

ESTUDIO DE LA CINÉTICA DE PROLIFERACIÓN CELULAR Y DEL ÍNDICE MITÓTICO EN INDIVIDUOS DE DIFERENTES EIDADES DE LA POBLACIÓN MEXICANA

Virginia Palma Padilla*, Leonora Buentello Malo**, Hugo
Tudón Garcés***, Patricia Ostrosky Wegman*** y Fabio
Salamanca Gómez*

**Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Jefatura de Investigación
Médica y Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto
Mexicano del Seguro Social*

***Instituto de Investigaciones Antropológicas, Universidad Nacional Autónoma de México*

****Departamento de Genética Toxicológica, Instituto de Investigaciones Biomédicas,
Universidad Nacional Autónoma de México, México*

INTRODUCCIÓN

*La edad en relación con la cinética de proliferación celular
y los parámetros citogenéticos*

Los hallazgos *in vitro* realizados con cultivos de linfocitos y fibroblastos han demostrado la existencia de cambios asociados con la edad, como los siguientes:

Los fibroblastos diploides de origen humano presentan un número finito de divisiones; al final del cultivo las células degeneran o se pierden. La declinación celular y la mayor edad asociada incrementan el número de aberraciones cromosómicas acompañadas por otros cambios en el metabolismo del ácido desoxirribonucleico (ADN), como el retardo en la velocidad de reparación por escisión, en el alargamiento de la cadena en el molde de cromatina activa y en la fidelidad de las ADN polimerasas.

Todo cultivo de células, al cabo de cierto número de subcultivos, se compromete con el proceso de senectud.

Cuando un tejido comienza a volverse senil acumula enzimas termolábiles.

Las poblaciones de células seniles *in vitro* son diferentes a las jóvenes, ya que muestran una disminución en el porcentaje de células que sintetizan ADN y aumentan su tiempo de ciclo celular.

El número de aberraciones cromosómicas encontrado en subcultivos de fibroblastos de pacientes con síndrome de Down, síndrome de Bloom y anemia de Fanconi se correlaciona con los datos epidemiológicos acerca de un aumento de enfermedades neoplásicas y mayor susceptibilidad a la transformación viral conforme avanza la edad.

Ha sido informado un incremento de aneuploidías en los cultivos de linfocitos de individuos seniles y se ha demostrado la pérdida preferencial del cromosoma X inactivo en mujeres a medida que aumenta la edad. Por otra parte, existen evidencias de que la inactivación del cromosoma X está relacionada con la metilación diferencial de citosina en los dos cromosomas X y que un gen silencioso de un cromosoma X inactivo puede reactivarse al fallar la metilación, lo que puede ser indeseable ya que causa envejecimiento.

Se ha asociado en los linfocitos un incremento en la inestabilidad cromosómica con la edad.

Se ha comprobado *in vitro* que los enfermos con envejecimiento prematuro muestran en sus poblaciones celulares un menor número de divisiones.

La cinética de proliferación celular (CPC) puede ser afectada por la edad del donador (Hayflick 1965, Comfort 1974, Abruzzo *et al.* 1985, Arredondo y Guízar 1988).

Parámetros de medición de la cinética de proliferación celular en el cultivo de linfocitos

La mayoría de los métodos que existen para cuantificar la CPC tienen como principal objetivo determinar el crecimiento y la dinámica celular, mientras que algunos otros se enfocan a la duración del ciclo celular (horas) o de cada una de sus fases. Ejemplo:

gráfica de la CPC en que se cuantifican 100 células de acuerdo con la división celular por la que han transcurrido (M1 = metafases en primera división, M2 = segunda división, M3 = tres o más divisiones).
b) Tiempo de ciclo celular-Analítico (tcc-A). Propuesto por nosotros (Palma *et al.* 1993), se obtiene con los datos de la CPC. Se fundamenta en el método gráfico, pero es más exacto y rápido. Su fórmula es: $tcc-A = (X_{32} - X_{22}) + 6 (Y_{22} - 50 / Y_{22} - Y_{21} - Y_{32} - 50 / Y_{32} - Y_{31})$. Los dos tcc miden el tiempo de duración de un ciclo celular a otro en división activa (segunda a tercera).

Índice de duplicación (ID). Se obtienen los porcentajes de células M1, M2 y M3 (Rojas *et al.* 1992, Montero *et al.* 1993, Lazutka 1991) y se aplica la fórmula siguiente: $ID = 1 \times \%M1 + 2 \times \%M2 + 3 \times \%M3 / 100$.

Tiempo medio de generación (TPG) (Palma 1990, Palma *et al.* 1993). Toma en cuenta los diferentes porcentajes de las células en división (M1, M2 y M3) y la hora de cosecha. Puede ser obtenido en un solo punto de la CPC de los cultivos con BrdU o a lo largo del tiempo de incubación. Nos promedia el tiempo de entrada de las células a la división celular, la división activa y el término de ésta. Su fórmula se basa en el ID: $TPG = tiempo\ de\ cosecha\ post-exposición\ a\ Brdu / ID$.

MATERIAL Y MÉTODOS

Características de los individuos de la población

Se estudió un grupo de 37 individuos, distribuidos como se indica en la tabla 1. En cada uno de los seleccionados se realizó una historia clínica para descartar aquellos individuos con infecciones, procesos malignos u otros padecimientos que interfirieran con el sistema inmune. Los exámenes generales de laboratorio practicados durante los últimos seis meses debían ser normales y no haber recibido fármacos, sobre todo los que interfirieran con el sistema inmune y se conociera que tuviesen una acción clastogénica o de inducción de intercambio de cromátidas hermanas (ICH). Las muestras de sangre para el análisis cromosómico de los tres grupos de estudio se procesaron simultáneamente.

Tabla 1
Características generales de los grupos de estudio

Grupo	Edad en años		relación femenino/masculino	número de casos
	promedio	intervalo		
niños	8.4	0.33-13	6/4	10
jóvenes	29.7	22-41	9/8	17
seniles	64.3	55-80	7/3	10
			<i>Total</i>	37

Toma de muestra de sangre periférica, cultivo celular, cosecha y procesamiento de las laminillas

Se sembró para cultivos con BrdU (POST-BRDU) y sin BrdU (SIN BRDU) para los diferentes tiempos de incubación (24 - 48, 30 - 54, 36 - 60, 42 - 66, 48 - 72, 54 - 84 horas) por duplicado (cultivos A y B) 0.5 ml de sangre total heparinizada en frascos que contenían 4 ml de medio McCoy 5a (Microlab); 1 ml de suero fetal (Gibco); 0.3 ml de fitohemaglutinina (Microlab) y 0.02 ml de antibiótico (10 UI/ml penicilina y 10 µg/ml estreptomicina).

Los frascos fueron incubados a 37 °C y a las 24 horas se agregaron 20 mg de BrdU a los cultivos POST-BRDU. Se añadieron 30 µg de colchicina 15 minutos antes de la cosecha. Se realizaron las cosechas para cada tiempo de incubación, es decir, cada 6 horas, comenzando a las 24 horas después de añadida la BrdU (corresponde en los cultivos SIN BRDU a la hora 48) a las 60 horas.

El paquete celular se resuspendió en un volumen final de 0.5 ml y las laminillas se hicieron con 0.1 ml de la suspensión.

La CPC para los cultivos POST-BRDU se leyó con laminillas procesadas para la técnica de tinción diferencial de ICH y la CPC para los cultivos SIN BRDU se leyó con laminillas procesadas para bandas GTG (Tabla 2).

Métodos de observación y medición de los parámetros

El análisis citogenético se realizó por un solo observador, y se verificó al azar la observación de algunos resultados por dos observadores

Tabla 2
Métodos

Día	Hora	Horas <i>in vitro</i>	Maniobra		
I	12:00		Obtener por venopunción sangre periférica (biometría hemática diferencial). Mantener a temperatura ambiente en oscuridad.		
II	5:00	0	Siembra de sangre. Incubar a 37 °C en oscuridad.		
III	5:00	24	• Técnica normal	* Tinción diferencial de cromátidas Adicionar 20 µg de BrdU Reincubar a 37 °C en oscuridad	
IV	5:00	48	Cosechar cada seis horas por duplicado	24	Horas post-exposición a BrdU
		54		30	
		60		36	
		66		42	
		72		48	
V	5:00	78		54	
		84		60	
VI			Preparaciones sobre portaobjetos en etanol frío al 70%		
VII			Tinción habitual, bandas G, C, NOR, etcétera	Se continúa la técnica de tinción de cromátidas hermanas	

NOTA: análisis al microscopio para CPC

* Tiempo promedio de generación (TPG).

* Tiempo de ciclo celular (tcc-50).

•• Índice mitótico en %.

•• Índice de transformación celular (promedio de células transformadas y no transformadas contados en 10 campos ópticos 10X).

que desconocían el grupo al que pertenecía el código oculto de la preparación.

Para cada individuo de los diferentes grupos (niños, jóvenes y seniles), para cada tipo de cultivo (POST-BRDU y SIN BRDU) y en cada tiempo (24 – 48, 30 – 54, 36 – 60, 42 – 66, 48 – 72, 54 – 84 horas) se observó en diez campos ópticos (imagen que se mira en el microscopio con la lente del objetivo 10X) el número de metafases, células T y células NO T, promediando el resultado de las laminillas de los cultivos A y B, para determinar los siguientes parámetros:

Índice mitótico

Índice mitótico en valores absolutos. Es el número total de metafases en relación con el número total de células (T+NO T).

Índice mitótico en promedio. Es el promedio de metafases en relación con el promedio del total de células (T+NO T). Muestra la dinámica celular y se sabe que a mayor número de células mayor índice mitótico (IM).

Índice mitótico en porcentaje. Con base en el promedio de metafases se obtiene el número de metafases en relación con 100 células. Parámetro de elección para realizar las pruebas estadísticas en cuanto al IM, ya que la velocidad de proliferación celular puede medirse más fácilmente con respecto a un número específico de células.

Índice de transformación celular (ITC)

Se obtiene con base en el de células T y NO T. El IM y el ITC, tanto de los cultivos POST-BRDU y SIN BRDU en las diferentes horas de cosecha, se analizaron en los diferentes grupos por medio de la prueba no paramétrica de comparación múltiple de Kruskal-Wallis, y el análisis de grupos por pares se realizó por la prueba de Bonferroni para formar los horizontes estadísticos ($p < 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La tabla 3 muestra los resultados correspondientes al IM% intra e intergrupales en niños, jóvenes y seniles en los cultivos POST-BRDU y SIN BRDU en las diferentes horas de cosecha.

Tabla 3
Índice mitótico (%)

Cultivo	Hora	Grupos de edad			Comparaciones entre los grupos de edad	
		Niños (N)	Jóvenes (J)	Seniles (S)	POST-BRDU	SIN BRDU
POST-BRDU	24	0.7	0.33*	0.43*	≠ J	J
SIN BRDU	48	0.9	0.71	0.66	N S	N S
POST-BRDU	30	0.9	0.36*	0.66*	≠ J ≠	≠ J ≠
SIN BRDU	54	1.1	0.70	0.81	N S	N S
POST-BRDU	36	1.4	0.50*	0.96*	≠ J ≠	≠ J ≠
SIN BRDU	60	1.3	0.71	1.20	N S	N S
POST-BRDU	42	1.3	1.00*	1.04	J	≠ J ≠
SIN BRDU	66	1.4	0.72	1.21	N S	N S
POST-BRDU	48	1.4	0.95	1.16*	≠ J ≠	≠ J ≠
SIN BRDU	72	1.8	0.93	1.60	N S	N S
POST-BRDU	54	1.3	0.92	1.16	≠ J ≠	≠ J ≠
SIN BRDU	78	1.6	0.94	1.41	N S	N S
POST-BRDU	60	1.2	0.43*	1.18*	≠ J ≠	J
SIN BRDU	84	1.8	1.49	1.55	N S	N S

* Diferencia significativa entre el cultivo POST-BRDU y SIN BRDU.

La tabla 4 muestra los resultados intra e intergrupales de los promedios de células T y NO T por campo óptico para la obtención del ITC.

La gráfica 1 muestra los resultados del IM% para los niños, en la que podemos observar una tendencia de mayor porcentaje en los cultivos SIN BRDU, aunque existe a la hora 36 - 60 una tendencia contraria. A pesar de esto, no existe diferencia estadística en ningún punto de la CPC entre ambos cultivos.

El idiograma de la gráfica 2 muestra el ITC en los niños. Se puede observar a lo largo de la CPC una correlación lineal positiva en las células transformadas, tanto en los cultivos POST-BRDU como en los

Tabla 4
Índice de transformación celular por campo óptico (irc)

Cultivo	Hora	Niños		Jóvenes		Seniles	
		T	NO T	T	NO T	T	NO T
POST-BRDU	24	218.90	140.10	373.84*	87.32	164.97*	135.09*
SIN BRDU	48	306.70	131.10	225.45	77.94	271.25	200.56
POST-BRDU	30	290.40	172.80	382.04	58.92	220.20*	186.31
SIN BRDU	54	411.90	167.10	365.52	60.31	365.71	162.97
POST-BRDU	36	445.10	140.00	461.69*	131.83	298.70	155.06*
SIN BRDU	60	573.80	179.40	338.04	138.16	400.33	202.98
POST-BRDU	42	509.90	155.10	433.58	100.48*	458.83	158.60
SIN BRDU	66	724.90	192.10	457.76	140.98	597.16	175.73
POST-BRDU	48	587.40*	179.30	719.65*	117.52	421.65*	155.64
SIN BRDU	72	843.60	178.80	587.73	103.38	660.57	179.35
POST-BRDU	54	738.90	237.90	850.63*	149.32*	491.36*	220.48
SIN BRDU	78	1016.80	216.30	701.90	88.69	759.20	177.47
POST-BRDU	60	1005.90	210.60	1009.87*	119.72	682.42*	201.18
SIN BRDU	84	1122.50	224.20	851.57	117.15	851.06	192.80

* Diferencia significativa entre el cultivo POST-BRDU y SIN BRDU.

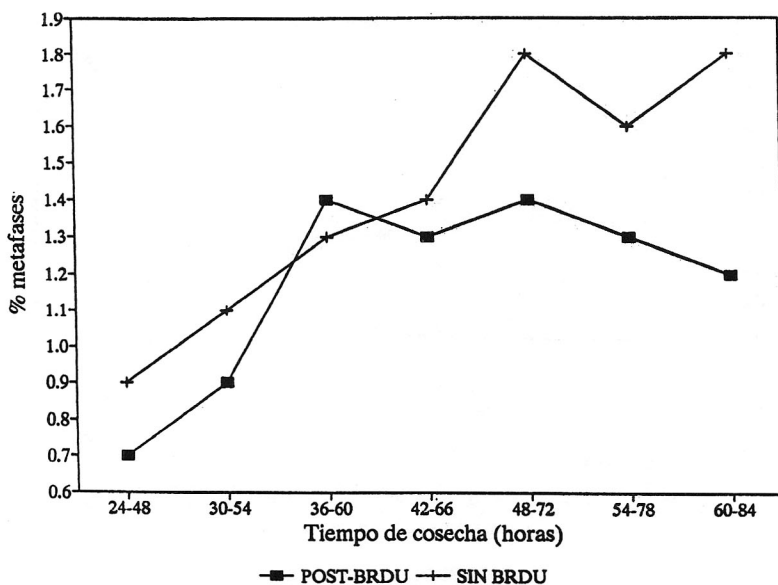
Tabla 5
Índice de transformación celular en niños, jóvenes y seniles

Cultivos POST-BRDU		Hora	Cultivos SIN BRDU	
Células Transformadas	Células No transformadas		Células Transformadas	Células No transformadas
≠ J ≠ N S	≠ J ≠ N S	24-48	J N S	≠ J ≠ N S
≠ J ≠ N ≠ S	≠ J ≠ N S	30-54	J N S	≠ J ≠ N S
J ≠ N S	J N S	36-60	J N S	J ≠ N S
J N S	J N S	42-66	J N S	J N S
≠ J ≠ N S	J N S	48-72	J N S	J ≠ N S
≠ J ≠ N S	J N S	54-78	J N S	≠ J ≠ N S
≠ J ≠ N S	≠ J ≠ N S	60-84	J N S	≠ J ≠ N S

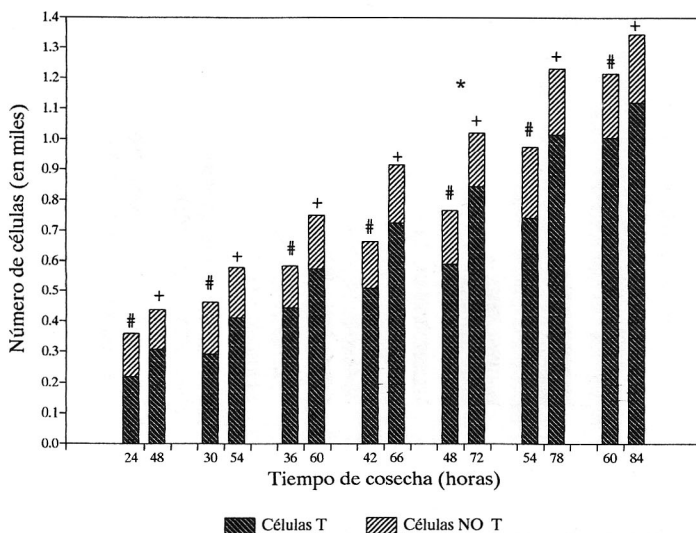
NOTA: N = niños, J = jóvenes y S = seniles.

SIN BRDU, habiendo una velocidad de proliferación mayor en los cultivos SIN BRDU, ya que solamente hubo diferencia estadística en un solo punto. En cuanto a las células no transformadas, no hay diferencias a lo largo de la CPC, ni entre los cultivos POST-BRDU y SIN BRDU.

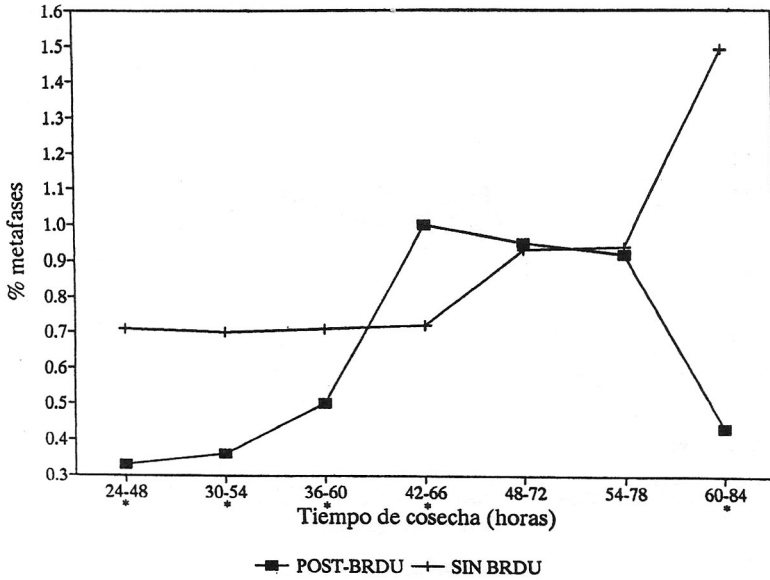
La CPC en los jóvenes, tanto con el IM% (Gráfica 3) como con el ITC (Gráfica 4), muestra que los cultivos normales SIN BRDU presentan una dinámica de proliferación comparable a la curva teórica del crecimiento de una población. La CPC se ve alterada en los cultivos POST-BRDU, ya que el IM% muestra un patrón irregular de comportamiento y el ITC, con respecto a la BRDU, aumenta el estímulo mitogénico de la PHA.



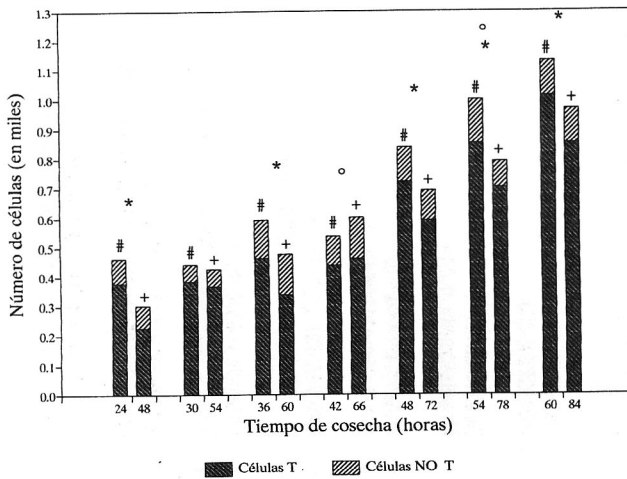
Gráfica 1. Índice mitótico en niños



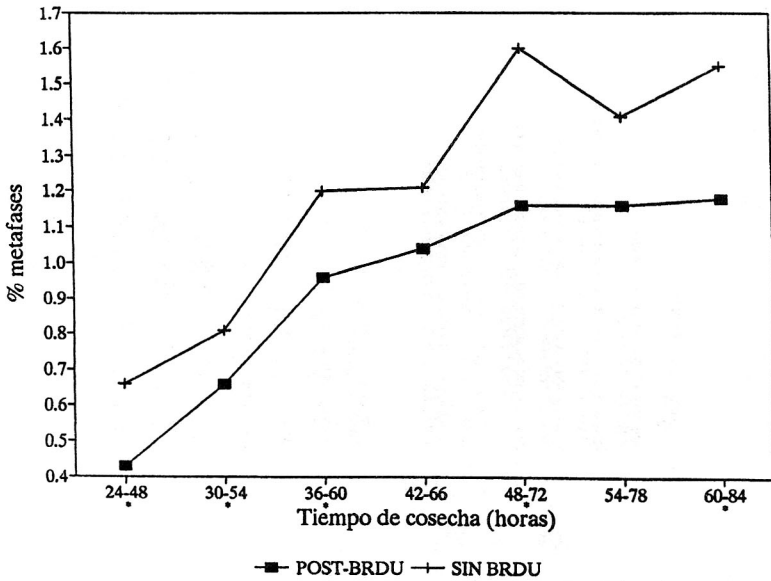
Gráfica 2. Índice de transformación celular en niños. # POST-BRDU, + SIN BRDU, *Diferencia significativa entre las células T.



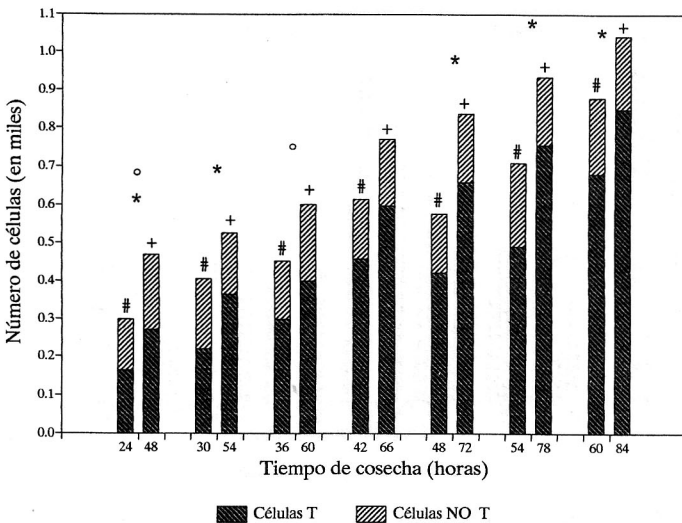
Gráfica 3. Índice mitótico en individuos jóvenes. * Diferencia significativa.



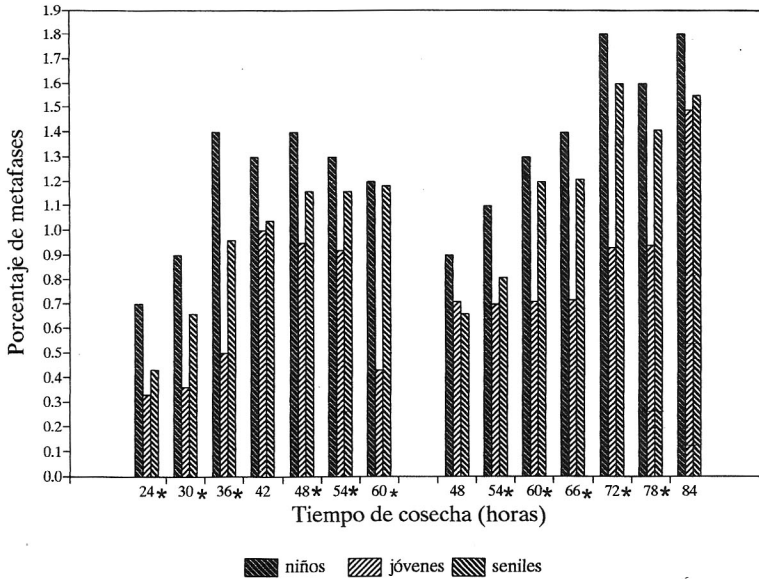
Gráfica 4. Índice de transformación celular en individuos jóvenes. # POST-BRDU, + SIN BRDU, *Diferencia significativa entre las células T, ° Diferencia significativa entre las células NO T.



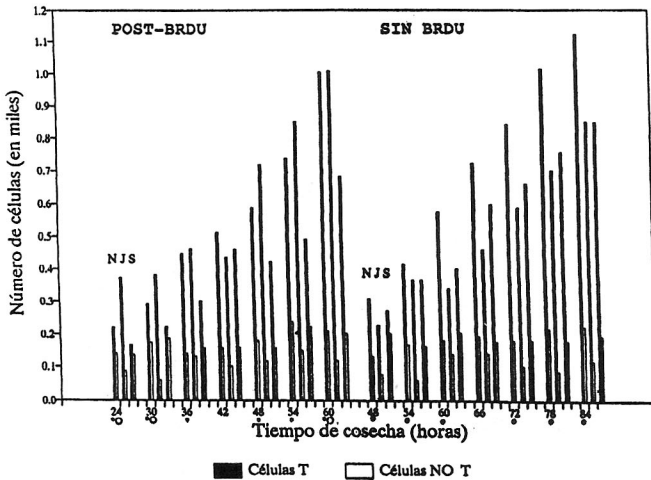
Gráfica 5. Índice mitótico en individuos seniles. *Diferencia significativa.



Gráfica 6. Índice de transformación celular en individuos seniles. # POST-BRDU, + SIN BRDU, *Diferencia significativa entre las células T, ° Diferencia significativa entre las células NO T.



Gráfica 7. Índice mitótico en niños e individuos jóvenes y seniles. *Diferencia significativa (por lo menos en uno de los grupos).



Gráfica 8. Índice de transformación celular en niños e individuos jóvenes y seniles. * Diferencia significativa entre las células T (por lo menos en uno de los grupos), ° Diferencia significativa entre las células NO T (por lo menos en uno de los grupos). N= niños; J=jóvenes; S=seniles.

La gráfica 5 con respecto al IM% de los seniles muestra que a largo de la CPC hay un IM mayor en los cultivos SIN BRDU que en los de POST-BRDU. La tendencia en los dos cultivos es de aumento y existe una correlación positiva.

El idiograma de la gráfica 6 de los seniles muestra una tendencia de aumento en la CPC conforme se incrementa el tiempo de incubación (tiempo de cosecha), tanto en los cultivos POST-BRDU como en los de SIN BRDU en las células T.

En la medición de los ITC en los tres grupos, las células T fueron las más informativas para la obtención de conclusiones en la CPC (Tabla 5).

CONCLUSIONES

Los linfocitos de niños tienen la mejor respuesta al estímulo mitogénico (Gráficas 1 y 7), una excelente capacidad fisiológica de proliferación (Gráficas 2 y 8) y la BrdU no tiene un efecto citostático ni citotóxico importante en ellos (Gráficas 1, 2, 7 y 8).

Los jóvenes tienen un patrón de comportamiento muy diferente intragrupal en lo que respecta a la respuesta de la PHA en los cultivos POST-BRDU y SIN BRDU (Gráficas 3 y 4) e intergrupar, sobre todo en los resultados de ITC, en los que existe un aumento en la respuesta al estímulo de la PHA en los cultivos POST-BRDU (Gráficas 4 y 8), el cual es inverso al que se encontró en niños y seniles (Gráficas 2, 6 y 8).

La tendencia de comportamiento de la CPC en los seniles es semejante a la de los niños (Tabla 5, Gráficas 2 y 6), pero en los seniles existe un efecto citostático de la BrdU en los linfocitos, que se visualiza tanto en el IM% (Gráfica 5) como en el ITC (Gráfica 6).

Las células T de los cultivos SIN BRDU de niños, jóvenes y seniles tienen un comportamiento semejante en su CPC (Tabla 5).

ABSTRACT

The study of kinetic cellular proliferation (KCP) is useful for the research into those mechanisms that control growth, and to compare the behavior of different normal and tumoral cells and tissues and measure the cytotoxic and

cytostatic effect of antitumoral compounds, drugs, and extracts made from plants. There are few studies in the literature concerning intra and interindividual variability of KCP, in relation to those parameters that have been studied. We also lack studies in Mexico concerning the behavior of KCP at different ages in normal subjects, and its relation to other cytogenetic parameters. This paper presents the results of ageing on lymphocytes *in vitro*, with regard to their incubation time, mitotic index, and cell transformation index, with cells obtained from persons classified as children, youths and elderly.

RESUMEN

El estudio de la Cinética de Proliferación Celular (CPC) resulta de utilidad en la investigación de los mecanismos de control del crecimiento, así como para comparar el comportamiento de diferentes células y tejidos, tanto normales como tumorales, y para medir el efecto citotóxico y citostático de drogas antineoplásicas, distintos fármacos y extractos completos o crudos vegetales y sus productos activos purificados.

Pocos trabajos en la literatura tratan acerca de las diferencias intra e interindividuales en la CPC con los diferentes parámetros con los que han sido evaluados; no existe en nuestra población ningún estudio comparativo en sujetos normales de diferentes edades que trate de definir la dinámica de crecimiento o la CPC estudiada con varios parámetros y a la vez relacionarla con otros parámetros citogenéticos. Por lo que es nuestro propósito estudiar el efecto que tiene el envejecimiento natural cronológico a nivel de la población celular de linfocitos *in vitro* en relación con las variables por ser estudiadas.

Al agrupar a la población mexicana en las diferentes edades (niños, jóvenes y seniles) se estudia la CPC de linfocitos humanos en cultivo respecto al tiempo de incubación, para establecer los diferentes valores de referencia y evaluar su relación con variables citogenéticas. Se presentan en este trabajo los resultados del estudio de la CPC para el índice mitótico en % y el índice de transformación celular.

REFERENCIAS

- ABRUZZO, M. A., M. MAYER Y P. A. JACOBS
1985 Aging and aneuploidy: evidence for the preferential involvement of the inactive X chromosome. *Cytogenet. Cell Genet.*, 39: 275 - 278.

ARREDONDO, V. F. Y J. J. GUÍZAR VÁZQUEZ

- 1988 Genética del crecimiento y desarrollo. En: J. J. Guízar Vázquez (ed.), *Genética clínica, diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias*, pp. 105-124, Manual moderno, México.

BETANCOURT, M., R. ORTIZ Y C. GONZÁLEZ

- 1992 Proliferation index in bone marrow cells from severely malnourished rats during lactation. *Mutation Res.*, 283: 173-177.

COMFORT, A.

- 1974 The position of aging studies. *Mech. Ageing Devel.*, 3: 1.

HAYFLICK, L.

- 1965 The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.*, 37: 614-636.

HERZENBERG, L. A. Y R. G. SWEET

- 1976 Fluorescence activated cell sorting. *Sci. Amer.*, 234 (3): 108-117.

HOLDEN, H. T., W. LICHTER Y M. M. SIGEL

- 1973 Quantitative methods for measuring cell growth and death. En: P. F. Krusse y M. K. Paterson (eds.), *Tissue Culture: Methods and Applications*, Academic Press, New York, USA.

JASINSKA, J., J. A. STEFFEN Y A. MICHALOWSKI

- 1970 Studies on in vitro lymphocytes proliferation in cultures synchronized by Inhibition of DNA synthesis. *Exp. Cell Res.*, 61: 333-341.

LAZUTKA, J. R.

- 1991 Replication index in cultured human lymphocytes: Methods for statistical analysis and possible role in genetic toxicology. *Environ. Mol. Mutagen.*, 17: 188-195.

MONTERO, R., M. E. GONSEBATT, R. GERSON, E. ROJAS, L. A. HERRERA Y W. P. OSTROSKY

- 1993 AS-101: a modulator of in vitro T-cell proliferation. *Anti-Cancer Drugs.*, 4: 0-0.

ORTIZ, R. Y M. BETANCOURT

- 1984 Cell proliferation in bone marrow cells of severely malnourished animals. *J. Nutr.*, 114: 472-476.

PALMA, V.

- 1990 *Estudio citogenético comparativo en diferentes etapas del desarrollo humano y en el envejecimiento prematuro*. Tesis de doctorado (biología), Facultad de Ciencias, Universidad Nacional Autónoma de México, México (inédita).

PALMA, V., H. TUDÓN, L. BUENTELLO, S. NAVA, P. OSTROSKY Y F. SALAMANCA

- 1993 Methods for the analysis of cellular kinetics in PHA-stimulated blood lymphocytes using BrdU incorporation. A comparative study. *Mutation Res.*, 286: 267-273.

PINCU, M., KIMME-SMITH Y A. NORMAN

- 1986 A modified harlequin stain for cell kinetics. *Cell Tissue Kinet.*, 19: 275-287.

ROJAS, E., R. MONTERO, L. A. HERRERA, M. SORDO, M. E. GONSEBATT, R. RODRÍGUEZ Y W. P. OSTROSKY

- 1992 Are mitotic index and lymphocyte proliferation kinetics reproducible endpoints in genetic toxicology testing? *Mutation Res.*, 282: 283-286.