

24.196



*Universidad Nacional Autónoma de México*

FACULTAD DE CIENCIAS

*Cuantificación Densitométrica del Efecto de la  
Tioacetamida Sobre la Síntesis del ARN  
Nucleolar en Células Hela en Cultivo de Tejidos*

T E S I S  
Que para obtener el título de  
LICENCIADO EN BIOLOGIA  
P r e s e n t a  
SILVIA VIZCONDE ORTUÑO



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis 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.

## I N D I C E

- I .- I N T R O D U C C I O N
- a) ANTECEDENTES
  - b) ANALISIS AUTOMATICO DE IMAGENES:
    - i ) MICRODENSITOMETRIA
    - ii) PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMAGENES
- II .- M A T E R I A L E S Y M E T O D O S
- a) MATERIAL BIOLÓGICO
  - b) TIOACETAMIDA (TAA)
  - c) TOMA DE FOTOMICROGRAFIAS
  - d) DIGITALIZACION DE LAS FOTOMICROGRAFIAS
  - e) CLASIFICACION DE LAS IMAGENES
- III .- R E S U L T A D O S
- a) DENSIDAD
  - b) AREA
  - c) ANALISIS ESTADISTICO
- IV .- D I S C U S I O N

V .-

R E S U M E N

VI .-

R E F E R E N C I A S B I B L I O G R A F I  
C A S

## I N T R O D U C C I O N

### ANTECEDENTES.-

La presencia de los nucléolos como gránulos intranucleares densos fué descrita por primera vez por Fontana en 1781 - (citado en De Robertis, 1977).

El nucléolo es una acumulación de Proteína y ARN-ribosómico; con Microscopía Óptica aparece como una estructura homogénea, aunque en ocasiones se observan pequeños corpúsculos o vacuolas. La Microscopía Electrónica pone de manifiesto una organización submicroscópica definida dentro del mismo, de esta manera podemos observar una región cromosómica que corresponde al Organizador Nucleolar y una región no cromosómica que a su vez consta de dos zonas:

- a) Una porción granular, constituida por gránulos densos de 150 a 200 Å de diámetro, dispuestos en la periferia.
- b) Una porción fibrilar, compuesta por fibrillas de 50 a 80 Å de diámetro, que se localizan en la parte central.

Los Organizadores Nucleolares, de los cuales proceden los nucléolos después de la división celular, fueron interpretados como los sitios cromosómicos que contienen los genes codificadores del ARN-ribosómico (Brown y Gurdon, 1964).

La función principal del nucléolo es llevar a cabo la síntesis de precursores ribosómicos que pasan al citoplasma (Jordan, 1971), donde desempeñan un papel importante en la biosíntesis de las proteínas.

El precursor obligatorio del ARN-ribosómico es la fracción 45S, lo cual fué demostrado en células HeLa (Scherrer y Darnell, 1962), esta fracción se transforma en las moléculas 28S y 18S ARN (Scherrer y col., 1963; Rake y Graham, 1964; Penman, 1966; Penman y col., 1966).

Una amplificación o redundancia del ADN que codifica para el ARN-ribosómico (ADNr) ocurre en ovocitos de una amplia variedad de organismos (Gall, 1969; Brown y Dawid, 1969). Durante el proceso de amplificación los genes que codifican para 18S y 28S ARNr son replicados específicamente en ausencia de replicación del resto del genoma (Gall, 1968; Brown y Dawid, 1968; Dawid y col., 1970 citado en Cave, 1975). Tal amplificación genética contribuye a que la cé

lula realice su intensa síntesis de ARN ribosómico; se ha logrado que en células HeLa también se presenta este fenómeno experimentalmente.

Existen algunas drogas que son capaces ya sea de inhibir o de estimular la síntesis del ARNr, dentro de las segundas se cuenta con una hepatocarcinógeno débil llamado Tioacetamida (TAA) cuya fórmula es  $\text{CH}_3\text{CSNH}_2$ .

Uno de los primeros cambios citológicos producidos al ser administrada esta sustancia, es un aumento en el tamaño del nucléolo (Rather, 1951; Kleinfeld, 1957).

Los nucléolos tratados con TAA se caracterizan por presentar un aspecto compacto, poseer altas concentraciones de elementos granulares acompañados de una aparente desaparición de elementos fibrilares, así como pérdida de espacios claros ó vacuolas nucleolares (Steele y Busch, 1966).

También se ha encontrado una mayor cantidad de ARN que se sedimenta rápidamente, entre 28S y 85S, en un gradiente de cloruro de cesio y una muy escasa cantidad de ARN que se sedimenta entre 4S y 8S (Busch y Smetana, 1970).

Los Análisis Bioquímicos han mostrado que en el núcleo de

células tratadas con TAA, existe un aumento en el contenido de ARN, con una correspondiente disminución del ARN citoplásmico (Laird, 1953).

Fernández-Herrero (1975) utilizando Uridina- $H^3$  y la técnica de autorradiografía, observó en células HeLa, que la TAA actúa como un estimulante de la incorporación de precursores marcados en el nucléolo y además provoca un retardo de la movilización del ARNr, ya que éste permanece más tiempo en el mismo.

Por su parte, Navarro-Santos (1976) realizó un estudio también autorradiográfico de la acción de la TAA sobre el ADN de células HeLa, utilizando como precursor Timidina- $H^3$ , encontrando que efectivamente hay un efecto estimulante de la misma sobre el ADN, el cual se presenta después de las primeras 5 a 6 horas de acción de la droga, teniendo una duración de 2:30 horas; el efecto se manifiesta bajo la forma de un aumento en el número de células que presentan sus núcleos marcados, así como un índice mitótico abatido con respecto a los controles. El estímulo es al ADN en general con notable exclusión del nucleolar.

## ANALISIS AUTOMATICO DE IMAGENES.-

El fin primordial de los diferentes tipos de Microscopía - es el de obtener la mayor información posible de una muestra de materia, al hacerla interactuar con diferentes formas de radiación (electromagnética o particulada).

En el pasado sólo se contaba con una descripción cualitativa o a lo sumo semicuantitativa del espécimen, basada en una información visual, por ejemplo, tamaño, número de individuos, etc.; pero al no conformarse las personas que utilizaban la Microscopía en sus investigaciones, únicamente con este tipo de descripciones, empezaron a diseñar - otras técnicas para obtener una información más cuantitativa de las imágenes microscópicas. De esta manera les - fué posible medir áreas de especímenes impresos en una fotografía por medio de planímetros, así como densidades - ópticas de objetos que se encontraban en negativos de película fotográfica con densitómetros rudimentarios.

El uso de estas técnicas tenía la desventaja de que obligaba al operador a pasar una gran parte de su tiempo involucrado en una labor larga y tediosa, con el fin de obtener unos pocos datos.

En la actualidad se están desarrollando nuevas técnicas - microscópicas para obtener información cuantitativa con - mayor rapidez y exactitud.

Se les conoce con el nombre de Análisis Automático de Imá genes y frecuentemente involucran el uso de aparatos rela tivamente complicados, o de rutinas matemáticas complejas, o inclusive de ambas.

Gracias a ellas nos es posible obtener información acerca de densidades, volúmenes, peso seco, conformaciones espa ciales, etc., del material bajo estudio.

Es muy importante que las personas relacionadas con las - Ciencias Biomédicas conozcan estas técnicas, el tipo de - aparatos que se pueden conseguir, la forma de manejarlos, la clase de datos que se pueden obtener a partir de ellos, etc., para que las incorporen a sus investigaciones debido a que tienen muchas aplicaciones en diversos campos; por - ejemplo se les ha utilizado en Microbiología para contar colonias y medir zonas de inhibición como resultado de la aplicación de diversas sustancias, para evaluar diferen- - tes estadios de procesos cancerosos analizando la estruc- tura de las células, para cuantificar análisis autorradio - gráficos, para la clasificación de células sanguíneas, -

también se pueden analizar cariotipos, frotis cervicales, etc.

En el presente trabajo se utilizaron dos de estas técnicas para hacer un estudio cuantitativo del efecto que ejerce la TAA sobre la síntesis del ARN nucleolar.

Estas dos técnicas son: Microdensitometría y Procesamiento Digital de Imágenes.

#### MICRODENSITOMETRIA.-

La Microdensitometría sirve para medir densidades de áreas muy pequeñas, se basa en lo siguiente: cuando un haz de luz se hace pasar a través de un medio sólido, líquido o gaseoso, una parte de él es absorbida y convertida en otras formas de energía, por ejemplo, calor. De acuerdo con la Ecuación de Lambert-Beer, si un rayo de luz de una determinada longitud de onda pasa a través de una solución homogénea, la densidad o absorbancia es directamente proporcional a la masa del soluto por unidad de área de solución, o sea a la concentración de la sustancia que absorbe esa luz.

La densidad o absorbancia también se define como el loga-

ritmo del recíproco de la transmitancia, que es la fracción de luz que emerge de la solución.

$$D = \log_{10} 1/T \quad \text{donde} \quad \begin{array}{l} D = \text{Densidad} \\ T = \text{Transmitancia} \end{array}$$

En el caso de la Microdensitometría no podemos hablar de una absorbancia específica, es decir, que la sustancia sea capaz de absorber luz de una determinada longitud de onda, sino más bien de que esa sustancia impide el paso de la luz, en un grado mayor o menor dependiendo de su concentración. Como en los métodos densitométricos tradicionales, se requiere de una fuente luminosa que produce un rayo de luz paralelo y monocromático, un sujetador del espécimen a analizar y un detector de luz, el cual convierte la intensidad luminosa en una señal voltaica.

Algunas de las ventajas que nos reporta la Microdensitometría son las siguientes:

- a) Se trabaja directamente sobre el organismo, de esta manera la sustancia cuantificada puede ser atribuida a tejidos particulares, células u organelos intracelulares, y las diferencias entre tipos celulares o regiones distintas en un órgano aparentemente

homogéneo pueden ser reconocidas claramente.

- b) Es una técnica de una gran sensibilidad, ya que es capaz de detectar y cuantificar la densidad de cualquier sustancia, aunque ésta se encuentre en una concentración mínima.
- c) Además el hecho de que se utilice el método de barrido, hace que la imágen se encuentre completamente libre de las aberraciones y distorsiones a las que es-  
tán sujetas todas las lentes (Goldstein, 1977).

#### PROCESAMIENTO DIGITAL DE IMAGENES.-

El término procesamiento se refiere a que se van a seguir varios pasos para obtener la información deseada. Se le llama digitalizar una imágen al proceso por medio del cual, de acuerdo a las diferentes densidades que presenta la misma, se le asignan valores discretos en cada punto, que corresponden a diferentes niveles de gris en una escala de 0 a 255.

De esta manera podemos cuantificar la información que deseamos obtener de dicha imágen, la cual se registra en una cinta magnética y a partir de ella se puede volver a

crearla, proceso conocido como "playback", o proyectarse en una terminal del tipo de una televisión. Es importante recalcar que a cada punto de la imagen, cuya dimensión se determina arbitrariamente de acuerdo al tamaño de la misma y al grado de resolución que se desee, corresponde un valor de densidad o nivel de gris, del cual nos vamos a valer posteriormente para estudiarla y clasificarla. El proceso de clasificación y obtención de áreas se lleva a cabo mediante un equipo electrónico computarizado.

Este trabajo tiene como objetivo tratar de cuantificar el efecto que ejerce la Tioacetamida, que como hemos dicho se considera que aumenta el tamaño y densidad de los nucléolos debido a un efecto estimulante sobre la síntesis del ARN nucleolar; y al mismo tiempo, debido a que en la revisión bibliográfica efectuada no se encontró que en nuestro país se estén llevando a cabo estudios de este tipo, difundir el uso de éstas técnicas, ya que tienen una gran variedad de aplicaciones en las Ciencias Biológicas, así como en Medicina.

## M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

### A.- MATERIAL BIOLÓGICO:

Se empleó como material biológico, cultivos de células - HeLa originadas de un carcinoma cervico-uterino (Gey y - cols., 1952), creciendo en monocapa a una temperatura de 37° C, las cuales se establecieron en botellas y posterior<sub>mente</sub> se pasaron a tubos Leighton con laminillas. Se uti<sub>lizó</sub> como medio de cultivo, Medio Basal de Eagle (MBE), - suplementado con Glutamina 200mM, suero de ternera 10% y Penicilina sódica 400 UI/ml, ajustando a un pH de 7.4 y - al cual nos referiremos como "medio normal". La secuencia- de cambios de medio de cultivo se llevó a cabo siguiendo la rutina establecida en el Laboratorio del Dr. Jorge - González Ramírez (González-Ramírez, 1975). La fase loga<sub>rítmica</sub> de crecimiento tiene lugar de 48 a 72 horas des- pués de la siembra.

### B.- TIOACETAMIDA (TAA)

La Tioacetamida (Merck # 8170) es un polvo blanco de aspec<sub>to</sub> opaco, su fórmula empírica es  $\text{CH}_3\text{CSNH}_2$ , tiene un peso molecular de 75.13 daltones. Se utilizó diluída en el - medio normal a una concentración final de  $10^{-5}$  g/ml. El

procedimiento que se siguió fué el siguiente:

- I.- A las 72 horas después de la siembra se les cambió el medio a 12 tubos Leighton con células HeLa.
- II.- A 6 de ellos se les volvió a poner medio normal de Eagle y se consideran como testigos, y a los 6 restantes se les cambió el medio por medio de Eagle + TAA  $10^{-5}$  g/ml, o sea son los experimentales.
- III.- Se fueron fijando en Alcohol metílico absoluto de 2 en 2, un experimental y un testigo, durante el transcurso de los siguientes tiempos: 1h, 3hs, - 6hs, 9hs y 24 hs.
- IV.- Se tiñeron según la técnica de Jacobson (Jacobson, 1952), para células en cultivo. llevando a cabo - los siguientes pasos:
  - 1.- Coloración en May-Grünwald por 25 min.
  - 2.- Lavado en agua neutra
  - 3.- Coloración en Giemsa diluido 1:10 con agua neutra durante 45 min.
  - 4.- Lavado en agua neutra
  - 5.- Deshidratación :

- a) acetona en 2 pasos rápidos
- b) acetona-xilol a partes iguales  
por aproximadamente 1/2 min.
- c) xilol puro de 3 a 5 min. en un recipiente tapado.

6.- Se montaron en resina sintética

#### C.- TOMA DE FOTOMICROGRAFIAS

Para efectuar el análisis densitométrico, se tomaron fotomicrografías en color de los lotes control y testigo en los diferentes tiempos de acción de la TAA antes mencionados; de cada laminilla se seleccionaron campos adecuados, con tinción uniforme y sin manchas de colorante, tratando de que fuesen representativos dentro de lo posible, de la población celular presente en la laminilla.

Para esto se utilizó película Agfachrome 50L Profesional para luz artificial y el fotomicroscopio Ultraphot de Zeiss. Las especificaciones del fotomicroscopio en este caso fueron:

Celda fotoeléctrica: colocada en el número 7

Oculares : se usaron los del número 12.5x

Objetivo : Se utilizó siempre el correspondiente al aumento 40x

Se tomaron 5 fotomicrografías de cada lote testigo y 5 de cada experimento, haciendo un total de 10 fotomicrografías por cada tiempo de acción de la TAA. En cada lote se analizaron aproximadamente 250 células. La película se reveló según los procedimientos establecidos para su tipo.

#### D.- DIGITALIZACION DE LAS FOTOMICROGRAFIAS

Para llevar a cabo la digitalización de las fotomicrografías se utilizó un Microdensitómetro modelo 1010A de Perkin Elmer (ver fig. 1), el cual está diseñado para obtener lecturas precisas de densidad o transmitancia de áreas muy pequeñas, y determina a su vez la localización precisa de estas áreas con referencia a un origen. Estas lecturas se logran haciendo pasar un rayo de luz a través del sistema óptico inferior - la muestra a ser analizada el sistema óptico superior, el cual es simétrico al inferior y después por el tubo fotomultiplicador, el cual convierte la intensidad luminosa en una señal de voltaje, que varía proporcionalmente a la intensidad luminosa. El

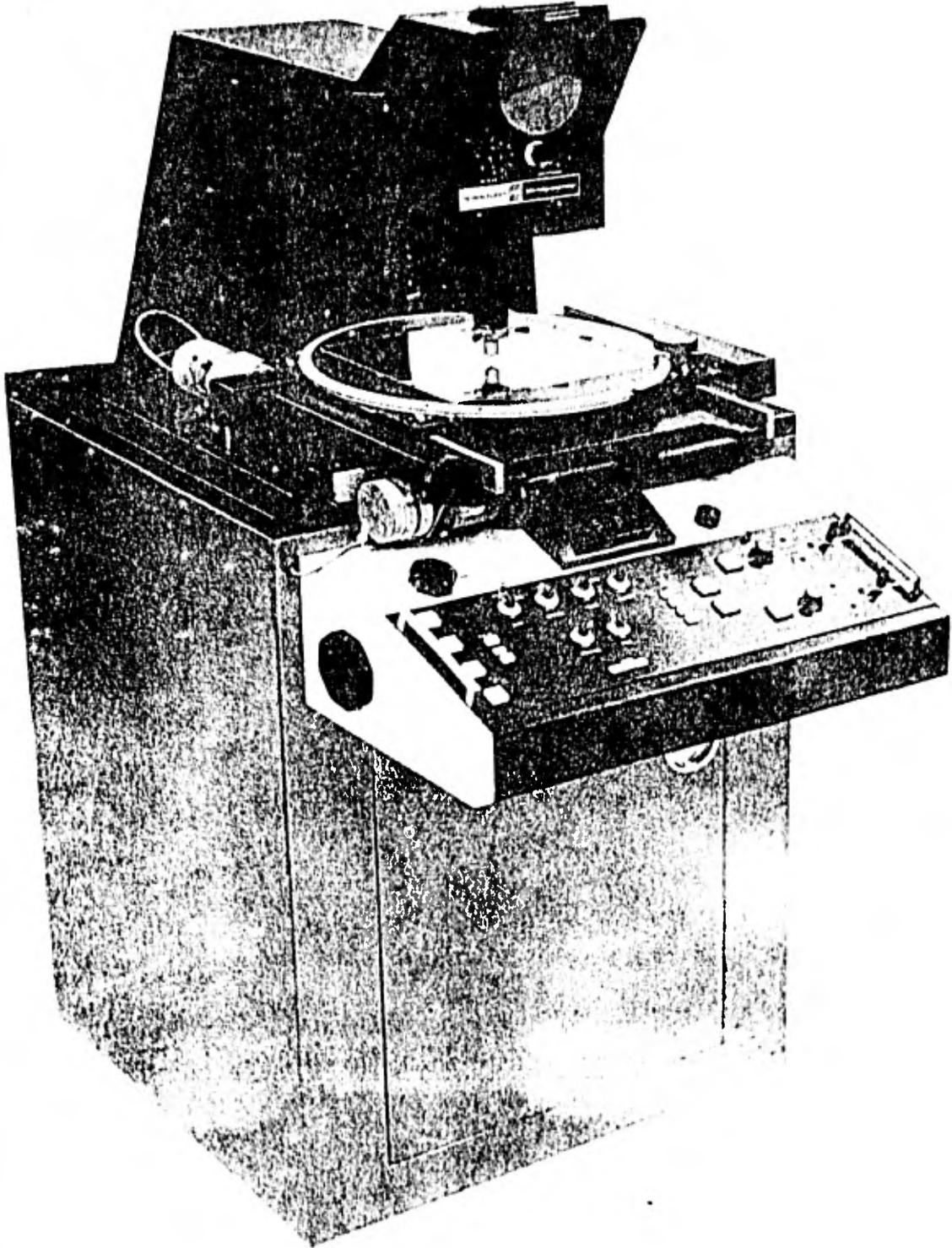


FIG. 1.- MICRODENSITOMETRO MODELO 1010

aparato se hace funcionar de la siguiente manera:

- 1.- Se fija la diapositiva que contiene la imagen a un vidrio que se encuentra en medio de los dos sistemas ópticos (ver fig. 2).
- 2.- Se calcula el área que va a ser digitalizada, se le informa a la computadora la distancia que va a recorrer en el eje "x" y en el eje "y", la velocidad con que se va a llevar a cabo el barrido, la ventana o tamaño del área iluminada, la cual determina el poder de resolución, el tipo de barrido, que puede ser enmeandro o a partir de un margen, etc.
- 3.- Se ajusta el aparato, de la misma manera en que se ajusta un Microscopio (Iluminación Koehler).
- 4.- Se monta la cinta magnética donde va a ser almacenada la información.
- 5.- Se le dan las instrucciones a la computadora a través de un teletipo para que controle el proceso (ver fig. 3)

Los valores obtenidos son de Transmitancia, los cuales son convertidos a valores de Densidad de acuerdo con la fórmula  $D = \text{Log}_{10} 1/T$  donde  $D = \text{Densidad}$  y  $T = \text{Transmitancia}$  - una transmitancia de 100% equivale a una densidad de 0.00.

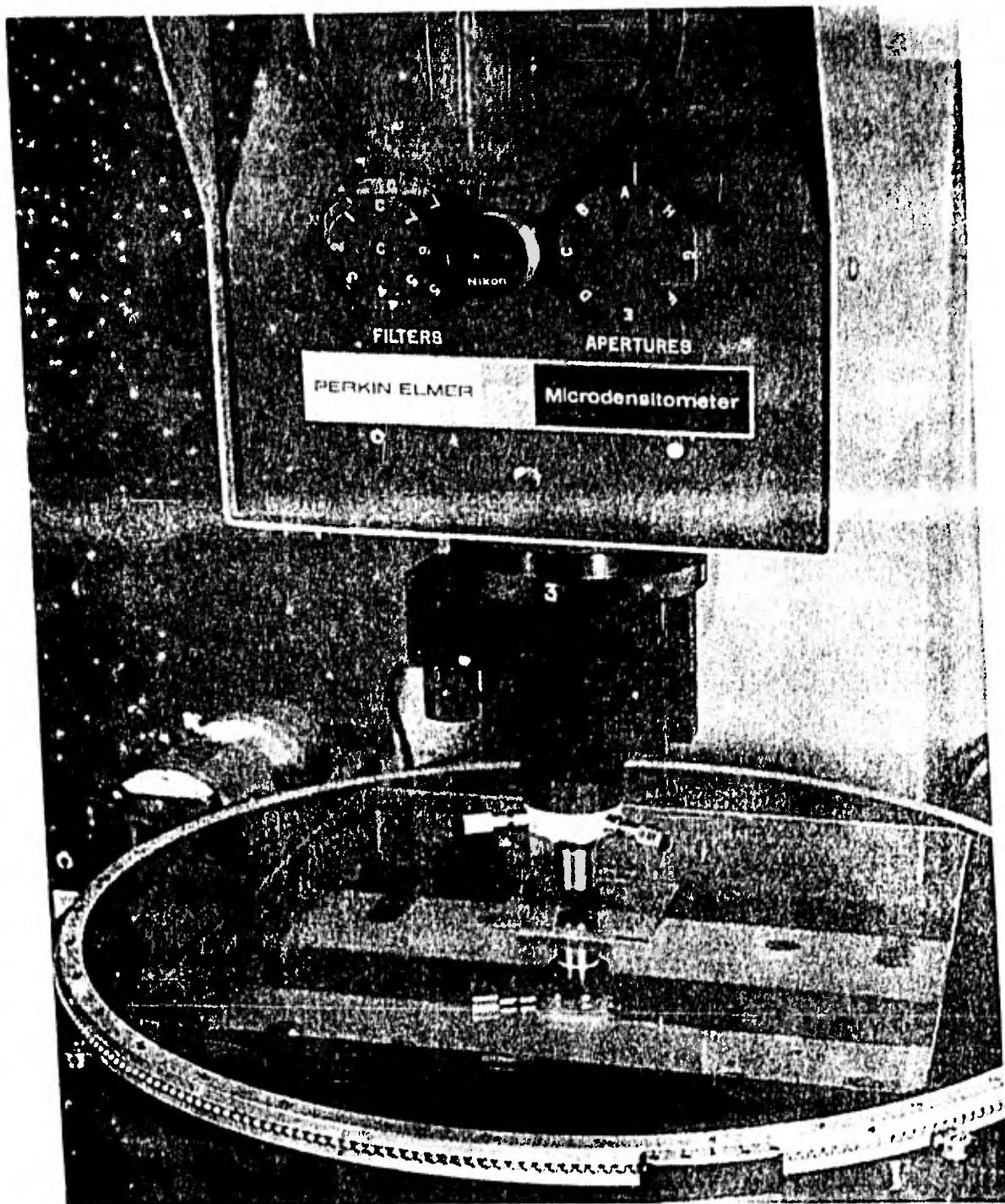


FIG. 2.- CONTROLES SUPERIORES DEL MICRODENSITOMETRO

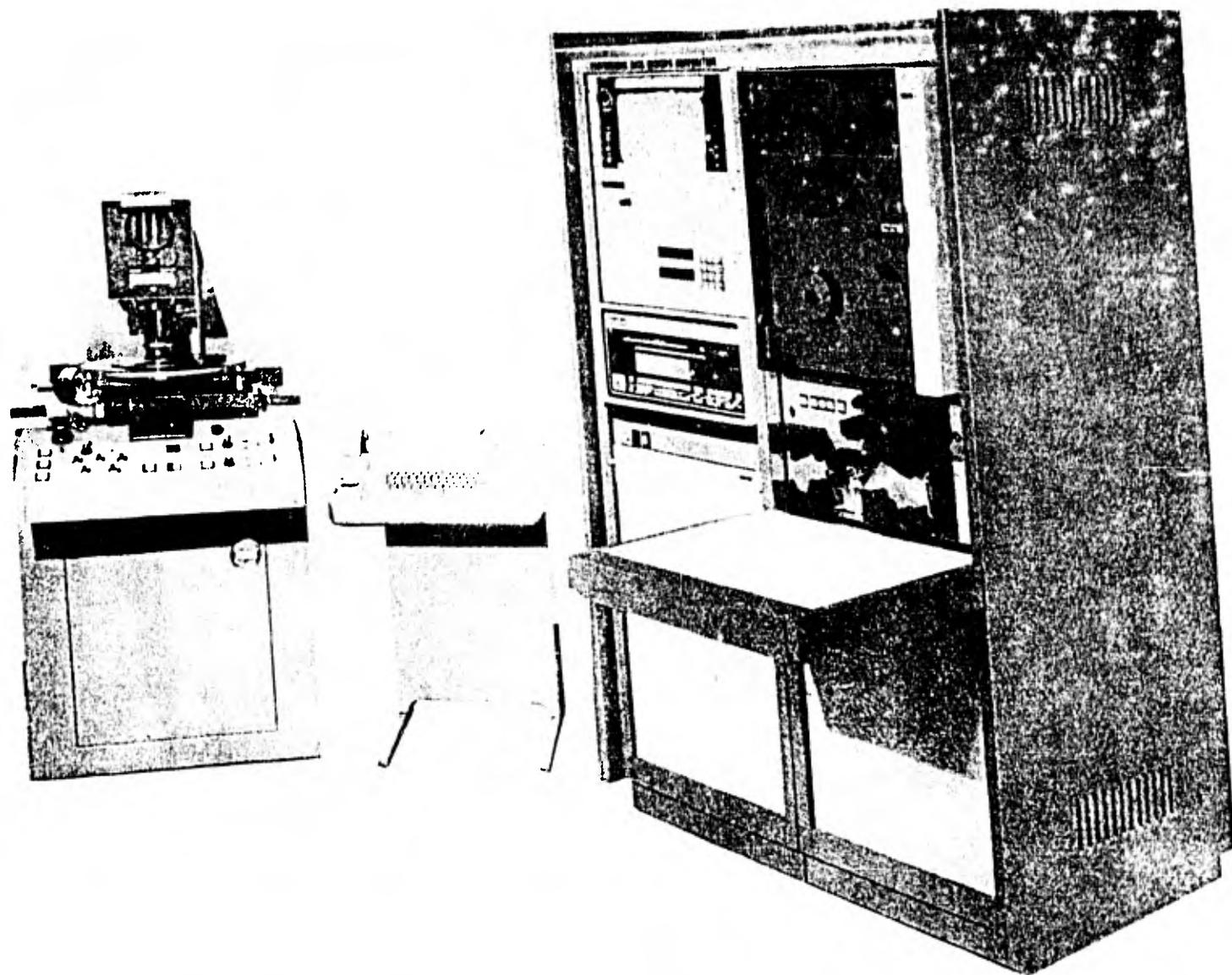


FIG. 3.- SISTEMA MICRODENSITOMETRICO MODELO 1010

Posteriormente estos valores son enviados como señales analógicas de voltaje a un convertidor Analógico-Digital y después ya como información digital a la computadora, - donde estas lecturas son convertidas a unidades de información y almacenadas en una cinta magnética, la cual puede ser usada con otro equipo para un análisis posterior. El funcionamiento automático del Microdensitómetro está - controlado por una computadora de acuerdo a instrucciones y programas externos. Las especificaciones del mismo en este caso fueron:

Punto de la imagen o ventana: 50 micras por lado.

Digitalización: en nivel de gris, gama de 0 a 255.

Objetivo: 10x

Como siguiente paso, la imagen que se encuentra digitalizada en la cinta, se coloca en una lectora de cintas que pertenece al equipo de la computadora IBM 370 modelo 155 y se le pide a ésta, por medio de un programa específico, que la incluya en un disco y despliegue la imagen en una terminal para su análisis.

#### E.- CLASIFICACION DE LAS IMAGENES

Para esto se utilizó una terminal Ramtek GX-100B (Ramtek

Corporation), conectada por medio de una interfase a la computadora. Esta terminal cuenta con dos monitores Conrac; el primero, de colores para el despliegue de imágenes, con una resolución máxima de 512 líneas, cada una de 510 elementos y el segundo en blanco y negro, para la comunicación con el sistema computarizado, la cual se lleva a cabo a través de un teclado y un manipulador del cursor, lo cual permite usar interactivamente la computadora.

Para clasificar las imágenes se utilizó un paquete de programas, los cuales ofrecen varias posibilidades a seguir durante este proceso. Los pasos a realizar fueron los siguientes:

- a) Montar una imagen en el sistema.- Mediante un programa de carga, el cual se ocupa de pasar las imágenes de cinta a disco y viceversa.
- b) Desplegarla en la pantalla.- Las imágenes se pueden desplegar amplificadas o reducidas y a su vez pueden ser desplazadas en sentido vertical.
- c) Amplificarla en el área de mayor interés.- Para definir mejor los campos de trabajo.
- d) Seleccionar campos.- Con un cursor, se delimita un área dentro de la célula, de la cual estamos seguros a qué estructura celular pertenece, y posteriormente

se agrupan estos campos dentro de clases, por ejemplo: clase nucléolo, clase núcleo, clase citoplasma, clase medio intercelular, etc. El objetivo de seleccionar campos es permitir el cálculo de estadísticas que se utilizarán durante la clasificación.

- e) Encontrar dentro de qué rango de densidad se encuentra cada clase.
- f) Clasificarla.- A cada punto de la imagen, de acuerdo a su valor de densidad, se le asigna dentro de una - clase siguiendo leyes de probabilidad.
- g) Asignar un color.- De una manera arbitraria para cada clase.
- h) Obtener el área ocupada por cada clase, por medio del color que la representa.

A todo este proceso se le llama Clasificación Supervisada.

## R E S U L T A D O S

### A.- DENSIDAD

Los valores de Densidad correspondientes a cada una de las fotomicrografías que fueron digitalizadas, se encuentran dentro de una región de la cinta magnética llamada archivo. Por medio de instrucciones que se le dan a la computadora, a través de un teletipo, se le pide que imprima en una hoja de papel todos los valores de Densidad que contiene en cada archivo; de esta manera se obtiene una lista doble, - la cual por una parte presenta los valores de densidad encontrados en la imagen y por la otra el número de puntos - que tienen esos valores. Como anteriormente se identificó dentro de qué rango de Densidad se encuentran los puntos - pertenecientes al nucléolo, se suman todos los valores que caen dentro de dicho rango, y así se obtiene la densidad - nucleolar de la imágen; como también se conoce cuántas células se encuentran en cada imágen, dividiendo ese valor - entre el número de ellas se obtiene la densidad nucleolar por célula.

En la Tabla 1 se presentan los valores de Densidad correspondientes a cada tiempo de acción de la Tioacetamida, los

TABLA 1: VALORES DE DENSIDAD CORRESPONDIENTES A DIFERENTES TIEMPOS DE ACCION DE LA TAA.

Tiempo (hrs.)	LOTE	1	2	3	4	5	Prome- dio $\bar{x}$	S	S <sup>2</sup>	$\Delta$ Densidad/ Cel
1	Testigo	276.24	380.24	257.21	301.03	294.56	301.87	47.03	2211.83	145.37
	Experimental	421.99	454.22	429.38	469.88	460.81	447.24	20.65	426.39	
3	Testigo	305.72	292.89	312.41	308.27	312.61	306.38	8.08	65.29	151.2
	Experimental	474.28	489.45	431.93	412.46	479.80	457.58	33.47	1120.51	
6	Testigo	280.8	283.1	240.1	269.56	270.33	268.78	17.14	293.77	165.72
	Experimental	455.31	391.34	464.18	392.89	468.79	434.5	39	1521	
9	Testigo	337.03	321.41	306.38	326.45	314.92	321.24	11.59	134.31	8.17
	Experimental	363.87	315.13	321.87	330.75	315.41	329.41	20.29	411.51	
24	Testigo	307.76	346.73	388.63	309.93	321.52	334.91	33.79	1141.49	2.31
	Experimental	338.12	332.85	355.13	368.06	291.93	337.22	28.91	835.74	

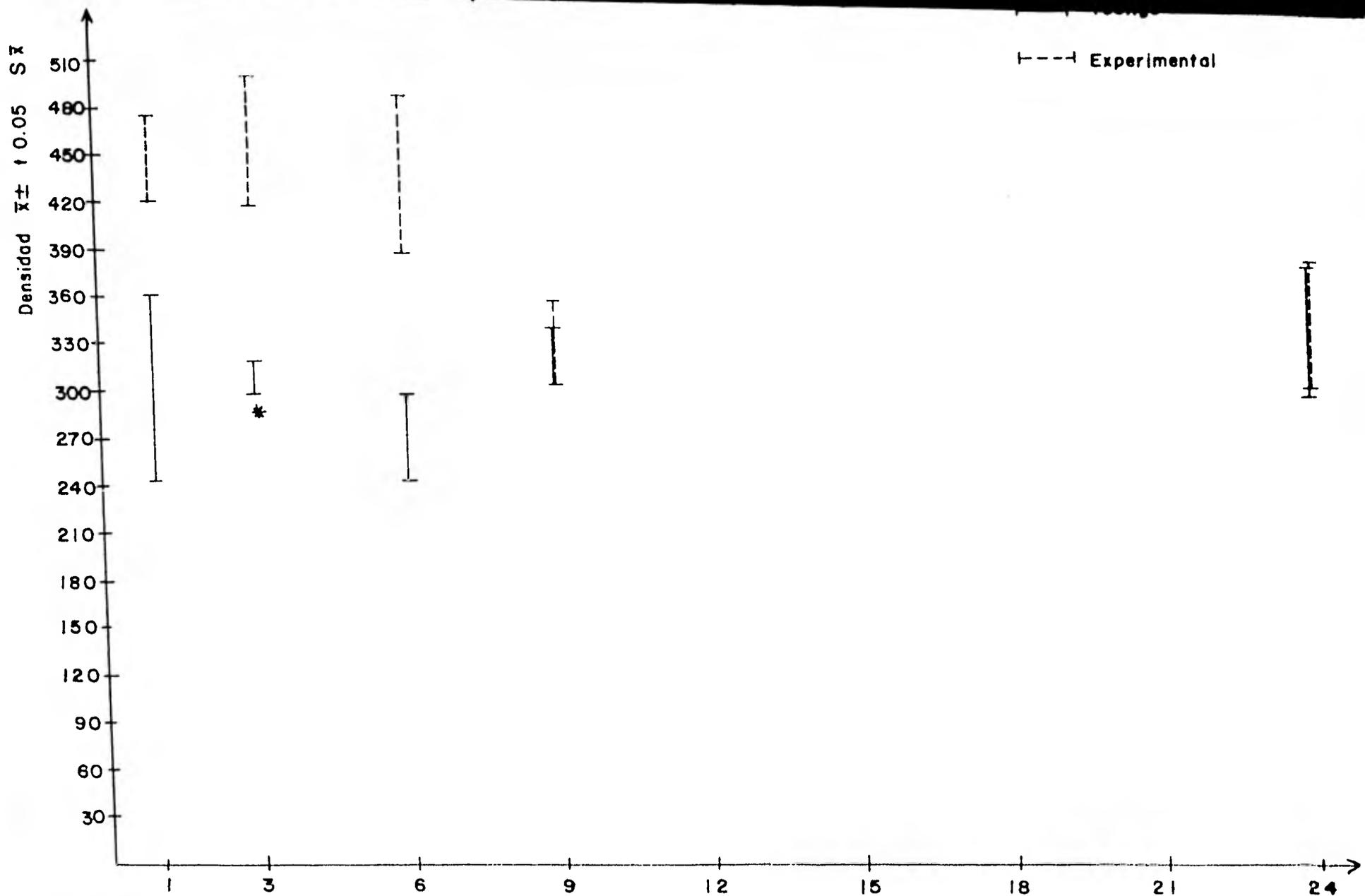


FIG. 4.- Límites de confianza para  $\bar{X}$  corregidos por la distribución de "t"

Nota: El \* significa que la prueba de "F" resulta ser significativa para ese tiempo.

Tiempo  
(hrs)

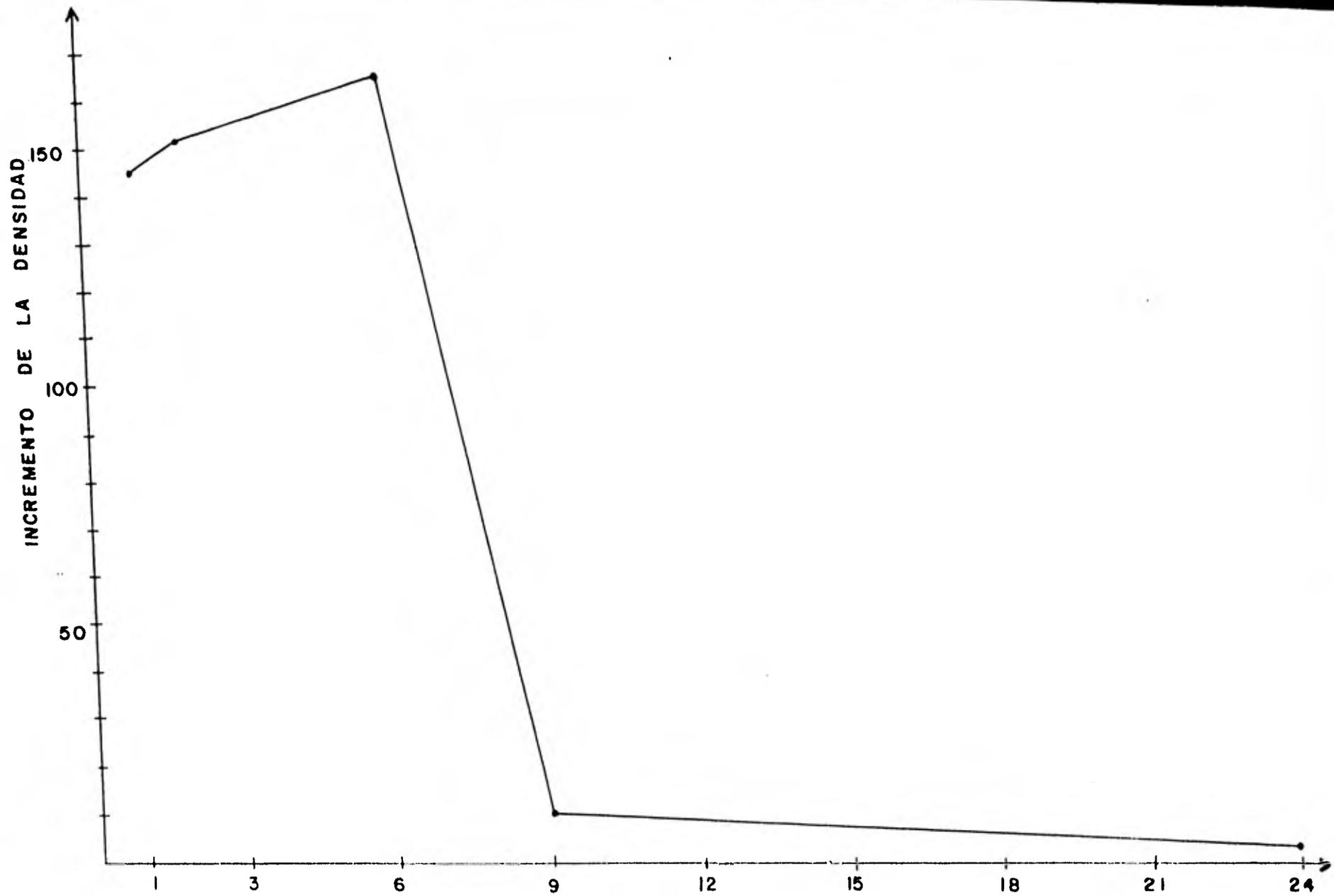


Fig. 5.- Incremento de la Densidad (Lote experimental)

Tiempo  
(hrs.)

datos 1, 2, 3, 4, y 5 se refieren a que se analizaron 5 - fotomicrografías en cada lote, tanto experimental, como - testigo.

En la figura 4 se encuentra una gráfica que representa la Densidad promedio para los diferentes tiempos muestreados, así como los límites de confianza para el promedio ( $\bar{x}$ ) corregidos por la distribución de "t".

También se encuentra graficado (fig. 5) el incremento en la Densidad ocurrido en el lote experimental, durante los diferentes tiempos en que se dejó actuar a la TAA.

#### B.- A R E A

Los valores de Area se obtuvieron directamente de la computadora, a través de un programa diseñado específicamente para realizar este cálculo una vez que la imagen se encontraba totalmente clasificada, y representada cada clase (núcleo, nucléolo, citoplasma, etc.) por un color diferente; a esta imagen en color se le conoce como "mapa de clasificación". La computadora proporciona un reporte de medición de áreas de acuerdo al espacio que ocupa dentro de una imagen cada color, debido a que no puede distinguir el área correspondiente a una determinada estructura celular.

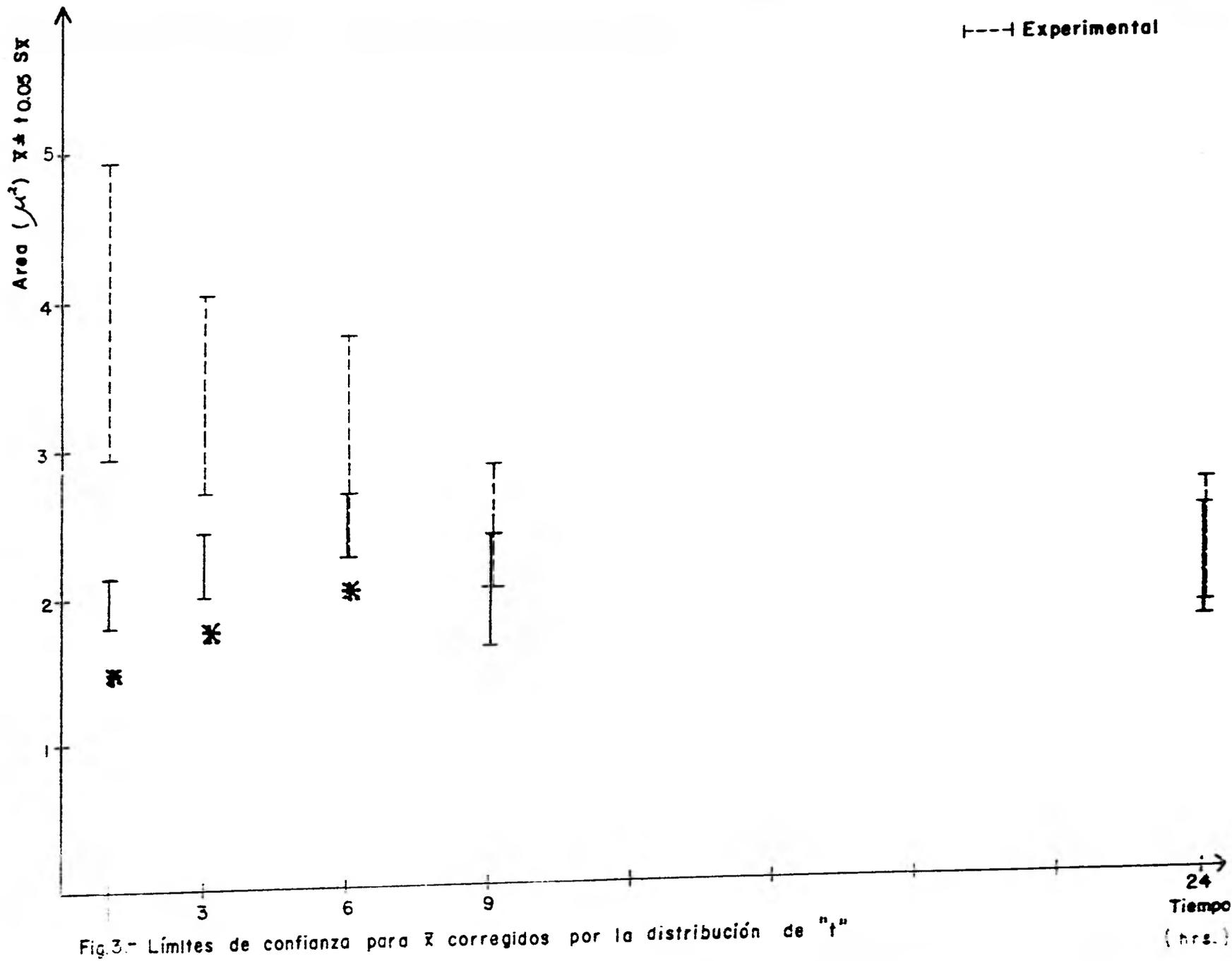


Fig.3.- Límites de confianza para  $\bar{x}$  corregidos por la distribución de "t"

TABLA 2: VALORES DE AREA ( $\mu m^2$ ) CORRESPONDIENTES A DIFERENTES TIEMPOS DE ACCION DE LA TAA.

Tiempo (hrs.)	LOTE	1	2	3	4	5	$\bar{X}$	S	S <sup>2</sup>	$\Delta$ Area/ Cel
1	Testigo	1.82	2.12	2.06	2.02	1.82	1.97	0.139	0.019	1.978
	Experimental	3.49	4.49	4.62	2.74	4.39	3.95	0.807	0.65	
3	Testigo	1.99	2.2	2.29	2.14	2.44	2.21	0.168	0.028	1.168
	Experimental	3.57	3.11	2.85	4.24	3.13	3.38	0.545	0.297	
6	Testigo	2.53	2.58	2.31	2.23	2.63	2.46	0.175	0.031	0.556
	Experimental	4.01	2.51	2.79	2.58	3.17	3.01	0.614	0.377	
9	Testigo	2.19	1.96	2.4	1.73	1.67	1.99	0.308	0.095	0.474
	Experimental	2.43	2.82	1.96	2.38	2.67	2.45	0.328	0.107	
24	Testigo	1.93	2.02	2.63	1.93	1.95	2.09	0.303	0.092	0.12
	Experimental	2.15	2.22	2.79	1.94	1.96	2.21	0.345	0.119	

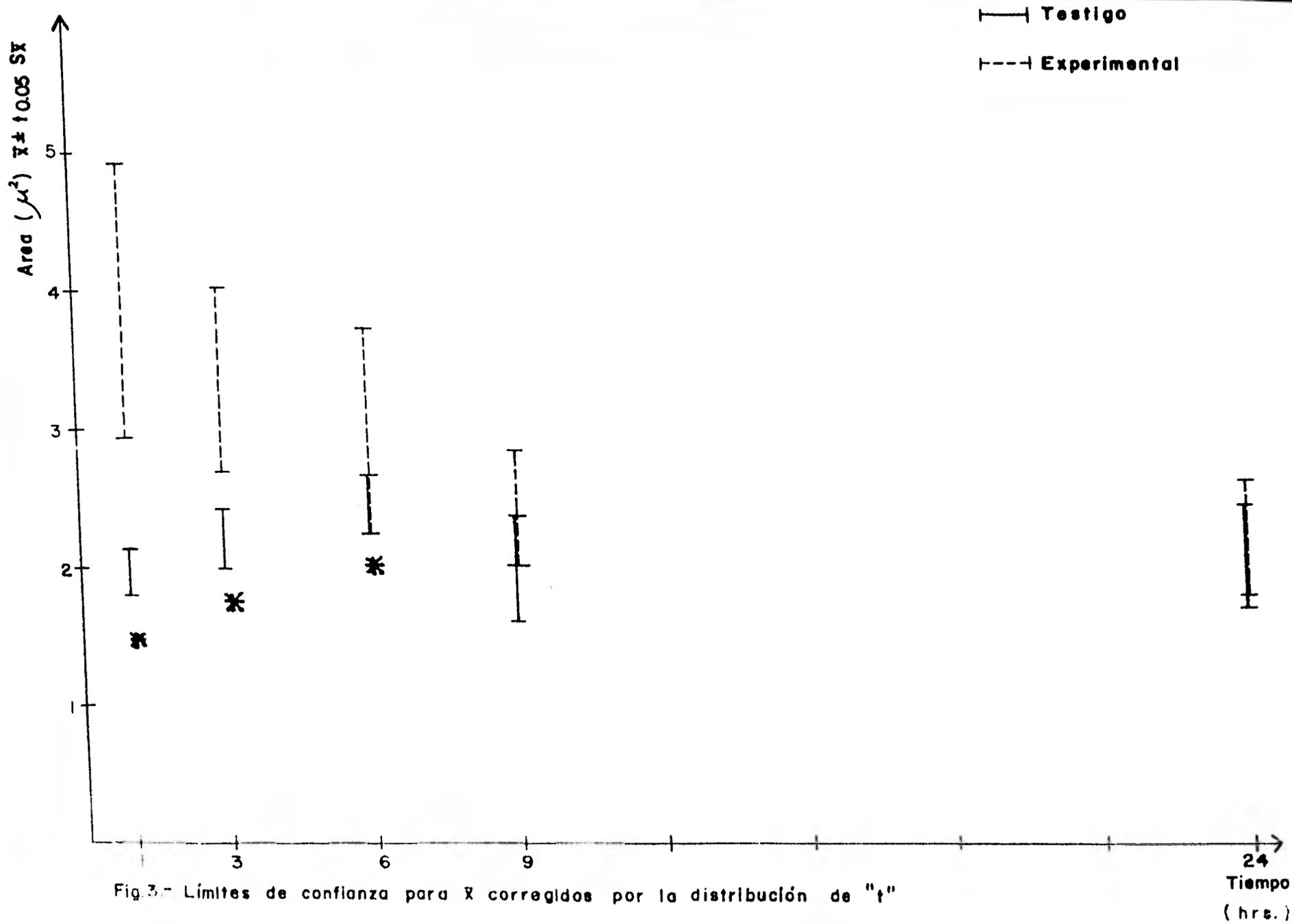


Fig. 3.- Límites de confianza para  $\bar{X}$  corregidos por la distribución de "t"

24  
Tiempo  
(hrs.)

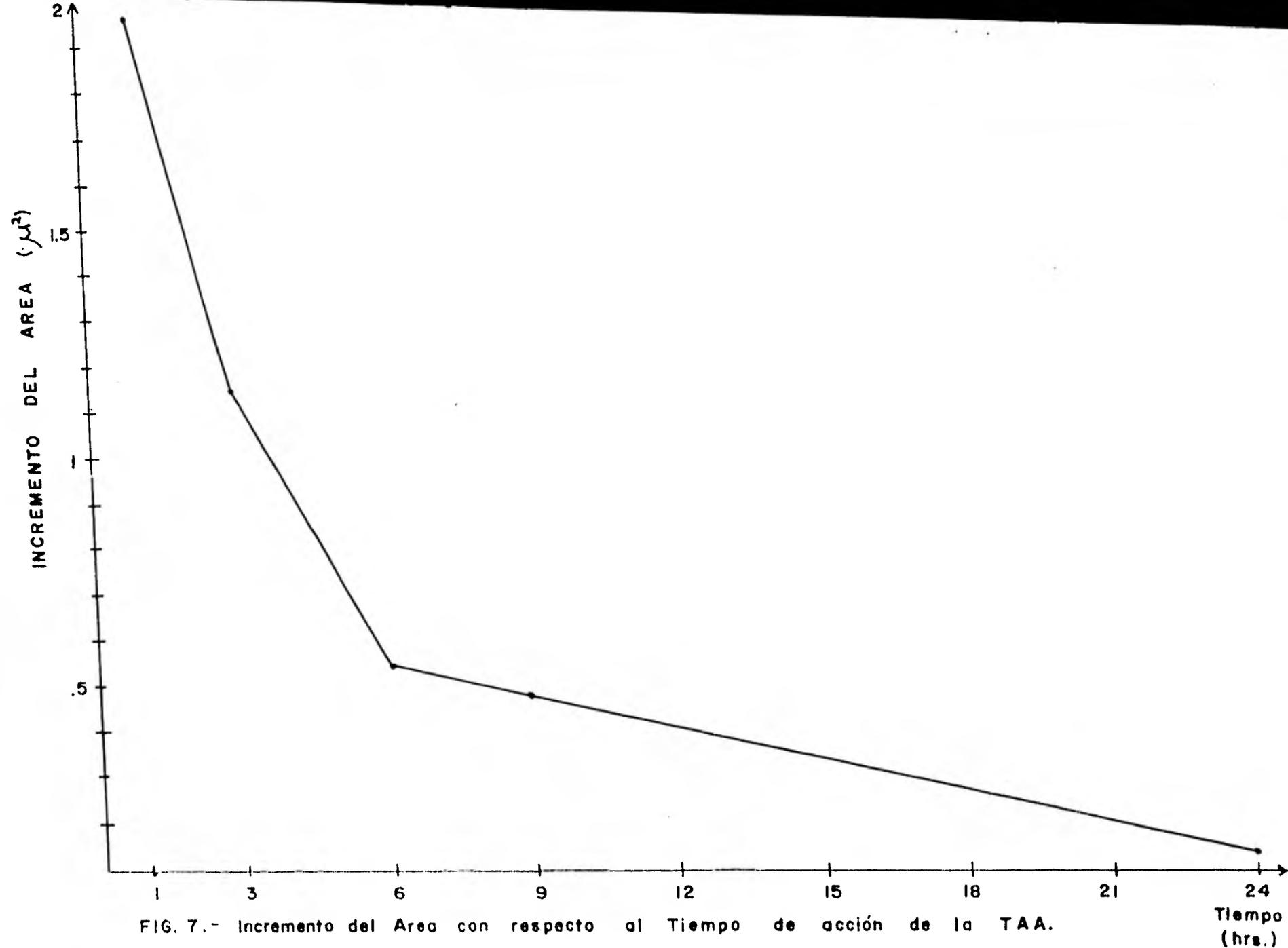


FIG. 7.- Incremento del Area con respecto al Tiempo de acción de la TAA.

24  
Tiempo  
(hrs.)

Haciendo las conversiones correspondientes de acuerdo a la amplificación final que tiene la imagen, se pueden obtener estos valores en la unidad que se desee, por ejemplo, - -  $\mu\text{m}^2$ .

En la tabla 2 se encuentran contenidos los valores de Area correspondientes a cada tiempo de acción de la TAA; los valores 1, 2, 3, 4 y 5 se refieren a que se analizaron 5 fotomicrografías en cada lote tanto experimental como testigo.

En la figura 6 se encuentra una gráfica que representa el Area promedio para los diferentes tiempos muestreados, - así como los límites de confianza para el promedio ( $\bar{x}$ ) - corregidos por la distribución de "t".

Asimismo, se encuentra graficado (fig.7) el incremento en el Area ocurrido en el lote experimental durante los diversos tiempos en que se permitió actuar a la TAA.

### C.- ANALISIS ESTADISTICO

Los resultados de medición tanto de Densidad como de Area, fueron sometidos a un análisis estadístico con el objeto de establecer la presencia de algún efecto producido por la

droga utilizada. Para ello se utilizó la prueba de "F" , prueba de igualdad entre dos variancias, y el Análisis de Variancia (Snedecor, 1979).

#### Prueba de "F" Densidad

##### Tiempo

1 h	F=5.19	No significativo
3 h	F=17.16	Sí significativo nivel .05
6 h	F=3.89	No significativo
9 h	F=3.06	No significativo
24 h	F=1.37	No significativo

#### Prueba de "F" Area

##### Tiempo

1 h	F=34.27	Si significativo
3 h	F=10.61	Si significativo
6 h	F=12.16	Si significativo
9 h	F=1.13	No significativo
24 h	F=1.29	No significativo

### Análisis de Variancia.-

Utilizaremos el Análisis de Variancia como prueba estadística, para evaluar la existencia de algún efecto ejercido por la Tioacetamida con respecto a Densidad ó Area dentro del lote experimental, porque además de que es una técnica más confiable que la Prueba de "t" cuando se quieren comparar más de dos muestras poblacionales, principalmente - porque nos permite identificar las fuentes específicas de variación, de manera que al hacer el análisis es posible - averiguar la magnitud de las contribuciones de cada una de estas fuentes a la variación total.

TABLA 3  
 TABLA DE ANALISIS DE VARIANCIA  
 DENSIDAD ( TESTIGOS )

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	VARIANCIA	RAZON DE VARIANCIAS
ENTRE LOS GRUPOS ( TIEMPOS )	12,344.35	4	3,086.09	4.01 *
DENTRO DE LOS GRUPOS ( ERROR )	15,387.42	20	769.37	
TOTAL	27,731.77	24	1,155.49	

Nota : El asterisco significa que el valor encontrado es significativo para una F .95

TABLA 4  
 TABLA DE ANALISIS DE VARIANCIA  
 DENSIDAD ( EXPERIMENTALES )

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	VARIANCIA	RAZON DE VARIANCIAS
ENTRE LOS GRUPOS ( TIEMPOS )	78,277.83	4	19,569.46	22.68 **
DENTRO DE LOS GRUPOS ( ERROR )	17,260.57	20	863.03	
TOTAL	95,538.4	24	3,980.7	

Nota : Los dos asteriscos (\*\*) significan que el valor encontrado es altamente significativo para una  $F_{.95}$

TABLA 5  
 TABLA DE ANALISIS DE VARIANCIA  
 AREA ( TESTIGOS )

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	VARIANCIA	RAZON DE VARIANCIAS
ENTRE LOS GRUPOS ( TIEMPOS )	0.8	4	.2	4 *
DENTRO DE LOS GRUPOS ( ERROR )	1.05	20	.05	
TOTAL	1.85	24	0.08	

Nota : El asterisco significa que el valor encontrado es significativo para una F .95

TABLA 6  
 TABLA DE ANALISIS DE VARIANCIA  
 AREA ( EXPERIMENTALES )

FUENTE DE VARIACION	SUMA DE CUADRADOS	GRADOS DE LIBERTAD	VARIANCIA	RAZON DE VARIANCIAS
ENTRE LOS GRUPOS ( TIEMPOS )	9.8	4	2.45	7.9 *
DENTRO DE LOS GRUPOS ( ERROR )	6.21	20	0.31	
TOTAL	16.01	24	0.57	

Nota : El asterisco ( \* ) significa que el valor encontrado es significativo para una F .95

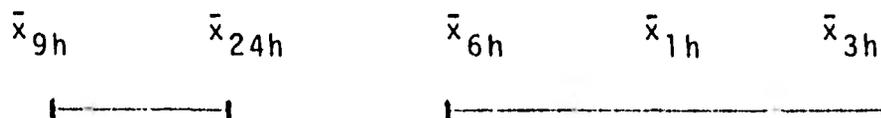
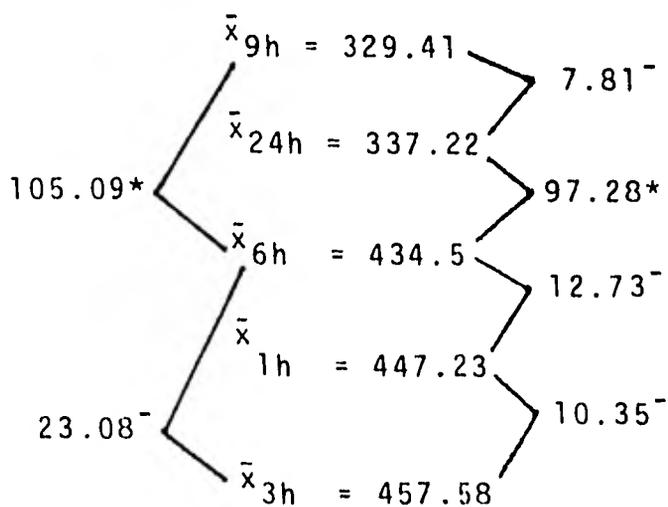
## ANALISIS DE VARIANCIA

## DENSIDAD EXPERIMENTALES

Grupos que difieren entre sí, de acuerdo a la Mínima Diferencia significativa.

$$MDS = t_{p < 0.05} \sqrt{\frac{2S^2_{Error}}{n}}$$

$$MDS = 39.4$$



Esta forma de esquematizar los resultados, nos dice que entre los tiempos 9 y 24 hrs. no existe diferencia significativa, ni entre los tiempos 6, 1 y 3 hrs., aunque si la existe entre estos dos grupos.

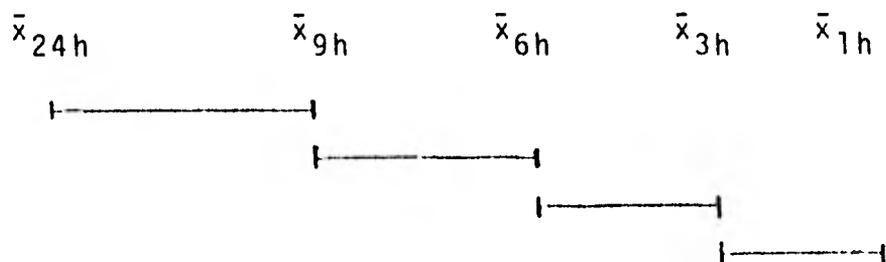
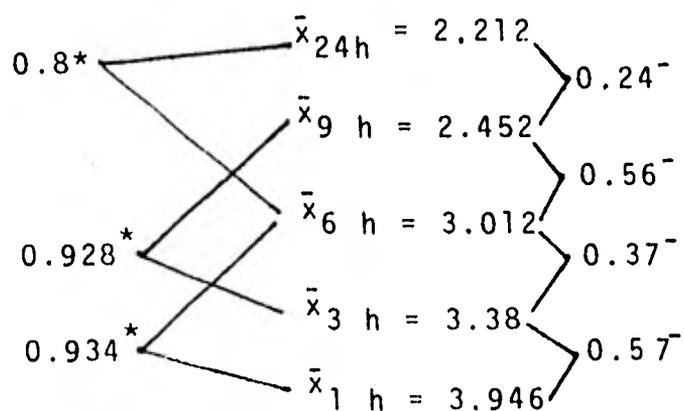
NOTA: El término error se usa para referirse a la variación no controlada que existe entre los miembros de cualquier población.

ANALISIS DE VARIANCIA  
AREA EXPERIMENTALES

Grupos que difieren entre sí, de acuerdo a la Mínima Diferencia Significativa.

$$MDS = t_p < 0.05 \sqrt{\frac{25^2 \text{ Error}}{n}}$$

$$MDS = 0.75$$



Este esquema muestra que cada tiempo muestreado no tiene diferencia significativa con sus vecinos más cercanos.

Concretizando los resultados son los siguientes:

### DENSIDAD

- 1.- La Densidad nucleolar se encuentra aumentada durante las primeras 6 h de acción de la TAA, disminuyendo - bruscamente después de éste tiempo, (Ver gráficas 4- y 5).
- 2.- El valor de "F" correspondiente a las 3 horas de tratamiento es significativo, es decir, se encuentra una diferencia entre las variancias experimental y testigo en ése tiempo (Ver gráfica 4).
- 3.- El Análisis de Variancia hecho a los Controles arroja un valor significativo, para  $F_{.95}$  (2.87), (Ver tabla 3).
- 4.- Con respecto a los experimentales, la razón de variancia es altamente significativa; se observa que hay diferencia entre los tres primeros tiempos (1h, 3h y 6h) con respecto a los dos últimos (9h y 24h), (Ver tabla 4).

A R E A

- 1.- El aumento en el Area se observa principalmente durante las tres primeras horas de acción de la TAA. (Ver-figs. 6 y 7).
- 2.- Los valores de "F" correspondientes a 1h, 3h y 6h resultan ser significativos, (ver fig. 6).
- 3.- El Análisis de Variancia hecho a los controles arroja un valor significativo para  $F_{.95}$  (2.87), (Ver tabla 5).
- 4.- En el Análisis de Variancia realizado en los lotes experimentales, se observa que la diferencia existe entre los dos primeros tiempos (1h y 3h) con respecto a los dos últimos (9h y 24h), (Ver tabla 6).

## D I S C U S I O N

La Densidad nucleolar se encuentra aumentada en un 50% - aproximadamente dentro de las primeras 6 horas de acción de la TAA y disminuye rápidamente después de ése tiempo. Lo cual concuerda con Fernández - Herrero (1975), quien al estudiar la influencia de esta droga sobre la síntesis y-movilización del ARNr utilizando  $U^3$ , observó que ésta influye desde que entra en contacto con las células, sobre la incorporación del precursor, ya que sus autorradiografías mostraban una acumulación de marca en el nucléolo - desde las primeras horas de acción de la droga.

El incremento producido en el Area nucleolar dentro de las 3 primeras horas en que se permitió actuar a la TAA, también es de un 50% aproximadamente con respecto a los lotes que no fueron sometidos a esta acción.

Además de que la TAA tiene un efecto estimulante sobre la incorporación del precursor, se piensa que cause un bloqueo o un "retardo" en la salida del ARNr, ya que cuando se trabaja con isótopos marcados, la marca permanece en el nucléolo por un tiempo mayor que en los no tratados y durante este lapso no se observa que el isótopo pase del nucléolo hacia citoplasma (Fernández-Herrero, 1975). Esta podría

ser una explicación de porqué el nucléolo presenta una mayor densidad y tamaño,

Por otra parte también es posible que al quedar en el nucléolo tratado con TAA, grandes cantidades de elementos granulares, los cuales están formados por precursores más pesados (28S) y desaparecer los fibrilares que son más ligeros (6S), éste presente una mayor densidad.

No se conoce claramente a qué nivel actúa la TAA, aunque por lo dicho anteriormente con respecto a que "retarda" la salida del ARNr podría ser a nivel de membrana celular, pero el resolver esta cuestión tendrá que ser objeto de estudios posteriores.

El hecho de que el Análisis de Variancia proporcione un valor que es significativo para los lotes Control, tanto de Densidad como de Area, se explica por el hecho de que aun cuando una rutina histológica sea realizada con la mayor precisión posible, puede variar ligeramente el grado en que quedan teñidas unas preparaciones con respecto a otras, y debido a que la técnica utilizada es de una gran sensibilidad, detectó estas variaciones, pero aun así el valor de "F" encontrado por el Análisis de Variancia en los lotes Experimentales es considerablemente mayor, lo

cual nos asegura que la diferencia existente entre los diferentes tiempos muestreados, es debido al efecto ejercido durante ellos por la TAA.

La Microscopía ha dejado de darnos información exclusivamente descriptiva. Gracias al desarrollo alcanzado por la Electrónica y a su gran posibilidad de aplicación para mejorar o crear nuevos instrumentos, ha sido posible implementar esta serie de técnicas microscópicas que nos permiten obtener una información cuantitativa precisa del material que estemos analizando.

Existen aparatos que originalmente no fueron diseñados para trabajar con material biológico, como es el caso del instrumento utilizado en la presente investigación, pero que con una sencilla modificación en el Sistema Optico, o simplemente adaptando nuestro experimento a la forma en que ellos trabajan, es posible llegar a resultados comparables a los obtenidos con un equipo diseñado para este fin.

Según nuestra experiencia, haríamos las siguientes recomendaciones a las personas interesadas en llevar a cabo un estudio Microdensitométrico.

- 1.- Los especímenes a ser analizados deben ser delgados, si se trata de células es recomendable la técnica de cultivo de tejidos, porque nos permite mantenerlas - aisladas y en una sola capa.
- 2.- Se requiere de un Microscopio de alta resolución en el Sistema Optico, si se desea trabajar con preparaciones.
- 3.- Cada "punto de la imagen" debe tener un área lo suficientemente pequeña para que sea efectivamente homogénea.
- 4.- Si la imagen a analizar originalmente está bien contrastada, es preferible no recurrir a técnicas histológicas químicas, ya que debido a la sensibilidad del método estaríamos introduciendo una variable que es muy difícil de controlar. Para que la imagen tenga un mayor contraste se está tratando de utilizar Microscopía de Interferencia o de Fluorescencia (Bereiter, - 1977).
- 5.- Se se utilizan preparaciones teñidas, es necesario - asegurarse que la tención sea específica para el material que se desea cuantificar.

- 6.- Existe cierta variedad en cuanto al tipo de instrumentos diseñados para realizar esta clase de estudios, algunos están más automatizados y por lo tanto llevan a cabo el proceso con mayor rapidez, mientras que otros lo realizan más lentamente pero son más sensibles y nos dan información más exacta.
- 7.- Es importante que al diseñar el experimento que se desea realizar se tomen en cuenta factores como el tamaño de muestra necesaria que nos dé resultados confiables, ya que si ésta es excesiva se desperdician recursos, que en el caso de un equipo tan especializado puede resultar costoso.

Al tomar en cuenta las ventajas que nos ofrece la Microdensitometría, en cuanto a que se puede llevar a cabo el estudio directamente sobre el organismo, con las consecuentes ventajas que esto representa, a su gran sensibilidad, a que la imagen se encuentra libre de distorsiones, y a que una vez estandarizado el proceso, se obtienen los resultados de una manera muy rápida y precisa; se puede concluir que la Microdensitometría en el futuro dejará de ser prerrogativa de los especialistas y se convertirá en una herramienta de rutina dentro de los laboratorios, ya que se la puede usar en una amplia variedad de investigaciones biológicas.

### RESUMEN

Se realizó un estudio cuantitativo del efecto ejercido por la Tioacetamida ( $\text{CH}_3\text{CSNH}_2$ ) sobre la síntesis del ARN nucleolar en células HeLa, por estudios previos se sabe que esta droga aumenta el tamaño y densidad de los nucléolos - debido a que estimula la síntesis del ARN nucleolar y bloquea o "retarda" su salida durante las primeras horas de su acción.

Se hicieron mediciones de Densidad y de Area durante los siguientes tiempos: 1h, 3h, 6h, 9h y 24h de los nucléolos sometidos a la droga y de los controles.

Para llevar a cabo estas mediciones sobre las células intactas se utilizaron dos técnicas de los llamados Análisis Automáticos de Imágenes: Microdensitometría y Procesamiento Digital de Imágenes, que requieren de un equipo electrónico altamente especializado.

Se encontró que el aumento en la Densidad es de un 50% - aproximadamente con respecto a los nucléolos que no fueron puestos en contacto con la TAA dentro de las primeras 6 - horas de tratamiento, y que el Area también presenta un incremento del 50% aproximadamente dentro de las 3 primeras

horas de acción de la TAA.

Se discuten algunas de las ventajas de la Microdensitometría, se dan recomendaciones para llevar a cabo este tipo de estudios, así como sus futuros alcances.

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

- Bereiter, J. Selective Contrast Enhancement of Microscopical Specimen by Optical Procedures for Automatized Quantitative Image Analysis. *Microscopica Acta*. 51 (1): 165-180, 1977.
- Brown, D.O. and Dawid, I.B. Developmental Genetics. *Annu. Rev. Genet.* 3: 127-154, 1969.
- Brown, D.O. and Dawid, I.B. Specific Gene Amplification in Oocytes. *Science*. 160:272-280, 1968.
- Busch, H. and Smetana, K. The Nucleolus. Academic Press. pp 626, 1970.
- Cave, M.D. Absence of Ribosomal DNA Amplification in the Meroistic (Telotrophic) Ovary of the Large Milkweed Bug Oncoleptus Fasciatus (Dallas). *The Journal of Cell Biology*. 66: 461-469, 1975.

De Robertis, y cols. Biología Celular. Edit. El Ateneo. 8<sup>a</sup> ed. Caps: 16, 17 y 18, 1977.

Fernández-Herrero, I. Influencia de la Tioacetamida sobre la Síntesis del ARN seguida con - Autorradiografía. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias, UNAM, 1975.

Gall, J.G. Differential Synthesis of the Genes of Ribosomal RNA during Amphibian Oogénesis. Proc. Natl. Acad. Sci. 60:553-560, 1968.

Gall, J.G. The Genes for Ribosomal RNA during Oogénesis. Genetics (Suppl). 61:121-132, 1969.

Gey, G.O., Coffman, W.D. and Kubicek, M.T. Tissue Culture Studies of Proliferative Capacity of Cervical Carcinoma and Normal Epithelium. Cancer Res. 12: 264-268, 1952.

- Goldstein, D.J.                    Integrating Microdensitometry. ---  
Analytical and Quantitative Methods  
in Microscopy. Edited by G.A. Meek  
and H.Y. Elder, \*pp 117-136, 1977.  
\* Cambridge University Press.
- González, R.J.                    Fisiología Nucleolar VI. Boletín de  
Estudios Médicos y Biológicos. 28  
(4), 1973.
- Jacobson, W. and Webb, M. The two Types of Nucleoproteins -  
during Mitosis. Exptl. Cell. Res.  
3: 163-183, 1951.
- Jordan, E.G.                    The Nucleolus. Oxford Biology Rea-  
ders. Oxford University Press. pp  
16, 1971.
- Kleinfeld, R.G.                    Early Changes in Rat Liver Cells -  
Induced by Thioacetamide. Cancer -  
Res. 17:954-962, 1957.
- Laird, A.K.                        Nuclear Changes Induced in Rat Li-  
ver Cells by Thioacetamide. Arch.

Biochem. Biophys. 43: 119-127, --  
1953.

Navarro-Santos, F. Efecto de la Tioacetamida sobre -  
la Incorporación de la Timidina -  
Tritiada al ADN de células HeLa.  
Tesis Profesional. Facultad de --  
Ciencias, UNAM 1976.

Penman, S. RNA Metabolism in the HeLa cell -  
Nucleus. J. Mol. Biol. 17: 117-  
130, 1966.

Penman, S., Smith, I. and Haltzman, E. Ribosomal RNA Syn-  
thesis and Processing in a Parti-  
culate Site in the HeLa cell Nu-  
cleus. Science. 154:786-789, 1966.

Rake, A.V. and Graham, A.F. Kinetics of Incorporation of  
Uridine C14 into L cell RNA. Bio--  
phys. J. 4:267-284, 1964.

Rather, L.J. Experimental Alteration of Nuclear  
and Cytoplasmic components of the

Liver Cell with Thioacetamide. I. Early Onset and Reversibility of Volume Changes of Nucleolus, Nucleus and Cytoplasm. Bull. Johns Hopkins Hosp. 88: 38-58, 1951.

Scherrer, K. and Darnell, J.E. Sedimentation Characteristics of Rapidly Labeled RNA from HeLa -- cells. Biochem. Biophys. Res. Comm. 7: 486-490, 1962.

Scherrer, K. y cols. Demonstration of an unstable RNA and of a precursor to Ribosomal RNA in HeLa cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 49: 240-248, 1963.

Snedecor, G.W. Métodos Estadísticos. CECSA. 1979.

Steele, W.J. and Busch, H. Increased Content of High Molecular Weight RNA fractions in Nuclei and Nucleoli of Livers of Thioacetamide-treated Rats. Biochem. Biophys. Acta 119: