976; 41: 333-342
- 122.- Dewdney RS., Lowell DP., Jenkinson PC. y Anderson D. Variation in sister chromatid exchange among 106 members of the general U.K. population. *Mutat Res* 1986; 171: 43
- 123.- Livingston KG., Cannon AL., Bishop TD., Johnson P. y Fineman MR. Sister chromatid exchange: Variation by age, sex, smoking, and breast cancer status. *Cancer Genetic and Cytogenetics* 1983; 289-299
- 124.- Latt SA. y Juergens LA. Determination of sister chromatid exchange frequencies in human chromosomes, in population cytogenetics: studies in humans. Porter EB. y Porter IH. (Eds) Academic Press, New York 1977; pp. 217

125.- Galloway SM. y Evans HJ. Asymmetrical C-bands and satellite DNA in man. *Exp Cell Res* 1975; 94: 454

126.- Carrano AV. y Moore DH. II. The rationale and methodology for quantifying sister chromatid exchange in humans, in *Mutagenicity: New Horizons in Genetic Toxicology*. Heddle JA. (Ed) Academic Press, New York 1982; pp. 267

127.- Schneider EL., Kram D., Nakanishi Y., Monticone RE., Tice RR., Gilman BA. y Neider ML. The effect of ageing on sister chromatid exchange. *Mech Ageing Dev* 1979; 9: 303

128.- Lambert B. y Linblad A. Sister chromatid exchange and chromosome aberrations in lymphocytes of laboratory personnel. *J Toxicol Environ*

129.- Hender K., Høpstedt B., KSlng AM., Mark-Vendel E., Stormbeck B. y Mitelman F. Sister chromatid exchanges and structural chromosome aberrations in relation to age and sex. *Hum Genet* 1982; 63: 305-309

130.- Vormittag M. Effect of donor age on inter- and intrachromosomal distribution of sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. *Gerontology* 1983; 29: 370

131.- Musilova J., Michalova K. y Pacovsky V. Induction of sister chromatid exchanges by mitomycin C in lymphocytes of young and old human donors. *Gerontology* 1984; 30: 365

132.- Wen WH. y Liew Th. The effect of age and cell proliferation on the frequency of sister chromatid exchange in human lymphocytes cultured in vitro. *Mech Ageing Dev* 1983; 21: 377

133.- Das BC., Rani R., Mitra AB. y Luthra UK. Baseline frequency of sister chromatid exchanges (SCEs) in newborn lymphocytes and its relationship to in vivo aging in humans. *Mutat Res* 1985; 144: 85

134.- Soper KA., Stolley PD., Galloway SM., Smith JG., Nichols KW. y Wolman ER. Sister chromatid exchange (SCE) report on control subjects in a study of occupationally exposed workers. *Mutat Res* 1984; 129: 77

135.- De Arco MA. The effect of donor sex and age on the number of sister chromatid exchanges in human lymphocytes growing in vitro. *Hum Genet* 1981; 57: 83-85

136.- Waksvik H., Magnus P. y Herg K. Effects of age, sex and genes on sister chromatid exchange. *Clin Genet* 1981; 20: 449-454

137.- Schonberg S. y German J. Sister chromatid exchange in cells metabolically coupled to Bloom's syndrome cells. *Natura* (London) 1980; 284: 72

138.- Cheng WM., Tarone RF., Andrews AD., Whang-Peng JS. y Robins JH. Ultraviolet light-induced sister chromatid exchanges in Xeroderma pigmentosum and Cockayne's syndrome lymphocyte cell lines. *Cancer Res* 1975; 35: 1601

139.- Hatcher NH., Brinson PS. y Hook EB. Sister chromatid exchanges in ataxia telangiectasia. *Mutat Res* 1976; 31: 333

140.- Berger R., Bernheim A., Le Coniat M., Vecchione D. y Schaison G. Sister chromatid exchanges induced by nitrogen mustard in Fanconi's anemia, Application to the detection of heterozygotes and interpretation of the results. *Cancer Genet Cytogenet* 1980; 4: 259

141.- Murty VVS., Mitra AB., Luthra UK. y Singh IP. Sister chromatid exchanges in patients with precancerous and cancerous lesions of the cervix uteri. *Hum Genet* 1986; 72: 37

142.- Palma-Padilla V. Heterocromatina Constitutiva: Frecuencia de polimorfismos cromosómicos en recién nacidos consecutivos en la ciudad de México y patrones de segregación. Tesis Profesional. Depto. Biología, Facultad de Ciencias, U.N.A.M. 1978

143.- Georgiev GP., Nedespasov SA. y Bakayev VV. Supranucleosomal levels of chromatin organization. In the cell nucleus. H. Busch. (Ed) Academic Press, New York 1978; 5: 3-34

144.- Kornberg RD. y Klug A. The nucleosoma. *Sci Am* 1981; 244(2): 52-64

145.- Salamanca GF. Aspectos citogenéticos de la herencia. En: Guízar-Vázquez JJ. (Ed) Genética clínica, diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias. Manual Moderno. México 1988; pp. 72-87

146.- An International System For Human Cytogenetic Nomenclature. Birth defects: orig. article series XIV 1978; No. 6

147.- Bender MA., Griggs HG. y Bedford JS. Mechanisms of chromosomal aberration production. III. Chemical and ionizing radiation *Mutat Res* 1976; 23: 197-212

148.- Kihlman JA. Actions of chemicals on dividing cells. Prentice Hall, Nueva Jersey. 1966

149.- Arredondo VF. y Guízar-Vázquez JJ. Genética del crecimiento y desarrollo. En: Guízar-Vázquez JJ. (Ed) Genética Clínica, diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias. Manual Moderno. México 1988; pp. 105-124

150.- Faulhaber J. Investigación longitudinal del crecimiento. Colección Científica No. 25. México. Instituto Nacional de Antropología e Historia 1976; pp. 310

151.- Ramos-Galván R. Somatometría pediátrica. Estudio semilongitudinal en niños de la ciudad de México. *Arch Invest Méd* 1975; 6(supl 1): 83-396

152.- Smith DW. y Bierman EL. Las edades biológicas del hombre. Interamericana, México 1975

153.- Nelson EW., Vaughan CV. y McKay RJ. Tratado de Pediatría. Salvat Editores, S.A. México (6ª Ed) 1975; pp. 15-90

154.- Harrison GA., Weiner JS., Tanner JM. y Harnicot HA. Human Biology: An introduction to human evolution, variation, growth and ecology. Oxford University Press, Walton Street, Oxford OX2 0DP (2ª Ed) 1977; pp. 299-385

155.- Ligthart GJ., Corberand JX., Fournier C., Galanaud P., Hijmans W., Kennes B., Müller-Hermelink HK. y Steinmann GG. Admission criteria for immunogerontological studies in man: The senieur protocol. Mechanism of Ageing and Development 1984; 28: 47-55

156.- Strehler BL. Time, Cells and aging. Academic Press, New York (2ª Ed) 1962; pp. 1977

157.- Comfort A. The position of aging studies. Mechanisms of aging and development 1974; 3: 1

158.- Comfort A. A good age. New York: Crown 1976

159.- Orgel LE. The maintenance of the accuracy of protein synthesis and its relevance. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 1963; 49: 517-521

160.- Orgel LE. Ageing of clones of mammalian cells. Nature 1973; 243: 441-445

161.- Kirwood TBL. Evolution of aging. Nature 1977; 270: 301

162.- Goistein S. The biology of aging. N Eng J Med 1971; 285(20): 1120

163.- Holliday R., Huschtascha LI., Tarrant GM. y Kirkwood TBL. Testing the commitment theory of cellular aging. Science 1977; 198: 366

164.- Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. Experimental Cell Research 1965; 37: 614-636

165.- Thompson KVA. y Holliday R. Genetic effects on the longevity of cultured human fibroblasts. I. Werner's syndrome. Gerontology 1983; 29: 73-82

166.- Sen S., Talukder G. y Sharma A. Age-related alterations in human chromosome composition and DNA content in vitro during senescence. Biol Rev 1987; 62: 25-44

167.- Holliday R. y Tarrant GM. Altered enzymes in ageing human fibroblasts. Nature 1972; 238: 26

168.- Zavala C., Fialkow PJ. y Harner C. Selection in cultured diploid fibroblast strains. Exp Cell Res 1978; 117: 137

- 169.- Rittling SR., Brooks KM., Cristotalo VJ. y Baserga R. Expression of cell cycle-dependent genes in young and senescent WI-38 fibroblasts. Proc Nat Acad Sci USA 1986; 83: 3316-3320
- 170.- Abruzzo MA., Mayer M. y Jacobs PA. Aging and aneuploidy: evidence for the preferential involvement of the inactive X chromosome. Cytogenetics and Cell Genetics 1985; 39: 274-278
- 171.- Holliday R. Ageing: X-chromosome reactivation. Nature 1987; 327: 661-662
- 172.- Schauenstein K. y Csordas A. DNA methylation: a possible role in dysfunction of the aging immune system. Second International Serling Symposium on the Biology of aging. The Weizman Institute of Science, Rehovot and Ganei Hamat Hotel, Tiberias, Israel. October 9-14, 1988; 45
- 173.- Dutkowski RT., Lesh E., Stainano-Coico L., Thaler H., Darlington GJ. y Weksler ME. Increased chromosome instability in lymphocytes from elderly humans. Mutat Res 1985; 149: 505-512
- 174.- Stachniak JB., Sharp ZD., Pool TB. y Cameron IL. Impaired proliferation response after PDGF induction in fibroblasts from Hutchinson/Guilford progeria syndrome. Cell Biology International Reports 1988; 12(8): 621-626
- 175.- Koch Y. Secretion of pituitary hormones during aging: a review. Second International Serling Symposium on the Biology of aging. The Weizman Institute of Science, Rehovot and Ganei Hamat Hotel, Tiberias, Israel. October 9-14, 1988; 31
- 176.- Goldstein AL. Thymosin: Potential role in modulation of neuroendocrine and immune responses with age. Symposium on the Biology of Aging. The Weizman Institute of Science, Rehovot and Ganei Hamat Hotel, Tiberias, Israel. October 9-14, 1988; 35
- 177.- Boyd E. The weight of the thymus gland in health and in disease. Am J Dis Child 1932; 43: 1162
- 178.- Fabris N. Reversibility of age-associated thymus involution by neuroendocrinological and nutritional intervention. Second International Serling Symposium on the Biology of aging. The Weizman Institute of Science, Rehovot and Ganei Hamat Hotel, Tiberias, Israel. October 9-14, 1988; 46
- 179.- Lewis WM., Twomey JJ., Bealmer P. Age, Thymic involution and circulating thymic hormone activity. J Clin Endocrinol Metab 1978; 47: 145
- 180.- Pahwa RN., Modak JJ., McMorrow T. Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) enzyme in thymus and bone marrow. Cell Immunol 1981; 58: 39

181.- Singh J. y Singh AK. Age-related changes in human thymus. Clin Exp Immunol 1979; 37: 507

182.- Nerenberg ST. y Prasad R. Radioimmunoassays for ig classes G, A, M, D y E in spinal fluids: Normal values of different age groups. J Lab Clin Med 1975; 86: 887

183.- Moody CE., Innes JB., Staiano-Coico L. Lymphocyte transformation induced by autologous cells. XI. The effect of age on the autologous mixed lymphocyte reaction. Immunol 1981; 44: 431

184.- Gupta S. y Good RA. Subpopulation of human T lymphocytes. X. Alterations in T, B, third population cells and T cells with receptors for immunoglobulin M or G in aging humans. J Immunol 1979; 122: 1214

185.- Waldorf DS., Wilkens RR. y Decker JL. Impaired delayed hypersensitivity in an aging population. Association with antinuclear reactivity and rheumatoid factor. JAMA 1968; 203: 831

186.- Boss GP., Thompson RF., Speigelberg HL. Age-dependency of lymphocyte ecto-5'-nucleotidase activity. J Immunol 1980; 125: 679

187.- Hallgren HM., Buckley CE., Gilbertsen VA. Lymphocyte phytohemagglutinin responsiveness, immunoglobulins and auto-antibodies in aging human. J Immunol 1973; 111: 1101

188.- Axelsson U., Bachmann R. y Hallen J. Frequency of pathological proteins (M-components) in 6,995 sera from an adult population. Acta Med Scand 1966; 179: 235

189.- Rowley JJ., Buchanan H. y Mackay IR. Reciprocal change with age in antibody to extrinsic and intrinsic antigens. Lancet 1968; 2: 24

190.- Gillis S., Kozak R., Durante M. Immunological studies of aging. Decreased production of and response to T cell growth factor by lymphocytes from aged humans. J Clin Invest 1981; 67: 937

191.- Thoman ML. y Weigle WO. Lymphokines and aging: Interleukin-2 production and activity in aged animals. J Immunol 1981; 127: 2101

192.- Gardner ND., Lim STK. y Lawton JWM. Monocyte function in ageing humans. Mech Ageing Deve 1981; 16: 233

193.- Helton JM., Darlington GJ. y Casazza BA. Immunologic studies of aging. V. Impaired proliferation of PHA responsive human lymphocytes in culture. J Immunol 1980; 125: 1007

194.- Weksler ME. The senescence of the immune system. Hosp Pract 1981; 16: 53-64

195.- Hutchinson J. Congenital absence of hair and its appendages in a boy whose mother had been almost totally bald from alopecia areata from the age of six. Med Chirug Trans 1886; 69: 36

196.- Gilford H. Ateleiosis and progeria: continuous youth and premature old age. Brit Med J 1904; 9:14-918

197.- Thomson J. y Forfar JO. Progeria (Hutchinson-Gilford syndrome). Report of a case and review of the literature. Arch Dis Child 1950; 25: 224-234

198.- Gabr M. Progeria. Review of the literature with report of a case. Arch Pediatr 1954; 71: 35-46

199.- DeBusk FL. The Hutchinson-Gilford progeria syndrome. J Pediatr 1972; 90: 697-724

200.- Khalifa MM. Hutchinson-Gilford progeria syndrome: report of a libyan family and evidence of autosomal recessive inheritance. Clinical Genetics 1989; 35: 125-132

201.- Kumahara Y. Mechanisms in normal aging and progeroid syndromes. Nippon Ronen Igakkai Zasshi 1988; 25(1): 1-6

202.- Brown WT., Zebrower M. y Kieras FJ. Progeria: a model disease for the study of accelerated aging. En: Molecular Biology of Aging. AD Woodhead et al (Eds) Plenum 1985; pp. 375-396

203.- Mostafa AH. y Gabr M. Heredity in progeria with follow up of two affected sisters. Arch Pediatr 1954; 71: 163-172

204.- Erecinski K., Bittel-Dobrzynska N. y Mostowiec S. Zespól progerii u dwoch braci. Pol Tyg Lek 1961; 16: 806-809

205.- Lenz W. Senilidad prematura (progeria) (translation). In: Genetica Humana PE Becker (Ed) S. A. Barcelona, España, Ediciones Toray Vol. II, 1966; pp. 61

206.- Rava G. Su un nucleo familiare di progeria. Minerva Med 1967; 58: 1502-1509

207.- Viegas J., Souza PLR. y Salzano FM. Progeria in twins. J Med Genet 1974; 11: 384-386

208.- Jones KL., Smith DW., Harvey MAS., Hall BD. y Quan L. Older paternal age and fresh gene mutation: data on additional disorders. J Pediatr 1975; 85: 84-88

209.- Brown WT. Human mutation affecting aging - a review. Mech Aging Dev 1979; 9: 325-336

210.- Ogihara T., Hata T., Tanaka K., Fukuchi K., Tabuchi Y. y Kumahara Y. Hutchinson-Gilford progeria syndrome in a 45-year-old man. Am J Med 1986; 81: 135-138

211.- Hamer L., Kaplan F. y Fallon M. The musculoskeletal manifestations of progeria. A literature review. Orthopedics 1988; 11(5): 763-769

- 212.- Maquart FX., Bellon G., Gillery P., Borel JP., Lebeille B., Risbourg B. y Denooux JP. Increased secretion of fibronectin and collagen by progeria (Hutchinson-Gilford) fibroblasts. *Eur J Pediatr* 1988; 147(4): 442
- 213.- Sephel GC., Sturrock A., Giro MG. y Davidson JM. Increased elastin production by progeria skin fibroblasts is controlled by the steady-state levels of elastin mRNA. *J Invest Dermatol* 1988; 90(5): 643-647
- 214.- Nakamura KD., Turturro A. y Hart RW. Elevated c-myc expression in progeria fibroblasts. *Biochem Biophys Res* 1988; 155(2): 996-1000.
- 215.- Harley CB., Goldstein S., Posner BI. y Guyda H. Decreased sensitivity of old and progeric human fibroblasts to a preparation of factors with insulinlike activity. *J Clin Invest* 1981; 68: 988-994
- 216.- Goldstein S. Life span of cultured cells in progeria (letter). *Lancet* 1969; 1: 424
- 217.- Goldstein S. y Moerman EJ. Heat-labile enzymes in skin fibroblasts from subjects with progeria. *New Eng J Med* 1975; 292: 1305-1309
- 218.- Brown WT., Darlington GJ., Arnold A. y Fortino M. Detection of HLA antigens on progeria syndrome fibroblasts. *Clin Genet* 1980; 17: 213-219
- 219.- Goldstein S. y Moerman EJ. Heat-labile enzymes in circulating erythrocytes of a progeria family. *Am J Hum Genet* 1978; 30: 167-173
- 220.- Darlington GJ., Dutkowski R. y Brown WT. Sister chromatid exchange frequencies in progeria and Werner Syndrome Patients. *Am J Hum Genet* 1981; 33: 762-766
- 221.- Arakaki HT. y Sparkes RS. Microtechnique for culturing leukocytes from whole blood. *Cytogenetics* 1963; 2: 57-60
- 222.- Moorhead PS., Nowel PC., Mellman D. Battips y Hungerford DA. Chromosome preparation of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res* 1960; 20: 613-616
- 223.- Seabright M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 1971; 11: 971-972
- 224.- Savage JMK. Classification and relationships of induced chromosomal structural changes. *J Med Genet* 1976; 13: 103-112
- 225.- Zar JH. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall (Ed) 1974; pp. 620
- 226.- Conover. *Practical Non-Parametric Statistics*. Wiley (Ed) 1983; pp. 213-231

- 227.- Trent JM., Gerner E., Broderick RD. y Crossen PE. Cell cycle analysis using bromodeoxyuridine: comparison of methods for measurement of total cell transit time. *Cancer Genet Cytogenet* 1986; 19: 43-51
- 228.- Tice RR., Schneider EL., Krahn D. y Therne P. Cytokinetic analysis of the impaired proliferative response of peripheral lymphocytes from aged humans to phytohemagglutinin. *J Exp Med* 1979; 149: 1029-1041
- 229.- Palam V., Nava SE., Buentello L. y Salamanca F. Studies of the cellular cycle in the progeroid syndromes. VI Reunión Interna de Investigación. *Arch Invest Méd (Méx)* 1981; 12(Supl.): 33
- 230.- Brill S., Kukulansky T., Tal E., Abel L., Polgin Y., Dassa C. y Globerson A. Individual changes in T lymphocyte parameters of old human subjects. *Mechanisms of Ageing and Development* 1987; 40: 71-79
- 231.- Collyn-d'Hooghe M., Valleron AJ. y Malaise EP. Time-Lapse cinematography studies of cell cycle and mitosis duration. *Exp Cell Res* 1977; 105: 405-407
- 232.- Beaton DE. Cellular content and cellular proliferation changes in the tissues and organs of the aging mammal. In *Cellular and molecular renewal in the mammalian body*. Cameron IL. y Thrasher JD. (Eds) Academic Press, Inc, New York 1971; pp. 87
- 233.- Thrasher JD. Age and cell cycle of the mouse esophageal epithelium. *Exp Gerontol* 1971; 6: 19
- 234.- Leshner RRJ., Leshner S., Fry RJM. y Kohu HS. Aging and generation cycle of intestinal epithelial cells in the mouse. *Gerontologia (Basel)* 1961; 3: 1976
- 235.- Thrasher JD. y Greulich RC. The duodenal progenitor population. I. Age-related changes in the duration of the cryptal progenitor cycle. *J Exp Zool* 1965; 159: 39
- 236.- Macisera-Joelo A., Ponton J. y Phillipson L. The division cycle and DNA-synthesis in diploid human cells at different passage levels in vitro. *Exp Cell Res* 1966; 42: 673
- 237.- Grove GL. y Cristofalo VJ. Characterization of the cell cycle of cultured human diploid cells: effects of aging and hydrocortisone. *J Cell Physiol* 1977; 90: 411
- 238.- Schneider EL. y Mitsui Y. The relationship between in vitro cellular aging and in vivo human age. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976; 73: 3584
- 239.- Brill S. y Globerson A. Age related changes in T lymphocyte parameters of healthy individuals. Symposium on the Biology of Aging. The Weizman Institute of Science, Rehovot and Ganei Hamat Hotel, Tiberias, Israel. October 9-14, 1988; 68
- 240.- Pardee AB. G1 Events and Regulation of Cell Proliferation. *Science* 1989; 246: 603-608

- 241.- Laskey AR., Fairman PM. y Blow JJ. S Phase of the Cell Cycle. Science 1989; 246: 609-613
- 242.- Murray WA. y Kirshner WM. Dominoes and Clocks: The Union of two Views of the Cell Cycle. Science 1989; 246: 614-621
- 243.- McIntosh JR. y Koonce PM. Mitosis. Science 1989; 246: 622-628
- 244.- Hartwell HL. y Weinert AT. Checkpoints: Controls that ensure the order of cell cycle events. Science; 1989; 246: 629-634
- 245.- O'Farrell HP., Bruce AE., Lakich D. y Lehner FCh. Directing cell division during development. Science 1989; 246: 635-640
- 246.- Palmer RG., Dore CJ., Henderson L. y Denman AM. Sister chromatid exchange frequencies fibroblasts and lymphocytes of patients in the systemic lupus erythematosus. Mutation Res 1987; 177: 125-132
- 247.- Snope JA. y Rary MJ. Cell-cycle duration and sister-chromatid exchange frequency in cultured human lymphocytes. Mutation Res 1979; 63: 345-349
- 248.- Potten CS. Cell cycles in cell hierarchies. Int J Radiat Biol 1986; 49(2): 257-276
- 249.- Epstein J., Williams JR. y Little JB. Rate of DNA repair in progeria and normal fibroblasts. Biochem Biophys Res Commun 1974; 59: 850-857
- 250.- Fujiwara Y., Higashikawa T. y Tatsumi M. A retarded rate of DNA replication and normal level of DNA repair in Werner's syndrome fibroblasts in culture. J Cell Physiol 1977; 92: 365-374
- 251.- Schneider EL. y Monticone RE. Aging and sister chromatid exchange. II The effect of the in vitro passage level of human fetal lung fibroblasts as baseline and mutagen-induced sister chromatid exchange frequencies. Exp Cell Res 1978; 115: 269-276
- 252.- Bochkow NP. y Pilesov BA. The effect of rays on human chromosomes. II. The dependence of chromosome aberrations frequency upon sex and age. Genetics (USSR) 1968; 4: 93
- 253.- Sasaki MS. y Tonomura A. Chromosomal radiosensitivity in Down's syndrome. Jpn J Hum Genet 1969; 14: 81
- 254.- Evans HL. y Adams A. X-ray-induced chromosome aberrations in human lymphocytes irradiated in vitro: The influence of exposure conditions, genotype, and age on aberration yields, in advances in Radiation Research, Vol. 1 Duplan JF. y Chapiro A. (Eds) Gordon and Breach, New York 1973; pp. 325
- 255.- Kram D., Schneider EL., Tice RR. y Gianas P. Aging and sister chromatid exchange. Exp Cell Res 1978; 114: 471-475

- 256.- Bestock JC. Chromosoma changes associated with changes in development. *J Embryol Exp Morph* 1984; 83 (suppl): 7-30
- 257.- Sen S., Talukder G. y Sharma A. Age-related alterations in human chromosome composition and DNA content in vitro during senescence. *Biol Rev Cambridge Philosophic Soc* 1987; 62(1): 25-44
- 258.- Kishi K., Homma A., Kawa A. y Kadowaki K. Age related change in the frequency of ara-c-induced chromosome aberrations in human peripheral blood lymphocytes. *Mechanism of Ageing and Development* 1987; 37: 211-219
- 259.- Das BC. y Sharma T. Influence of age on the frequency of sister chromatid exchanges and X-ray-induced chromosome aberrations in muntjac. *Mutat Res* 1983; 109: 53
- 260.- Schimke RT., Sherwood SW., Hill AB. y Johnston RN. Overreplication and recombination of DNA in higher eukaryotes: potential consequences and biological implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83(7): 2157-2161
- 261.- Singh SM., Toles JF. y Reaume J. Genotype and age associated in vivo cytogenetic alterations following mutagenic exposures in mice. *Can J Genet Cytol* 1986; 28(2): 226-228
- 262.- Schimke TR., Sherwood WS., Hill BA. y Johnston NR. Overreplication and recombination of DNA in higher eukaryotes: Potential consequences and biological implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986; 83: 2157-2161
- 263.- Hoehn H., Bryant EM., Au K., Norwood TH., Bonan H. y Martin GM. Vairegated translocation mosaicism in human skin fibroblast cultures. *Cytogenet Cell Genet* 1975; 15: 282-298
- 264.- Mutchirick O., Ruz L., gonschatt M.E. Mauleón P., Lisker R. y García G. Frequency and types of induced and spontaneous chromosome aberrations in relation to cell kinetics. *Hum Genet* 1981; 59: 137-140