

Lij. 34

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

Facultad de Ciencias

ESTUDIO DEL CRECIMIENTO DE UNA POBLACION DE LINFOCITOS HUMANOS
EN CULTIVO

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

PRESENTA

E L E N A M A R G A R I T A C A S T R O R O D R I G U E Z

febrero de 1983



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	Resumen.....	1
II	Introducción	
	1. Población.....	2
	- Tipos de Crecimiento de las Poblaciones.	3
	- Factores que Determinan el Crecimiento de la Población.....	6
	2. El Cultivo de Linfocitos.....	8
	3. Parámetros que Indican el Crecimiento de la Población de Linfocitos.....	9
	4. Modelo de Incorporación de Timidina Tritiada.....	11
III	Materiales y Métodos	
	- Técnica de Cultivo de Linfocitos.....	12
	- Medio de Cultivo.....	12
	- Siembra.....	12
	- Cosecha.....	13
	- Procesamiento de los Datos.....	15
IV	Resultados	
	- Células Vivas.....	18
	- Incorporación de Timidina Tritiada.....	21
	- Número de Metafasas.....	23
V	Discusión y Perspectivas.....	27
VI	Bibliografía.....	36

I Resumen

Tratando de establecer un esquema que permitiera definir la dinámica de crecimiento, de la población de linfocitos humanos en cultivo, se observaron tres parámetros indicadores de dicho crecimiento, respecto al tiempo de incubación: incorporación de timidina tritiada, determinación del número de mitosis y la sobrevivencia celular.

El comportamiento de la población en cuanto a incorporación de timidina tritiada, coincidió con el modelo propuesto por Ongay en 1978.

En cuanto a la sobrevivencia celular, la población de células vivas aumentó en los primeros 5 días, se mantuvo constante en los siguientes 4 días aproximadamente y disminuyó después hasta casi el 20% de la población inicial, en el último día de incubación. El número de células muertas permaneció constante hasta el día 10 y aumentó en los últimos días.

Por lo que respecta al número de metafases registradas, el comportamiento de la población, fué muy similar al encontrado para incorporación de timidina tritiada.

II Introducción

1. Población

El término "población", se emplea para definir a los grupos de individuos que se adaptan de un modo similar al conjunto de condiciones del medio, (Mettler y Gregg, 1972). También puede definirse como un conjunto de organismos con un considerable número de características en común y sin barreras, que prevengan a sus miembros interrelacionarse libremente cuando se encuentran juntos organismos heterosexuales, (Boughey, 1973).

Según Dobzhanski, (1970), la "población mendeliana" es una comunidad de individuos de una especie que se reproducen sexualmente.

A una población de linfocitos no se le puede aplicar el término de población mendeliana, pero sí el de "población local" o "demo"; este término es aplicado a individuos de la misma especie, se reproduzcan sexualmente o no, (Kormondy, 1978).

En el organismo cada uno de los linfocitos puede actuar individualmente, aunque por supuesto, una respuesta conjunta de todos los tipos celulares involucrados en la respuesta inmune, asegura una recuperación más rápida del balance homeostático del cuerpo, después de que éste ha sido alterado por la presencia de un antígeno.

Para llevar a cabo con eficiencia su acción, los linfocitos se valen de un sistema de señales altamente preciso, el cual les permite comunicarse entre sí y con el medio que los rodea, (Cantor y Gershon, 1979).

Estas características y el modo de actuar ante un antígeno, hacen que se considere a este conjunto de células como una población, en la cual cada individuo toma parte activa en el sistema, dependiendo de las condiciones ambientales predominantes.

Según Carrel (1931), no es posible estudiar a las células y los tejidos como elementos de un cuerpo muerto, sino como organismos vivos que son parte, a su vez, de seres con orden de organización más compleja.

Es necesario estudiar a la célula como parte de un sistema célula - medio y estudiar al mismo tiempo las partes - constituyentes de este sistema.

Tomando como base los hechos anteriores, el presente trabajo pretende establecer un esquema, que describa la dinámica de crecimiento de la población de linfocitos humanos en cultivo, estimulados con un antígeno inespecífico como es la fitohemaglutinina.

- Tipos de Crecimiento de las Poblaciones

El crecimiento de la mayoría de las poblaciones describe una curva en forma de S o sigmoidea como la que se muestra en la figura 1.

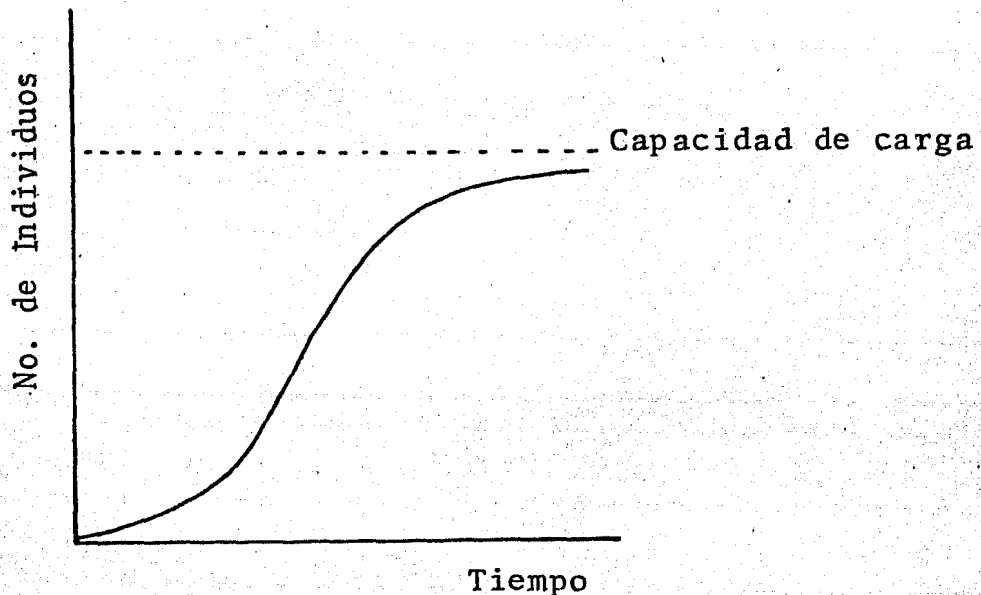


Fig. 1 Curva teórica del crecimiento de una población común. (Tomado de Kormondy, 1978)

De esta curva se puede deducir que el período de crecimiento inicial es lento, pero viene seguido de un período de aumento acelerado y se hace otra vez lento en el nivel superior, de tal manera que la población llega a un equilibrio con el medio y no se produce un cambio neto en su crecimiento (Kormondy, 1978).

Existen casos en que una población sigue creciendo a una determinada velocidad, en lugar de nivelarse, después decrece precipitadamente hacia cero, debido a una gran mortalidad de sus individuos; en estos casos la curva de crecimiento tiene forma de J como se muestra en la figura 2.

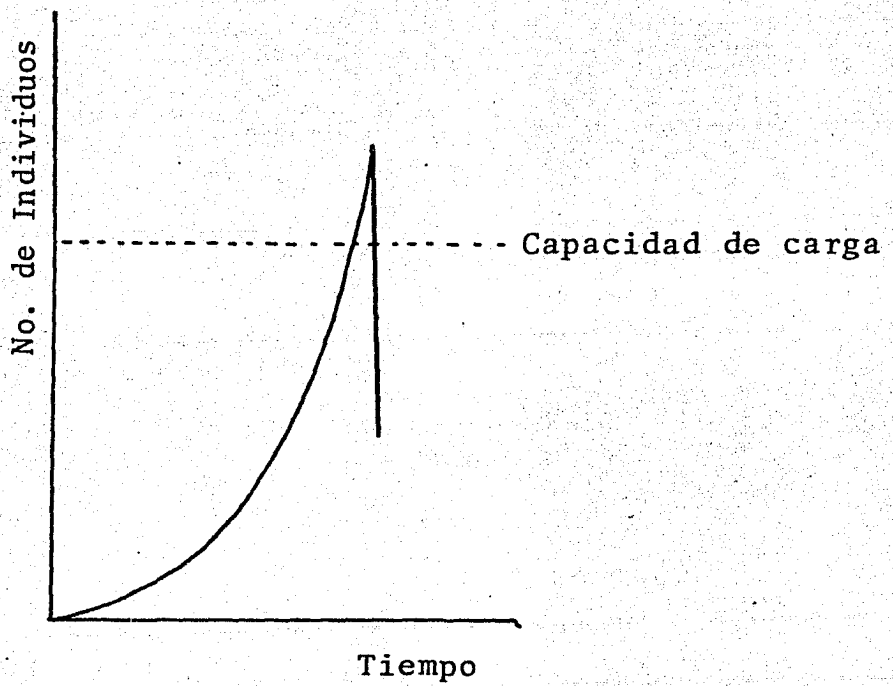


Fig. 2 Ejemplo teórico del crecimiento de una población estacional. (Tomado de Boughey, 1973)

Las curvas en forma de J representan el crecimiento de las plantas anuales que mueren cuando cambia el fotoperíodo

o cuando llegan las heladas; algunas poblaciones de insectos que sólo presentan una generación al año y muchas algas que experimentan un crecimiento estacional, crecen de la misma manera (Kormondy, 1978).

En todos los casos anteriores se trata de un crecimiento sin restricciones, rápido y exponencial hasta los límites del ambiente; cuando la capacidad del medio se agota o se imponen cambios en ella, la población muere (Boughey, 1973).

Es evidente que hay dos fuerzas opuestas que actúan sobre el crecimiento de las poblaciones; una de ellas es la capacidad de reproducirse a un cierto ritmo, llamada potencial biótico y que es inherente y característica de cada población específica; la otra es la mortalidad, o bien la oposición al crecimiento, proveniente de todas las fuerzas del ambiente físico en el que se encuentra el organismo.

En un sistema de cultivo determinado, en nuestro caso el cultivo de linfocitos, estas dos fuerzas serían: por un lado, la capacidad de crecimiento que muestra cada tipo celular, a lo que puede dársele el nombre de potencial biótico; y por otro lado, la longevidad fisiológica de las células, o bien las condiciones "ambientales" del cultivo.

Según Carrel (1931), la capacidad de crecimiento permanece constante mientras el medio en el que se encuentra la población, no sea modificado.

Los ambientes siempre son limitados en mayor o menor grado, por lo tanto en cada ecosistema hay una población máxima capaz de existir en él. Al límite de población que puede sostener el medio, se le llama capacidad de carga. Asimismo si el ambiente cambia, el nivel de equilibrio de una población que habite en él, alcanzará el equilibrio en diferente momento, dependiendo de si el cambio le favorece o le es adverso.

De manera similar, las sustancias que determinan y so-

portan la proliferación celular en cultivo, son proteínas del plasma y proteínas fetales; de la cantidad de tales proteínas depende la capacidad de carga del medio. Otras sustancias pueden estimular la proliferación sin ser capaces de soportarla (Carrel, 1931), un ejemplo de ellas son los antígenos.

- Factores que Determinan el Crecimiento de la Población

Se ha dicho que los linfocitos pueden ser tratados como una población; asimismo todos los factores que afectan el crecimiento de las poblaciones pueden ser aplicados a ellos, sin dejar de tomar en cuenta que dichas células estarán sometidas a condiciones experimentales.

Todo organismo necesita vivir y desarrollarse en un medio que reúna un cierto número de condiciones. Estas condiciones se dividen en dos tipos: los factores abióticos y los factores bióticos. Entre los primeros se encuentran la temperatura, la luz y la humedad que constituyen el clima; las características del suelo y del agua. Todos ellos influyen conjuntamente en el organismo, constituyendo un ambiente físico dentro del cual existen condiciones óptimas, en las que sus funciones vitales se realizan de mejor modo (Boughey, 1973). Entre los factores bióticos se encuentran los factores demográficos, los factores etológicos y las interacciones entre dos diferentes especies como serían el parasitismo, la simbiosis, etc.

De todos estos factores bióticos, el que afecta más rápida y directamente a un organismo es el demográfico. Cuando el total de la población aumenta y se aproxima a la capacidad de carga del medio en que vive, se pone en funcionamiento una regulación del total de individuos: la mortalidad aumenta, la fecundidad disminuye y el espacio y el alimento son motivo de competencia, porque son insuficientes para todos.

Los factores etológicos y las relaciones de dos diferentes especies, influyen grandemente sobre la demografía de la población (Dreux, 1979).

Al igual que en cualquier población, la sobrevivencia y reactividad de las células en cultivo, están propensas a ser afectadas por alteraciones de alguno de los factores -abióticos, como son: pH, tensión de CO₂ y O₂, temperatura, la forma del recipiente del cultivo, la concentración de suero, los componentes del medio de cultivo, etc. (Ling y Kay, 1975).

Es difícil en este caso hacer un análisis de los factores bióticos que determinan el crecimiento de la población de linfocitos, pero se sabe, (Ling y Kay, 1975), que en común con otras células, los linfocitos no sobreviven ni crecen a bajas concentraciones celulares; además que cuando se aislan del cultivo los eritrocitos y granulocitos, la proliferación de los linfocitos disminuye a la mitad o la tercera parte aproximadamente (Wilson, 1966).

Tanto los factores bióticos como los abióticos, están fuertemente relacionados y forman una intrincada red de interacciones, por lo que el análisis de todos ellos bajo condiciones naturales, es extremadamente complicado.

2. El Cultivo de Linfocitos

Los linfocitos pertenecen a la clase de células que requieren del medio en el que se encuentran, una señal para iniciar la replicación de su ADN y posteriormente dividirse. Mazia en 1974, escribió que la división de estas células, se detiene como resultado de la acción de moléculas y células presentes en sus alrededores y que al removerlas del cuerpo, reinician su ciclo celular.

De esta manera es suficiente el sacar del organismo a los linfocitos, para que inicien su división; sin embargo, la respuesta obtenida es muy pequeña, por eso se utilizan mitógenos inespecíficos para estimularlos; estos mitógenos son las lectinas, entre las que se encuentran la fitohemaglutinina y la concanavalina A; existen otros mitógenos como son los filtrados de estafilococos y estreptococos cuya acción es menos acentuada (Ling y Kay, 1975).

La respuesta de los linfocitos in vitro a la presencia de un antígeno, puede ser comparada a la que ocurre en el sistema in vivo (Moorhead, 1973).

Así, teniendo linfocitos en un medio de cultivo y agregándole una lectina como mitógeno, se cuenta con una población cuya dinámica puede ser estudiada, ya que los efectos del mitógeno son reproducibles, permitiendo además obtener una respuesta que puede ser evaluada cuantitativamente.

3. Parámetros que Indican el Crecimiento de la Población de Linfocitos

Existen muchos métodos para determinar con un alto grado de seguridad, la proliferación de las células en cultivo.

Es esencial en los estudios cuantitativos acerca del crecimiento y dinámica de la población celular, una rápida y segura cuantificación del número de células. Para este propósito se han desarrollado últimamente contadores electrónicos, pero uno de los principales inconvenientes de este método es que no discrimina entre células vivas y células que no lo están. Existen otros métodos como el de fluorescencia, que separan células de acuerdo a la cantidad de moléculas de un colorante fluorescente que pueden unir a su membrana o meter en su interior y por lo tanto; la cantidad de luz dispersada en forma de fluorescencia por la célula, puede servir para distinguir a las células muertas de las células vivas (Herzenberg, et al., 1976).

El crecimiento y la muerte celular pueden ser evaluados fácilmente, por medio de una prueba de exclusión de colorantes vitales, como son el azul tripan y la eritrosina B, ya que estos colorantes sólo penetran y tiñen a las células muertas y proporcionan entonces, la posibilidad de distinguir y llevar a cabo un conteo directo del número de células vivas y muertas con ayuda de una cámara de Neubauer (Daly, 1973., Holden et al., 1973., Phillips, 1973).

El conteo de células vivas, es una evaluación del crecimiento de la población una vez que se ha llevado a cabo la división celular, pero existen otros parámetros que pueden indicar este crecimiento antes de que la división concluya; uno de ellos es la medición de la tasa de incorporación de timidina tritiada, partiendo de la base de que todas las células que son estimuladas tienen que llegar a la fase de síntesis de ADN, para que se lleve a cabo la división (Ling y Kay, 1975., Smith-Keary, 1979., Cooper y Amiel,

1965); el otro método consiste en bloquear el progreso de la célula en un estado determinado del ciclo celular, a través del uso de inhibidores apropiados. Por medio de él puede inhibirse la síntesis de ADN por la adición de altos niveles de timidina, fluorodeoxiuridina, etc. (Shall, 1973); o bien la mitosis por la adición al medio de cultivo, de colchicina o Colcemid, que es un compuesto sintético con acción similar a la primera.

La colchicina interfiere en la formación del huso mitótico, bloqueando a la célula en el período de metafase. Se une a la tubulina, que es la proteína formadora de los microtúbulos, desplazando la base de guanina de GTP, adherido a la tubulina "activada", inhibiendo así la polimerización y por consiguiente la formación de los microtúbulos que componen el huso acromático (Lehninger, 1975).

En el presente trabajo se utilizaron tres parámetros indicadores del crecimiento de la población celular: Incorporación de timidina tritiada, obtención de figuras mitóticas, deteniendo a la célula en metafase por la adición de Colcemid al medio de cultivo y el conteo de células vivas por medio de la exclusión del colorante azul tripan; tomando como referencia los estudios realizados con anterioridad por Ongay, (1978) respecto a la incorporación de timidina tritiada y cuyos resultados se describen a continuación.

4. Modelo de Incorporación de Timidina Tritiada

Se han realizado con anterioridad, algunos estudios sobre los factores de la parte abiótica del cultivo de linfocitos, utilizando principalmente incorporación de timidina tritiada como criterio. Se ha llegado a establecer un modelo matemático que describe el comportamiento de la población en cuanto a este parámetro (Ongay, 1978). En dicho modelo la población de linfocitos mostró las siguientes características.

Durante los primeros 5 días de incubación, la incorporación aumentó en forma logarítmica con relación al control, -determinado arbitrariamente como el tercer día de incubación, por ser el período más comúnmente usado.

A partir del día 5, la incorporación disminuyó exponencialmente hasta que en los días 14 y 15, prácticamente se hace cero.

La Figura 3, es un esquema que muestra el modelo mencionado.

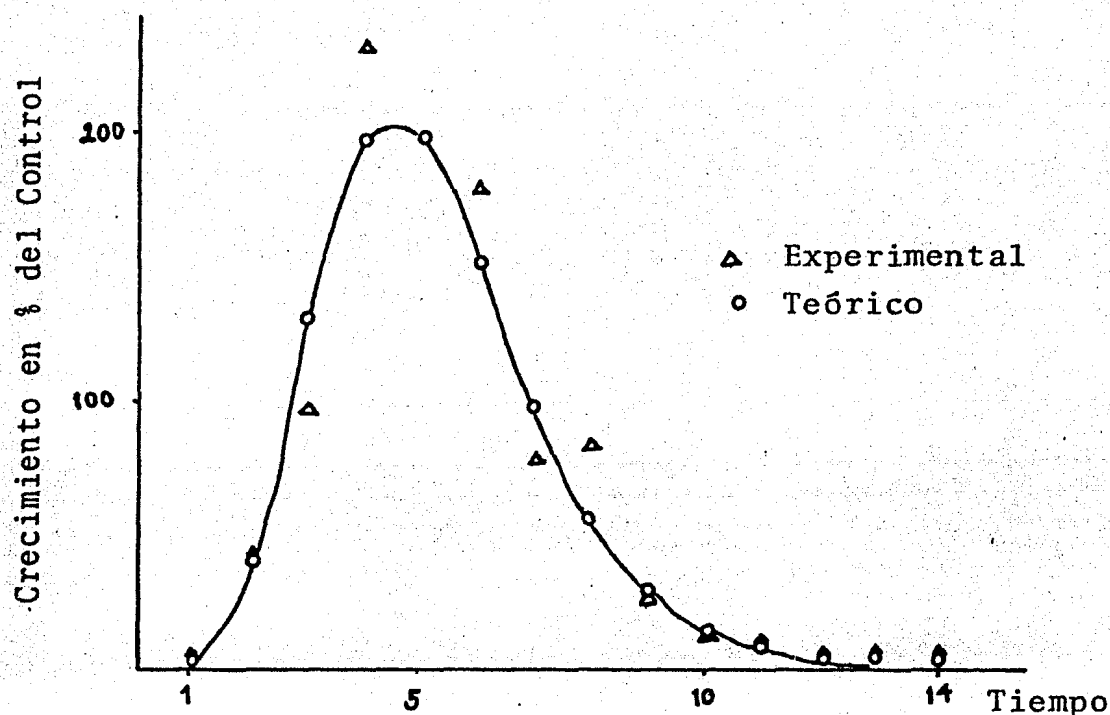


Fig. 3 Modelo de Incorporación de Timidina Tritiada por Linfocitos Humanos "in vitro" (Tomado de Ongay, 1978).

III Materiales y Métodos

- Técnica de Cultivo de Linfocitos

La técnica de cultivo de linfocitos utilizada, fué una modificación de la microtécnica propuesta por Arakaki y Sparkes en 1963, a partir de sangre completa de humano.

Las muestras de sangre se obtuvieron de individuos sanos, con jeringas estériles desechables previamente heparinizadas. Las muestras fueron colectadas en el laboratorio el mismo día de la siembra de cada cultivo.

De los 76 frascos sembrados, se procesaron diariamente durante 15 días, 3 frascos para medir incorporación de timidina tritiada, 1 para la producción de metafases y otro para la prueba de exclusión de azul tripan, incluyendo 1 para el día de la siembra o día "cero".

Este procedimiento se repitió en tres ocasiones que se identifican por los números del cultivo correspondiente 551, 564 y 570.

- Medio de Cultivo

El medio utilizado para sembrar los linfocitos fué compuesto de la siguiente manera: 80% de medio TC-199 (DIFCO - 5477-69), 20% de suero de ternera fetal (GIBCO 614), previamente inactivado a 60°C durante media hora. Por cada 5 ml de medio se agregó solución de TC penicilina-estreptomina (DIFCO 5854), correspondiente a 500 U y 500 µg respectivamente, dos gotas de glutamina (DIFCO 5789) al 0.5%, dos gotas de heparina (ABBOTT 3672) de 1,000 U por ml, además 0.4 mg/ml de bacto-fitohemaglutinina (DIFCO 0528-56) como mitógeno.

- Siembra

La siembra de linfocitos se llevó a cabo en frascos ám

pula de 10 ml.

En una atmósfera libre de gérmenes, se agregó a cada frasco 1 ml de medio completo previamente preparado y 0.3 ml de sangre completa; la sangre fué colocada con una jeringa sin aguja para evitar en lo más posible la hemólisis.

- Cosecha

Para llevar a cabo la medición de la incorporación de timidina tritiada, se le agregó a cada uno de los frascos por cosechar 1 μ Ci de timidina tritiada (NEW ENGLAND NUCLEAR, NET 027A) con actividad específica de 2 Ci por mmol, 17 horas antes de la cosecha.

El material obtenido de cada frasco, una vez concluida la incubación, se pasó a un tubo de centrifuga, se centrifugó durante 8 minutos a 800 rpm en una centrifuga clínica y después de eliminar el sobrenadante, el material se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente con 5 ml de una solución fijadora, compuesta de metanol (J.T. BAKER 9070) y ácido acético (J.T. BAKER 9507), en proporción 3:1 v/v; después se centrifugó en las mismas condiciones y se repitió el lavado una vez más. Se retiró el sobrenadante hasta donde fué posible y se agregaron agitando vigorosamente en un vórtex, 5 ml de una solución fría de ácido tricloracético - TCA (MERCK 807) al 7% y se incubó sin mover durante 1 hora a 4°C.

Una vez cumplida la hora de refrigeración, se centrifugó a 2,000 rpm durante 10 minutos y se desechó el sobrenadante. Con 5 ml de TCA, se pasó el material de cada tubo a un filtro (Millipore) de 0.65 μ m de poro, por filtración al vacío y con otros 5 ml de TCA se lavó el tubo de centrifuga nuevamente y el contenido se virtió sobre el filtro, éste se colocó después en un frasco vial de contador, al cual se le agregó 0.4 ml de una solución de dodecilsulfato de sodio

(SDS, SIGMA L-5750) al 2%. Se secó entonces a 60°C durante media hora, y después de agregar 10 ml de líquido de centelleo tipo Bray, se llevaron las muestras al contador de centelleo líquido (PACKARD automático) que registra la radiactividad en cuentas por minuto (cpm).

Para la obtención de figuras mitóticas, se agregó a un frasco por día, 0.05 ml de solución de Colcemid (CIBA 0016-41) de 2 µg por ml, 3 horas antes de la cosecha.

El material del frasco se pasó a un tubo de centrífuga y se centrifugó durante 8 minutos a 800 rpm en una centrífuga clínica, el sobrenadante se retiró y se agregaron con agitación suave en vórtex, 5 ml de agua bidestilada a 37°C - como solución hipotónica. El tubo sin mover, se incubó durante 15 minutos a 37°C y se centrifugó en las condiciones anteriores; después de eliminar el sobrenadante, el material del botón se fijó con una mezcla de metanol - ácido acético en proporción 3:1 v/v, con agitación suave en vórtex y se incubó a temperatura ambiente durante 15 minutos. El lavado con el fijador se repitió cuantas veces fué necesario hasta que se eliminó la hemoglobina del botón, después de esto el tubo se guardó a 4°C, por lo menos durante 24 horas antes de hacer las preparaciones.

Las preparaciones se llevaron a cabo por medio de la técnica de secado al aire (Humason, 1979), fueron después teñidas con una mezcla de Giemsa (SIGMA 972), Leishman (SIGMA 746), Agua Destilada, en proporción 3:1:36 v/v, durante 20 minutos y observadas al microscopio de contraste de fases para contar el número de metafases.

Para determinar la vitalidad de los linfocitos en cultivo, el material se pasó a tubos de centrífuga, se centrifugó durante 10 minutos a 1,000 rpm en una centrífuga clínica, se eliminó el sobrenadante y el botón se resuspendió en

5 ml de solución lisadora de pH 7.3, preparada con 4.15 g - de Cloruro de Amonio (MALLINCKRODT 3384) y 1.0 g de Tris-hi-droximetil amino metano TRIZMA (SIGMA 5280), aforando a 500 ml con agua destilada y ajustando el pH con Acido Clorhídri-co concentrado, para eliminar las células rojas y se incubó durante 5 minutos a 37°C; se repitió el lavado y la incuba-ción dos veces más, se volvió a centrifugar en las mismas - condiciones y el botón se resuspendió en 1 ml de solución - de NaCl (MERCK 6404) al 0.85% a 37°C. Se tomó 0.9 ml de es-ta suspensión y se le agregó 0.1 ml de azul tripan (SIGMA - 468) estéril al 0.5% en NaCl al 0.85%. Se llenaron entonces las cámaras del hemocitómetro y se contaron las células te-ñidas y sin teñir de los 10 cuadros convencionales (Absher, 1973).

Se calculó después el número de células vivas y muer-tas por ml de cultivo.

- Procesamiento de los Datos

En cuanto a la incorporación de timidina tritiada, los datos obtenidos directamente del contador de centelleo lí-quido, muestran la radiactividad relativa en cuentas por mi-nuto (cpm), estos datos se necesitan convertir en radiacti-vidad real en desintegraciones por minuto (dpm), mediante - la siguiente operación.

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

La eficiencia de lectura del contador, se busca en una gráfica patrón previamente elaborada.

Se obtuvieron de incorporación de timidina tritiada, 3 valores diariamente para cada cultivo y para el número de - células vivas, células muertas y metafases 1 valor diaria-mente para cada uno de los cultivos; tomando en cuenta los

3 cultivos en el caso del número de células vivas y muertas y metafases y los 3 valores diarios de incorporación de timidina tritiada, se calcularon los siguientes parámetros estadísticos: promedio, desviación típica, error típico y error típico como porcentaje del promedio, mediante las siguientes ecuaciones, según Heath (1977) y Parker (1976).

Promedio
$$\bar{X} = \frac{\sum_{x=1}^n x}{n}$$

Desviación Típica
$$S\bar{X} = \sqrt{\frac{\sum_{x=1}^n (X - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Error Típico
$$E\bar{X} = \frac{S\bar{X}}{\sqrt{n}}$$

Error Típico como Porcentaje del Promedio

$$\%E\bar{X} = \frac{E\bar{X} \times 100}{\bar{X}}$$

donde:

n = número de datos

x = valores individuales

$\sum_{x=1}^n$ = la suma desde el primero de los valores, hasta el enésimo valor.

Todos los valores promedio de incorporación de timidina tritiada, obtenidos para los tres cultivos, fueron tomados como datos individuales y por medio de las fórmulas an-

teriores, se calcularon los mismos parámetros que se presentan con la siguiente abreviatura para ser distinguidos de los cálculos anteriores; (μ) es la media de la población, (S) la desviación típica, (Es) el error típico y (%Es) el error típico como porcentaje de la media.

Para observar la variabilidad del conteo de células, se tomaron como datos aislados cada uno de los valores obtenidos en los diez cuadros que se cuentan convencionalmente del hemocitómetro y se calculó el error típico.

El coeficiente de correlación se calculó mediante la siguiente fórmula (Parker, 1976., Sokal y Rohlf, 1969):

Coeficiente de Correlación

$$r = \frac{\sum_{xy=1} xy - \frac{(\sum_{x=1} x)(\sum_{y=1} y)}{n}}{\sqrt{\left(\sum_{x=1} x^2 - \frac{(\sum_{x=1} x)^2}{n}\right) \left(\sum_{y=1} y^2 - \frac{(\sum_{y=1} y)^2}{n}\right)}}$$

donde: tanto x como y, corresponden a los valores de ambas variables.

IV Resultados

- Células Vivas

En el cultivo 551 (Tabla 1 y Figura 4), se sembraron un total de 1,369,000 células por frasco, de las cuales el 77% fueron células vivas, se encontró después una disminución en el número de células hasta el día 3 de incubación, donde se encontró la cantidad de 568,000 células, de las cuales el 58% fueron células vivas; la población aumentó después encontrándose el mayor número de individuos vivos en el día 5 de incubación con 961,000 células, de las que el 56% fueron células vivas.

La población de células vivas se mantuvo más o menos constante hasta el día 11, oscilando entre un total de 961 mil células en el día 5 y 716 mil células en el día 6, de las que el 62% en el día 8 y el 52% en el día 11 fueron células vivas.

Del día 11 en adelante, la población de células vivas disminuyó, mientras que el de células muertas aumentó grandemente, encontrándose en el día 15 de incubación 1,188,000 células de las cuales solamente el 7% estuvieron vivas.

Es necesario hacer notar que la proporción de células muertas, permaneció más o menos constante desde el primer día de incubación, hasta el día 10, a partir del cual aumentó la proporción conforme el número de células vivas disminuyó.

En el cultivo 564 (Tabla 1 y Figura 5), el comportamiento de la población fue un poco diferente del cultivo anterior. Se sembraron 337,000 células de las cuales el 68% fueron células vivas; la población aumentó casi al doble hasta el día 5 con 683,000 células de donde las vivas correspondieron al 74% de la población, después se mantuvo más o menos constante hasta el día 9, oscilando entre el va

Tabla No. 1

Número de Células Vivas y Muertas de los Cultivos 551, 564 y 570 con sus
Respectivos Parámetros Estadísticos Calculados

Días de In- cubación	Número de Células X 10 ⁻³													
	C. 551		C. 564		C. 570		\bar{X}		S \bar{x}		E \bar{x}		%E \bar{x}	
	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M
0	1,057	310	229	108	140	24	475.3	150.3	505.7	151.9	291.9	87.7	61.4	58.3
1	611	233	333	150	314	46	419.3	143.0	166.2	93.7	96.0	54.1	22.9	37.8
2	334	260	341	161	305	79	326.6	166.6	19.1	90.6	11.0	52.3	3.4	31.4
3	330	238	378	170	354	83	354.0	163.6	24.0	77.7	13.8	44.8	3.9	27.4
4	419	300	368	156	390	73	392.3	173.3	25.6	114.8	14.8	66.3	3.8	37.6
5	538	423	504	179	416	88	486.0	230.0	62.9	173.2	36.3	100.0	7.5	43.5
6	420	296	441	157	443	100	434.6	184.3	12.7	100.8	7.3	58.2	1.7	31.6
7	448	314	370	213	325	93	381.0	206.6	62.2	110.6	35.9	63.9	9.4	30.9
8	560	336	487	147	295	95	447.3	192.6	136.9	126.8	79.0	73.2	17.6	38.0
9	454	273	456	269	360	81	423.3	207.6	54.8	109.7	31.7	63.3	7.5	30.5
10	449	335	371	246	273	197	364.3	276.0	88.2	71.1	50.9	41.0	13.9	14.9
11	452	417	330	327	157	427	313.0	391.0	148.2	55.5	85.6	32.1	27.3	8.2
12	309	733	235	578	118	472	220.6	594.3	96.3	131.3	55.6	75.8	25.2	12.7
13	153	692	114	596	108	683	125.0	657.6	24.4	51.8	14.1	29.9	11.3	4.5
14	150	967	43	811	60	671	84.3	816.3	57.5	148.0	33.2	85.5	39.5	10.5
15	78	1,110	27	950	73	819	59.3	959.6	28.1	145.7	16.2	84.1	27.3	8.0

V = Células Vivas

M = Células Muertas

Tabla No. 1

Número de Células Vivas y Muertas de los Cultivos 551, 564 y 570 con sus Respectivos Parámetros Estadísticos Calculados

Días de In cubación	Número de Células X 10 ⁻³													
	C. 551		C. 564		C. 570		\bar{X}		S \bar{X}		E \bar{X}		%E \bar{X}	
	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M	V	M
0	1,057	310	229	108	140	24	475.3	150.3	505.7	151.9	291.9	87.7	61.4	58.3
1	611	233	333	150	314	46	419.3	143.0	166.2	93.7	96.0	54.1	22.9	37.8
2	334	260	341	161	305	79	326.6	166.6	19.1	90.6	11.0	52.3	3.4	31.4
3	330	238	378	170	354	83	354.0	163.6	24.0	77.7	13.8	44.8	3.9	27.4
4	419	300	368	156	390	73	392.3	173.3	25.6	114.8	14.8	66.3	3.8	37.6
5	538	423	504	179	416	88	486.0	230.0	62.9	173.2	36.3	100.0	7.5	43.5
6	420	296	441	157	443	100	434.6	184.3	12.7	100.8	7.3	58.2	1.7	31.6
7	448	314	370	213	325	93	381.0	206.6	62.2	110.6	35.9	63.9	9.4	30.9
8	560	336	487	147	295	95	447.3	192.6	136.9	126.8	79.0	73.2	17.6	38.0
9	454	273	456	269	360	81	423.3	207.6	54.8	109.7	31.7	63.3	7.5	30.5
10	449	335	371	246	273	197	364.3	276.0	88.2	71.1	50.9	41.0	13.9	14.9
11	452	417	330	327	157	427	313.0	391.0	148.2	55.5	85.6	32.1	27.3	8.2
12	309	733	235	578	118	472	220.6	594.3	96.3	131.3	55.6	75.8	25.2	12.7
13	153	692	114	596	108	683	125.0	657.6	24.4	51.8	14.1	29.9	11.3	4.5
14	150	967	43	811	60	671	84.3	816.3	57.5	148.0	33.2	85.5	39.5	10.5
15	78	1,110	27	950	73	819	59.3	959.6	28.1	145.7	16.2	84.1	27.3	8.0

V = Células Vivas

M = Células Muertas

FIG. 4

Número de Individuos Vivos y Muertos Registrados en el Cultivo 551

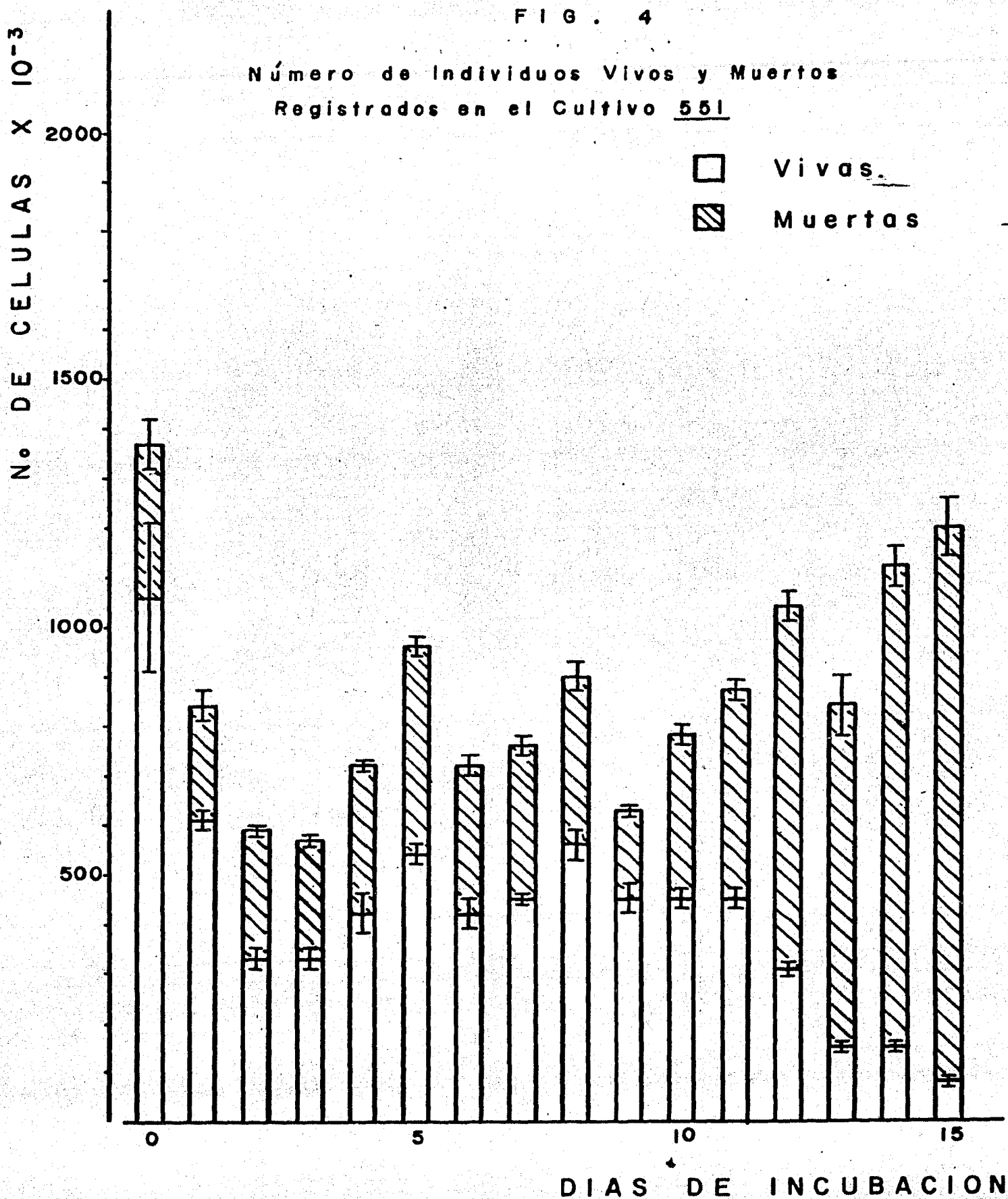
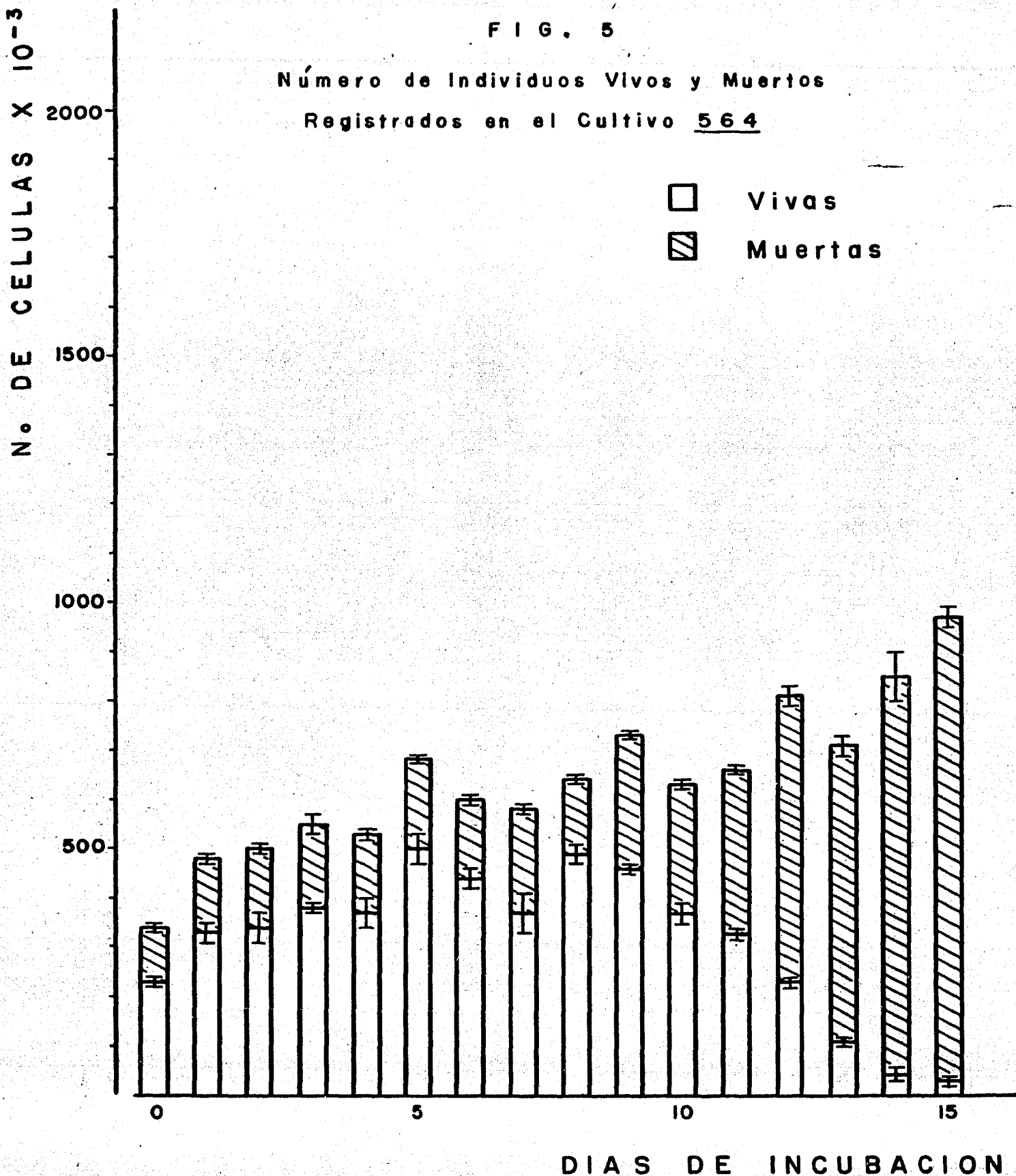


FIG. 5

Número de Individuos Vivos y Muertos
Registrados en el Cultivo 564



lor máximo registrado en el día 5 y el mínimo en el día 7 - con 583,000 células con 63% de vivas; la población de células vivas disminuyó a partir del día 9, paulatinamente hasta el día 15 de incubación donde a pesar de que se encontraron 970,000 células, sólo el 3% fueron células vivas.

En cuanto al número de células muertas, el comportamiento fue igual que en el cultivo 551, es decir, se mantuvo constante hasta el día 11 cuando se disparó su aumento.

En el cultivo 570 (Tabla 1 y Figura 6), el mayor número de células con el máximo porcentaje de vivas, se obtuvo en el día 6 con 543,000 células y 82% de vivas. Entre los días 1 y 6, el porcentaje de células vivas se mantuvo prácticamente constante, oscilando entre el 87% en el día 1 y el 80% en el día 2; se sembraron 164,000 células con un 85% de vivas.

Entre el día 6 y 10, el número total de células se mantuvo muy constante, después de haber sufrido una disminución de 125,000 células, que correspondieron a un 30% con respecto al día 5. En el día 9, ocurrió lo mismo que en los cultivos anteriores, esto es, la población de células vivas disminuyó y el número de células muertas aumentó grandemente, llegando en el día 15 a contar con 892,000 células de las cuales solamente el 8% fueron células vivas.

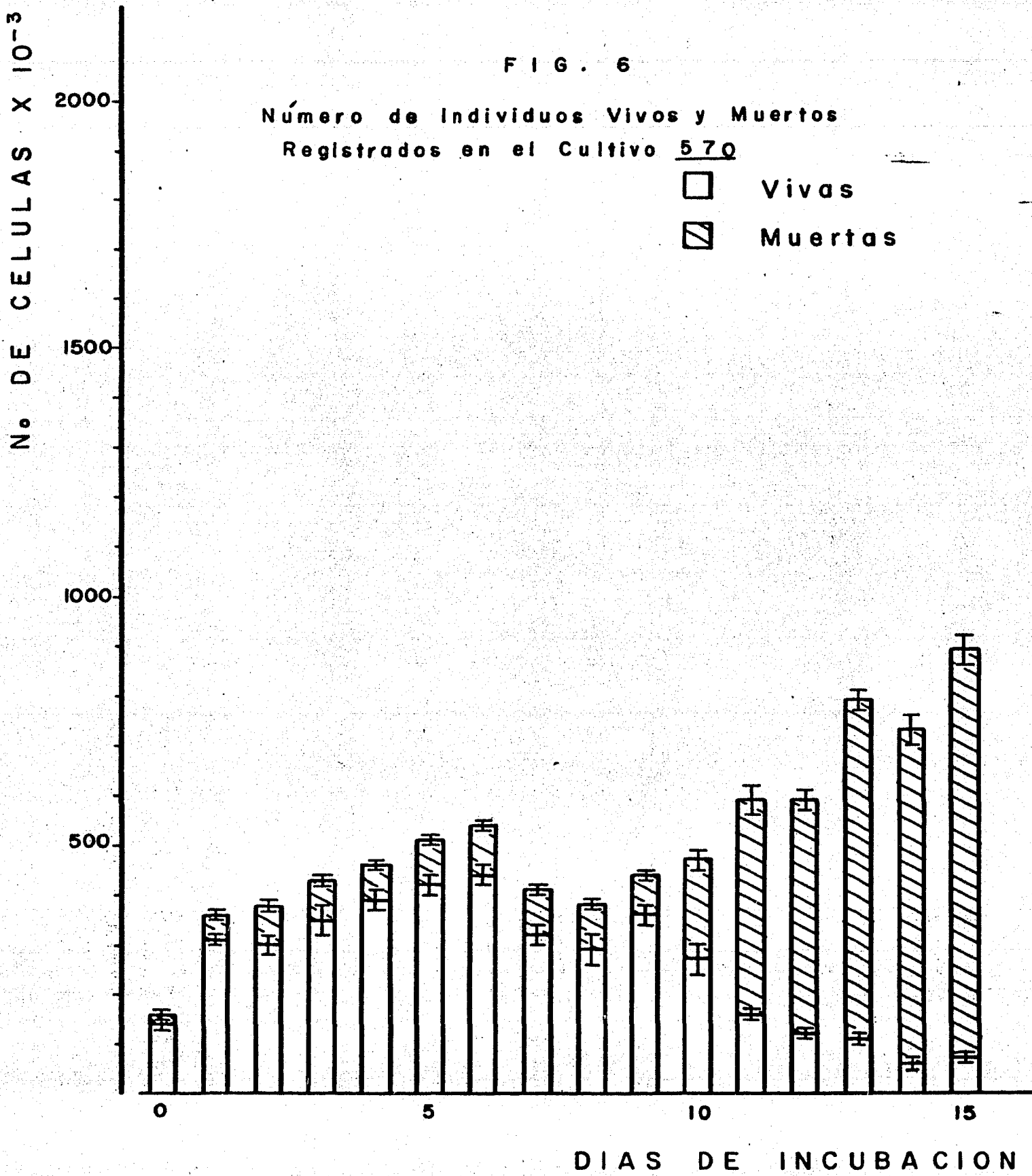
Los datos obtenidos de los tres cultivos en cuanto a número de células vivas y muertas, fueron promediados.

En dichos valores mostrados en la Tabla 1 y la Figura 7, se observa una pequeña disminución del número de células vivas en los primeros dos días de incubación, pero a partir del día 3, la población aumentó para encontrar su máximo en el día 5 de incubación; después de esto, la población mostró una pequeña disminución pero se puede decir que se mantuvo constante, formando una meseta entre los días 5 y 9 aproximadamente; de este momento en adelante la población -

FIG. 6

Número de Individuos Vivos y Muertos Registrados en el Cultivo 570

□ Vivas
▨ Muertas



Nº DE CELULAS X 10⁻³

FIG. 7

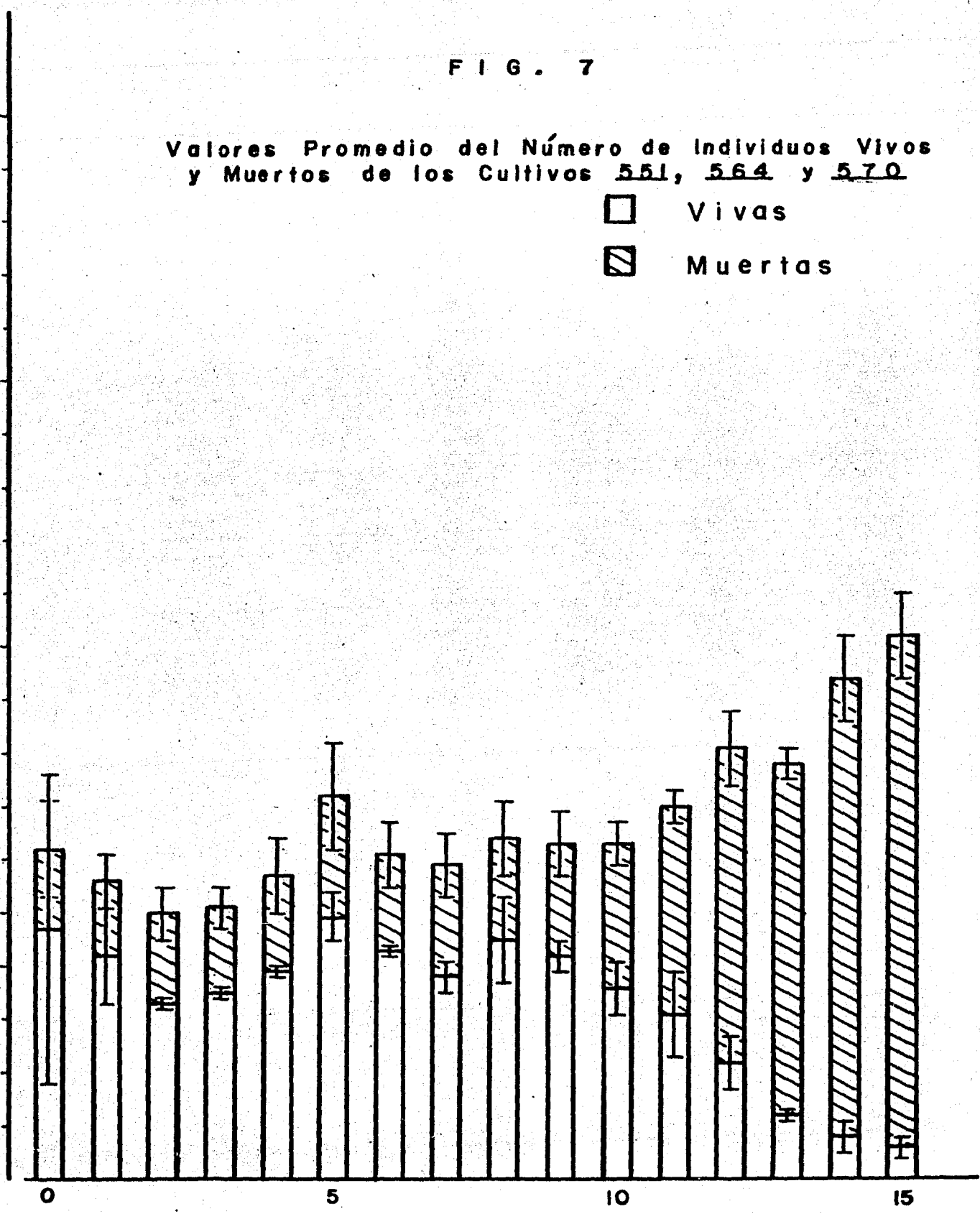
Valores Promedio del Número de Individuos Vivos y Muertos de los Cultivos 551, 564 y 570

□ Vivas
▨ Muertas

2000
1500
1000
500

0 5 10 15

DIAS DE INCUBACION



Day	Culture	Living (x 10 ³)	Dead (x 10 ³)	Total (x 10 ³)
0	551	~450	~150	~600
	564	~400	~150	~550
	570	~350	~150	~500
5	551	~450	~200	~650
	564	~400	~200	~600
	570	~400	~200	~600
10	551	~350	~300	~650
	564	~300	~400	~700
	570	~250	~500	~750
15	551	~150	~850	~1000
	564	~100	~700	~800
	570	~100	~900	~1000

disminuyó paulatinamente hasta el día 15 que correspondió a un mínimo porcentaje del total de células registrado.

Se puede observar también que el número de células muertas se mantuvo muy constante en los 9 primeros días de incubación y a partir de ese momento se registró un gran incremento hasta el día 15, donde la mayoría de la población estuvo compuesta de células muertas.

Se elaboró un índice de células vivas, mediante la conversión siguiente:

$$\% \text{ Células Vivas} = \frac{\text{No. Células Vivas} \times 100}{\text{No. Total de Células}}$$

Los valores encontrados se presentan en la Tabla 2 y la Figura 8. Se observa en ellas que el porcentaje de células vivas se mantuvo muy constante hasta el día 9 de incubación, oscilando en la curva promedio de un 64% en el día 7, hasta un 77% en el día 1; después de esto, el porcentaje disminuyó paulatinamente hasta el día 15, donde el promedio indicó un 6% de células vivas; se registró también una pequeña disminución en los primeros dos días de incubación.

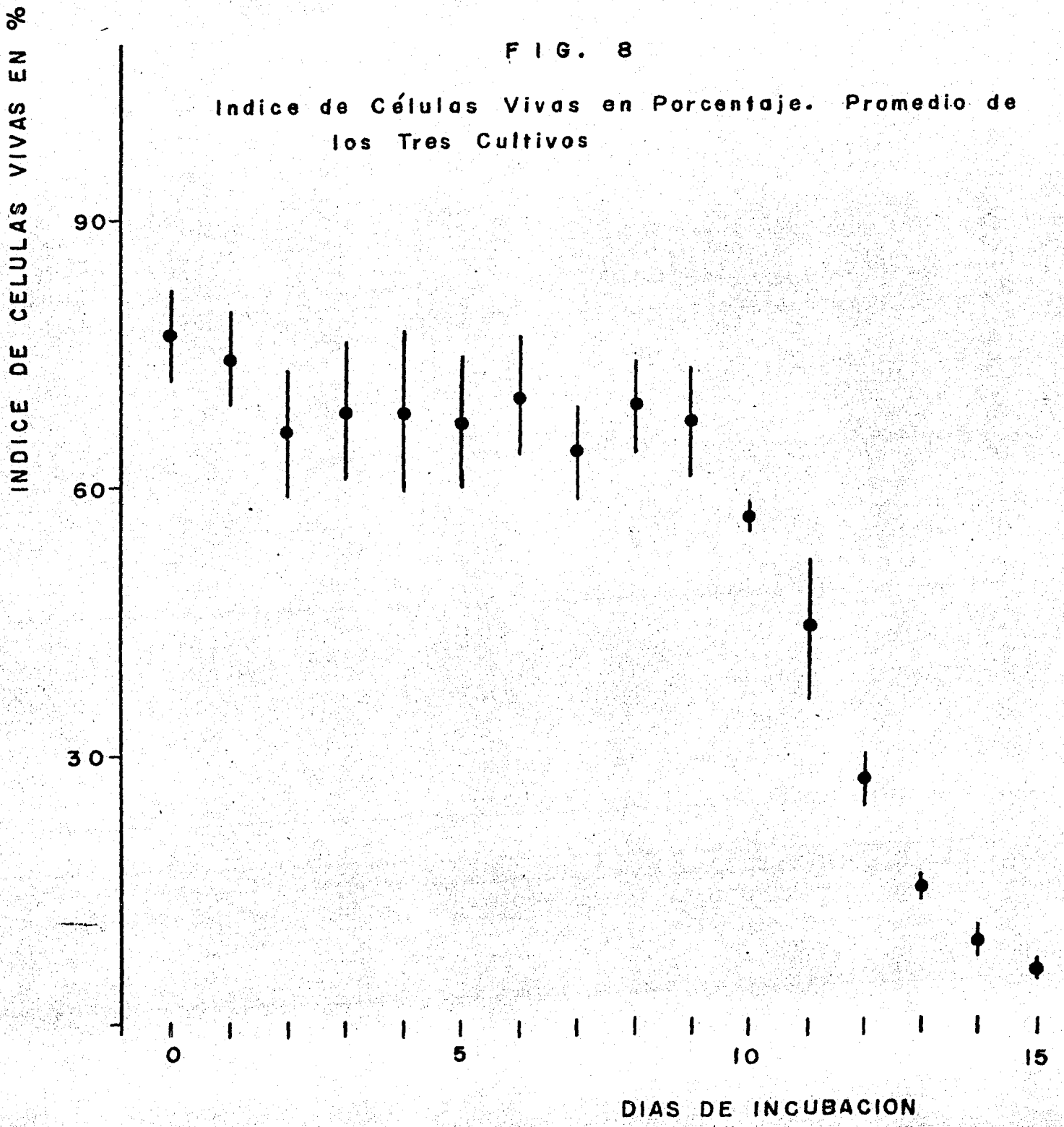
Es importante hacer notar, que a pesar de que en el día 5 se presentó el máximo número de células vivas, el porcentaje de ellas con relación al total de células, fué muy parecido a los demás valores, incluso hasta el día 9.

Tabla No. 2

Indice en Porcentaje de Células Vivas de los Cultivos
551, 564 y 570; así como sus Parámetros Estadísticos.

Días de in cubación	C. 551	C. 564	C. 570	\bar{X}	S \bar{x}	E \bar{x}	%E \bar{x}
0	77.30	67.95	85.37	76.87	8.72	5.03	6.55
1	72.39	68.94	87.22	76.18	9.71	5.61	7.36
2	56.23	67.93	79.43	67.86	11.60	6.69	9.87
3	58.10	68.98	81.01	69.30	11.46	6.62	9.54
4	58.27	86.79	84.23	76.43	15.78	9.11	11.92
5	55.98	73.79	82.54	70.77	13.53	7.81	11.04
6	58.66	73.75	81.58	71.33	11.65	6.73	9.43
7	58.03	63.46	77.75	66.41	10.19	5.88	8.86
8	62.50	76.81	75.64	71.65	7.95	4.59	6.40
9	61.60	62.89	81.63	68.71	11.21	6.47	9.42
10	57.27	60.13	58.08	58.49	1.47	0.85	1.45
11	52.01	50.23	26.88	43.04	14.02	8.09	18.81
12	29.65	28.90	20.00	26.18	5.37	3.10	11.84
13	18.11	16.06	13.65	15.94	2.23	1.29	8.08
14	13.43	5.03	8.21	8.89	4.24	2.45	27.54
15	6.56	2.78	8.18	5.84	2.77	1.60	27.39

FIG. 8
Indice de Células Vivas en Porcentaje. Promedio de los Tres Cultivos



- Incorporación de Timidina Tritiada

Del cultivo 551, en cuanto a incorporación de timidina tritiada, se puede observar en la Tabla 3 y la Figura 9, que el comportamiento de la población correspondió al modelo elaborado por Ongay, (1978), encontrándose el máximo de incorporación en el día 5 de incubación, con un valor de 100,222.15 dpm como promedio.

En el cultivo 564, cuyos valores se presentan en la Tabla 4 y la Figura 10, se observa que el comportamiento de la población fué similar al modelo original, sólo que en este cultivo el valor máximo se registró en el día 2; podría pensarse entonces que este cambio obedeció a una fluctuación en el número de células o incluso en el porcentaje de células vivas alrededor del día 2, no obstante, estos valores no fueron muy diferentes de aquellos encontrados en los días 1 y 3, incluso el porcentaje de células vivas varió en una unidad respecto a ellos (Tabla 1 y Figura 5).

El cultivo 570, mostró también el comportamiento del modelo original con su máximo de incorporación en el día 5, lo que podría explicar el hecho de que en el día 6, se haya registrado el mayor número de células vivas, esto es, el 82% de un total de 543,000 células (Tablas 2 y 5 y Figuras 6 y 11).

Todos los valores promedio de incorporación de timidina tritiada obtenidos para los tres cultivos, fueron a su vez promediados y calculados los parámetros estadísticos descritos con anterioridad, obteniéndose así la curva promedio que se muestra en la Tabla 6 y la Figura 12 en donde se observa que el comportamiento promedio, no dista mucho de aquel presentado por el modelo original, ya que a pesar de que en el cultivo 564, se registró el valor máximo de incorporación en el día 2 de incubación, no llegó a afectar la curva promedio.

Tabla No. 3

Valores de Incorporación de Timidina Tritiada del
Cultivo 551 con sus Respective Parámetros Estadísticos Calculados
por Día de Incubación

Días de in cubación	\bar{X}	d p m $S\bar{X}$	$E\bar{X}$	$\%E\bar{X}$
1	479.17	130.27	75.21	15.69
2	19,671.61	6,275.30	6,323.05	18.42
3	27,950.38	20,742.67	11,975.79	42.85
4	39,665.55	8,538.94	4,929.96	12.43
5	100,222.15	20,075.58	11,590.64	11.56
6	44,840.99	2,752.01	1,588.88	3.54
7	27,262.59	10,337.05	5,968.10	21.89
8	14,597.16	859.38	496.16	3.39
9	5,557.13	1,835.57	1,059.76	19.07
10	3,695.06	818.10	472.33	12.78
11	3,024.97	492.08	284.10	9.39
12	1,401.53	461.44	266.41	19.01
13	1,517.15	446.93	258.04	17.01
14	1,131.40	904.06	521.96	46.13
15	1,157.83	621.79	358.99	31.00

FIG. 9

Comportamiento en Cuanto a Incorporación
de ^3H -Timidina del Cultivo 551

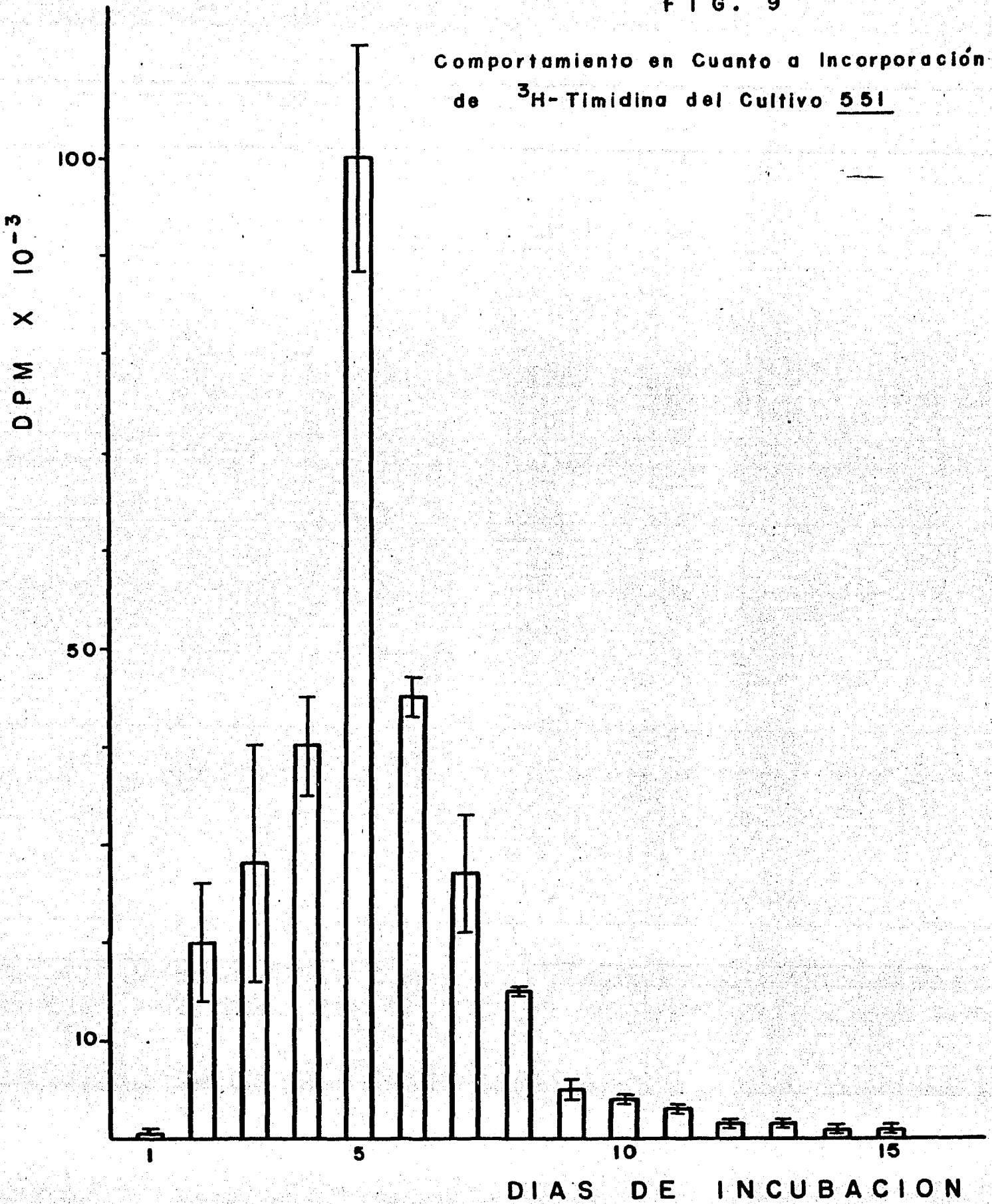


Tabla No. 4

Valores de Incorporación de Timidina Tritiada del
Cultivo 564 con sus Respectivos Parámetros Estadísticos Calculados
en Cada Día de Incubación

Días de in cubación	\bar{X}	$S\bar{X}$	$E\bar{X}$	$\%E\bar{X}$
1	735.11	205.93	118.89	16.17
2	75,689.96	8,373.99	4,834.73	6.38
3	39,280.05	19,566.59	12,2-6.78	28.76
4	61,622.55	4,500.08	2,598.12	4.22
5	24,346.22	19,100.70	11,027.79	45.29
6	33,576.65	12,376.67	7,145.67	21.28
7	28,715.54	9,156.48	5,286.50	18.41
8	14,040.52	2,982.00	1,723.97	12.28
9	17,898.74	4,976.85	2,873.39	16.05
10	10,877.10	1,-83.81	972.15	8.94
11	8,973.32	4,066.36	2,347.71	26.16
12	5,157.84	2,720.75	1,570.82	30.45
13	2,748.48	692.99	400.10	14.56
14	2,435.89	1,383.96	799.03	32.80
15	2,738.14	900.81	520.08	18.99

FIG. 10

Comportamiento en Cuanto a Incorporación de ^3H -Timidina
del Cultivo 564

DPM X 10^{-3}

100

50

10

1

5

10

15

DIAS DE INCUBACION

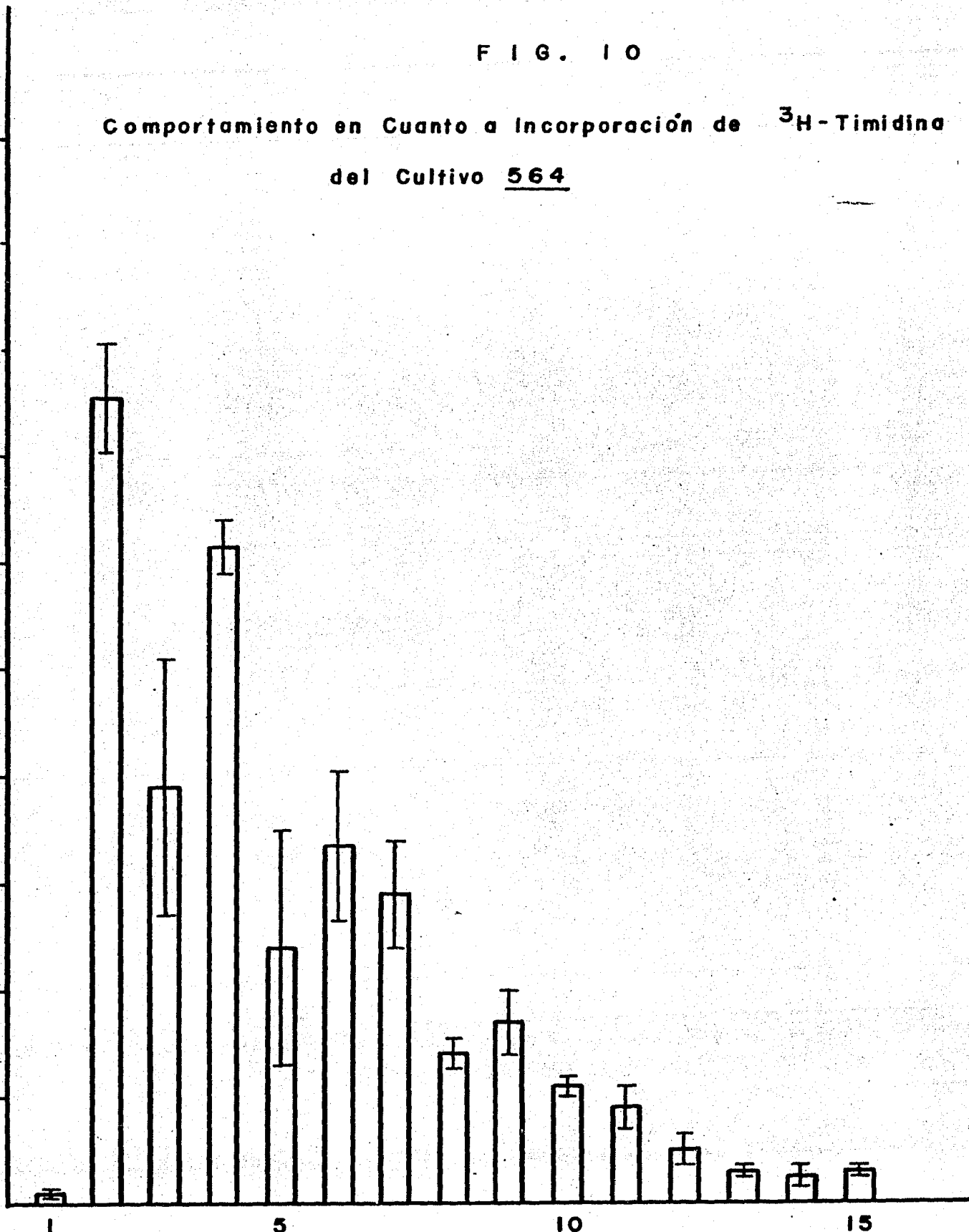


Tabla No. 5

Valores de Incorporación de Timidina Trittiada del
Cultivo 570, con sus Respective Parámetros Estadísticos Calculados
Para Cada Día de Incubación

Días de in cubación	\bar{X}	$S\bar{x}$	d p m $E\bar{x}$	$\%E\bar{x}$
1	471.04	68.67	39.63	8.41
2	20,517.54	4,278.82	2,470.38	12.04
3	54,082.44	6,677.79	3,855.42	7.12
4	52,385.57	21,176.60	12,226.35	23.33
5	70,064.92	19,832.85	11,450.50	16.34
6	44,886.11	12,285.47	7,093.02	15.80
7	55,240.83	20,703.31	11,953.06	21.63
8	37,730.05	15,674.18	9,049.49	23.98
9	27,571.34	15,042.12	8,684.57	31.49
10	22,270.59	9,661.45	5,578.04	25.04
11	18,200.24	3,310.04	1,911.05	10.50
12	7,038.20	1,551.94	896.01	12.73
13	6,016.17	2,759.98	1,593.47	26.48
14	4,698.13	652.97	376.99	8.02
15	4,167.21	638.03	368.37	8.83

FIG. II

Comportamiento en Cuanto a Incorporación de ^3H -Timidina
del Cultivo 570

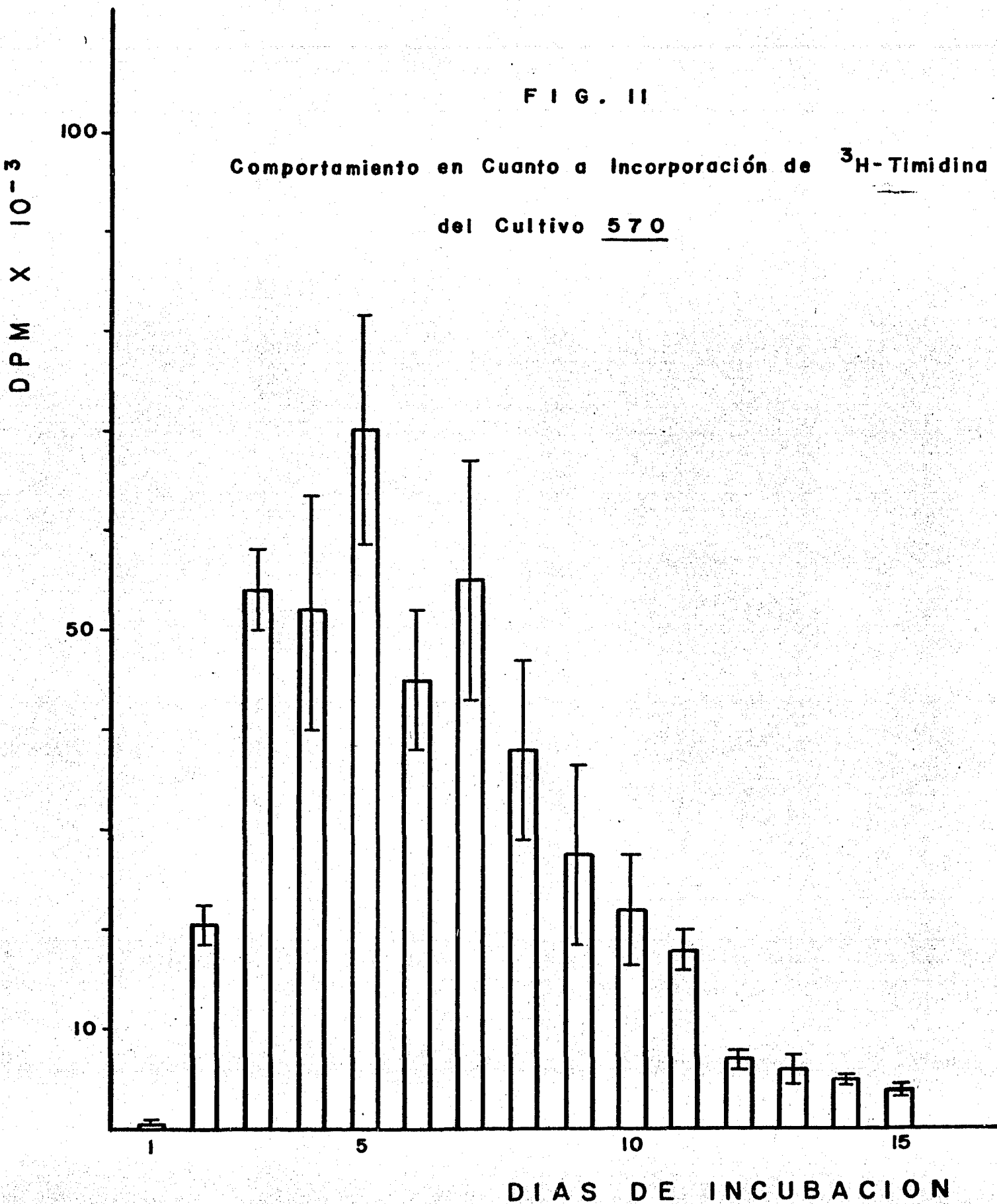


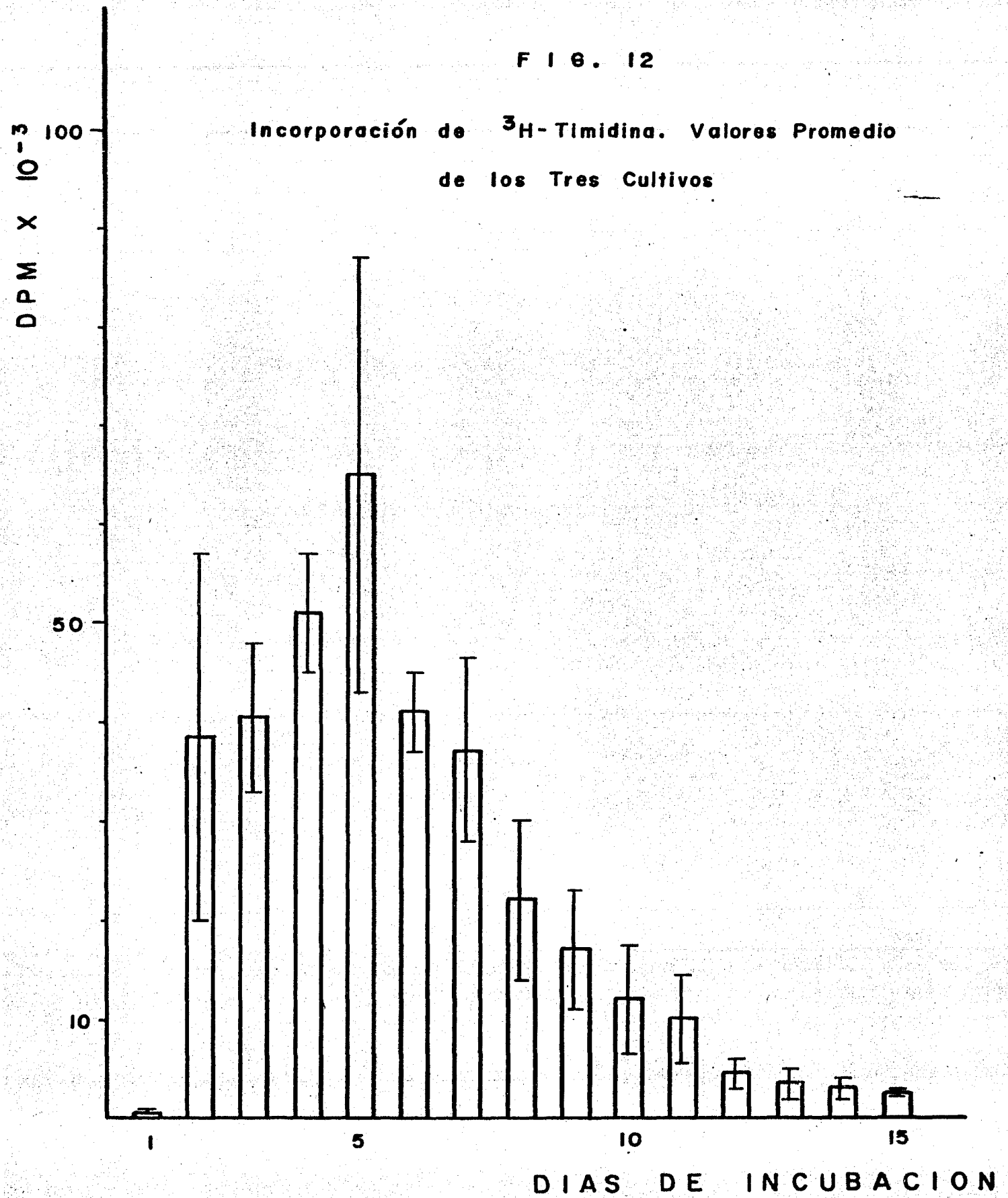
Tabla No. 6

Valores Promedio de Incorporación de Timidina Tritiada de los Cultivos 551, 564 y 570 con sus Respectivos Parámetros Estadísticos Calculados Para Cada Día de Incubación

Días de in cubación	μ	\bar{S}	$E\bar{S}$	$\%E\bar{S}$
1	561.8	150.2	86.7	15.43
2	38,626.4	32,100.8	18,533.4	47.98
3	40,437.4	13,104.4	7,565.8	18.71
4	51,224.6	11,024.4	6,364.9	12.42
5	64,867.8	38,202.9	22,056.5	33.99
6	41,101.3	6,516.5	3,762.3	9.15
7	37,073.0	15,750.5	9,093.6	24.52
8	22,122.6	13,519.3	7,805.4	35.28
9	17,009.1	11,034.0	6,370.5	37.45
10	12,280.9	9,366.9	5,408.0	44.03
11	10,066.2	7,646.4	4,414.7	43.85
12	4,532.5	2,869.8	1,656.9	36.55
13	3,427.3	2,325.0	1,342.4	39.16
14	2,755.2	1,804.6	1,041.9	37.81
15	2,687.7	1,505.3	869.1	32.33

F I G . 12

Incorporación de ^3H -Timidina. Valores Promedio de los Tres Cultivos



Para el caso de incorporación de timidina tritiada, también se elaboró un índice mediante la operación siguiente:

$$\text{Índice de Incorporación} = \frac{\text{Total de Incorporación en dpm}}{\text{Número de Células Vivas}}$$

Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 7 y la Figura 13. Se puede observar en ellas, un aumento de la incorporación de timidina tritiada por célula hacia el día 5 de incubación y después una disminución de ella hacia el día 12, que en el promedio llegó a ser de un 15% del valor encontrado para el día 5; se observa también un aumento de incorporación de timidina tritiada por célula hacia el día 15, con un 34% del encontrado en el día 5, para los valores del promedio.

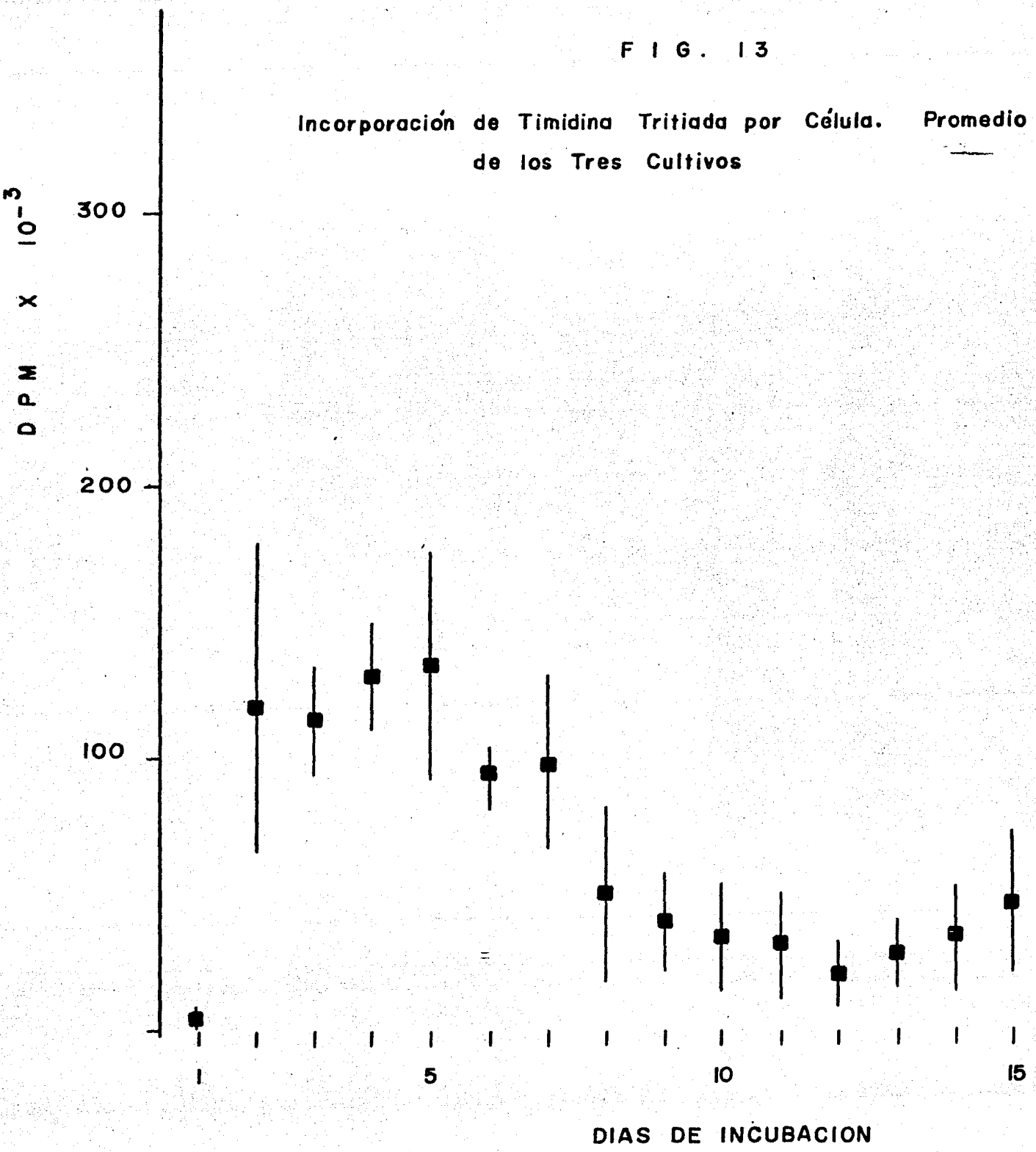
Tabla No. 7

Indice de Incorporación de Timidina Tritiada de los Cul
tivos 551, 564 y 570, así como el Promedio de Ellos

Días de in cubación	Indice de Incorporación de Timidina Tritiada X 10 ⁻³						
	C. 551	C. 564	C. 570	\bar{X}	S \bar{x}	E \bar{x}	%E \bar{x}
1	0.8	2.2	1.5	1.5	0.7	0.4	33.7
2	58.9	222.0	67.3	116.1	91.8	53.0	45.7
3	84.7	103.9	152.8	113.8	35.1	20.3	17.8
4	94.7	167.4	134.3	132.1	36.4	21.0	15.9
5	186.3	48.3	168.4	134.3	75.0	43.3	32.2
6	106.8	76.1	101.3	94.7	16.4	9.4	10.0
7	60.8	77.6	170.0	102.8	58.8	33.9	33.0
8	26.1	28.8	127.9	60.9	58.0	33.5	54.9
9	12.2	39.2	76.6	42.7	32.3	18.7	43.8
10	8.2	29.3	81.6	39.7	37.8	21.8	54.9
11	6.7	27.2	115.9	49.9	58.0	33.5	67.1
12	4.5	21.9	59.6	28.6	28.2	16.3	56.7
13	9.9	24.1	55.7	29.9	23.4	13.5	45.3
14	7.5	56.6	78.3	47.5	36.3	20.9	44.1
15	14.8	101.4	57.1	57.7	43.3	25.0	43.3

FIG. 13

Incorporación de Timidina Tritiada por Célula. Promedio de los Tres Cultivos



Número de Metafases

En el cultivo 551 (Tabla 8 y Figura 14), el máximo número de metafases se registró en el día 4 de incubación, aumentando grandemente a partir del día 3, en donde se encontraron sólo 439 y alcanzando en el día cuatro 1,726 metafases; el número de metafases bajó en el día 5, contando con 475, volvió a subir hasta casi alcanzar el número registrado en el día 4 y a partir del día 6, disminuyó paulatina mente hasta el día 13 donde se registraron 20 metafases solamente.

En el cultivo 564 (Tabla 8 y Figura 15), el mayor número de metafases registrado se localizó en el día 2, aunque el valor registrado en el día 5, no difiere grandemente de él. En general, el número de metafases en este cultivo fue muy pequeño respecto al cultivo 551, ya que el registro máximo fué de 388 metafases, mientras que en el cultivo anterior llegó a ser 3.5 veces mayor que este valor. Del día 7 en adelante, se observó una franca disminución, hasta que en el día 15, se registraron solamente 2 metafases.

En el cultivo 570 (Tabla 8 y Figura 16), se observó el máximo número de metafases en el día 5 de incubación, con un valor de 626; puede notarse que el orden de magnitud del número de metafases de este cultivo es similar al valor máximo registrado para el cultivo 564, del cual es 0.5 veces mayor.

El comportamiento de este cultivo en cuanto a número de metafases fué similar al encontrado para incorporación de timidina tritiada, esto es, aumentó desde 4 metafases registradas en el día 1 de incubación, hasta un valor máximo en el día 5, y disminuyó después poco a poco, registrándose en el día 15, 7 metafases solamente.

Los valores para los tres cultivos, fueron promediados y obtenidos los parámetros estadísticos descritos en mate-

Tabla No. 8

Valores del Número de Metafases y Valores Promedio en Cada
Día de Incubación de los Cultivos 551, 564 y 570

Días de in cubación	Número de Metafases						
	551	564	570	\bar{X}	$S\bar{X}$	$E\bar{X}$	$\%E\bar{X}$
1	1	1	4	2.0	1.7	1.0	50.0
2	438	181	112	243.6	171.7	99.2	40.7
3	439	338	111	296.0	167.9	97.0	32.7
4	1,726	201	395	774.0	830.1	479.3	61.9
5	475	308	626	469.6	159.1	91.8	19.6
6	1,708	133	426	755.6	837.6	483.6	64.0
7	259	192	266	239.0	40.8	23.6	9.8
8	169	96	304	189.6	105.5	60.9	32.1
9	111	103	82	98.6	14.9	8.6	8.7
10	76	80	96	84.0	10.6	6.1	7.3
11	73	63	76	70.6	6.8	3.9	5.6
12	82	38	80	66.6	24.8	14.3	21.5
13	20	30	52	34.0	16.4	9.5	27.8
14	--	5	12	5.6	6.0	3.5	62.1
15	--	2	7	3.0	3.6	2.1	69.4

NOTA: No existen valores en los días 14 y 15 de incubación para el cultivo 551, por falta de material durante la siembra.

FIG. 14

Número de Metafases Registradas en el Cultivo 551

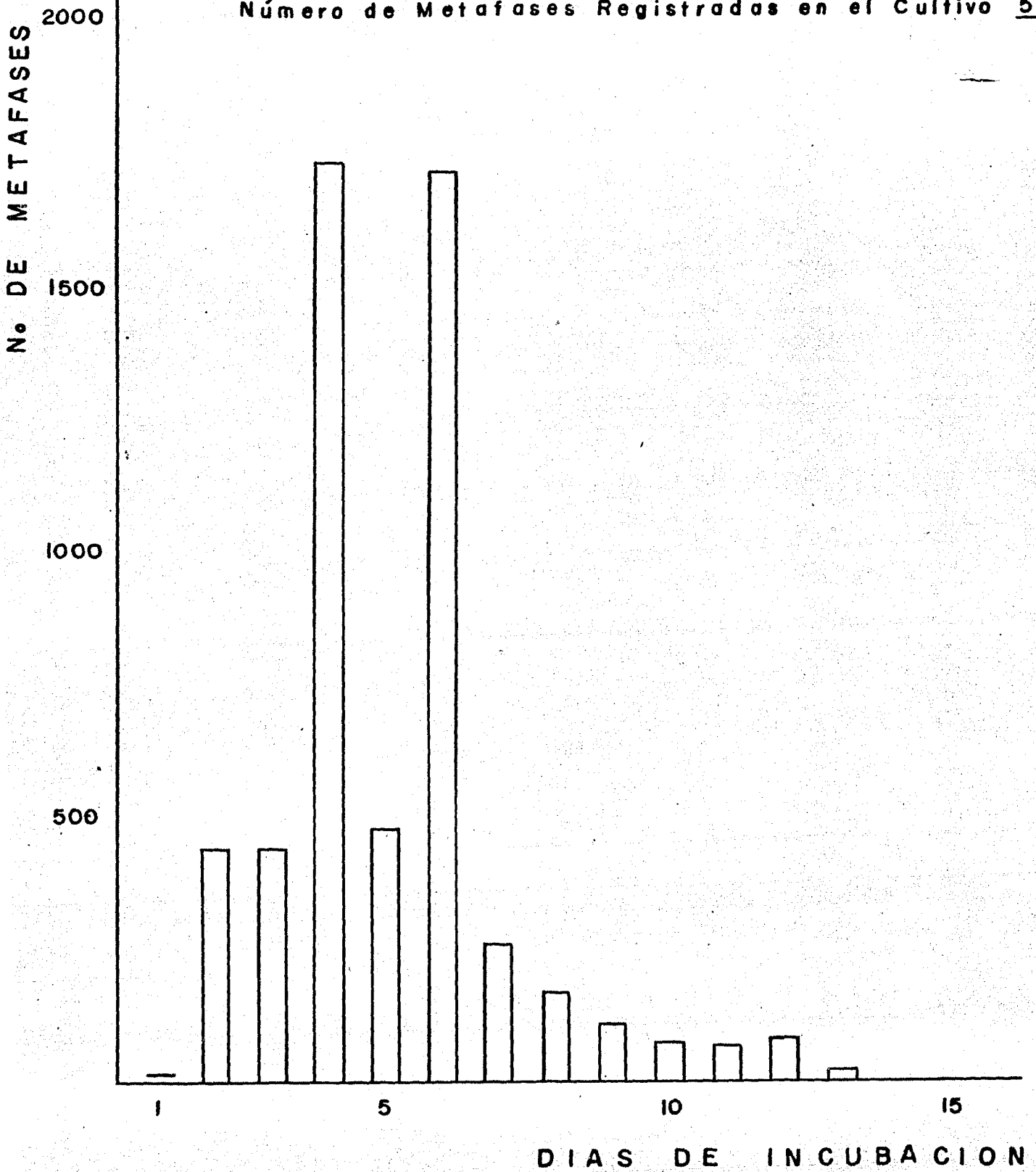


FIG. 15

Número de Metafases Registradas en el Cultivo 564

Nº DE METAFASES

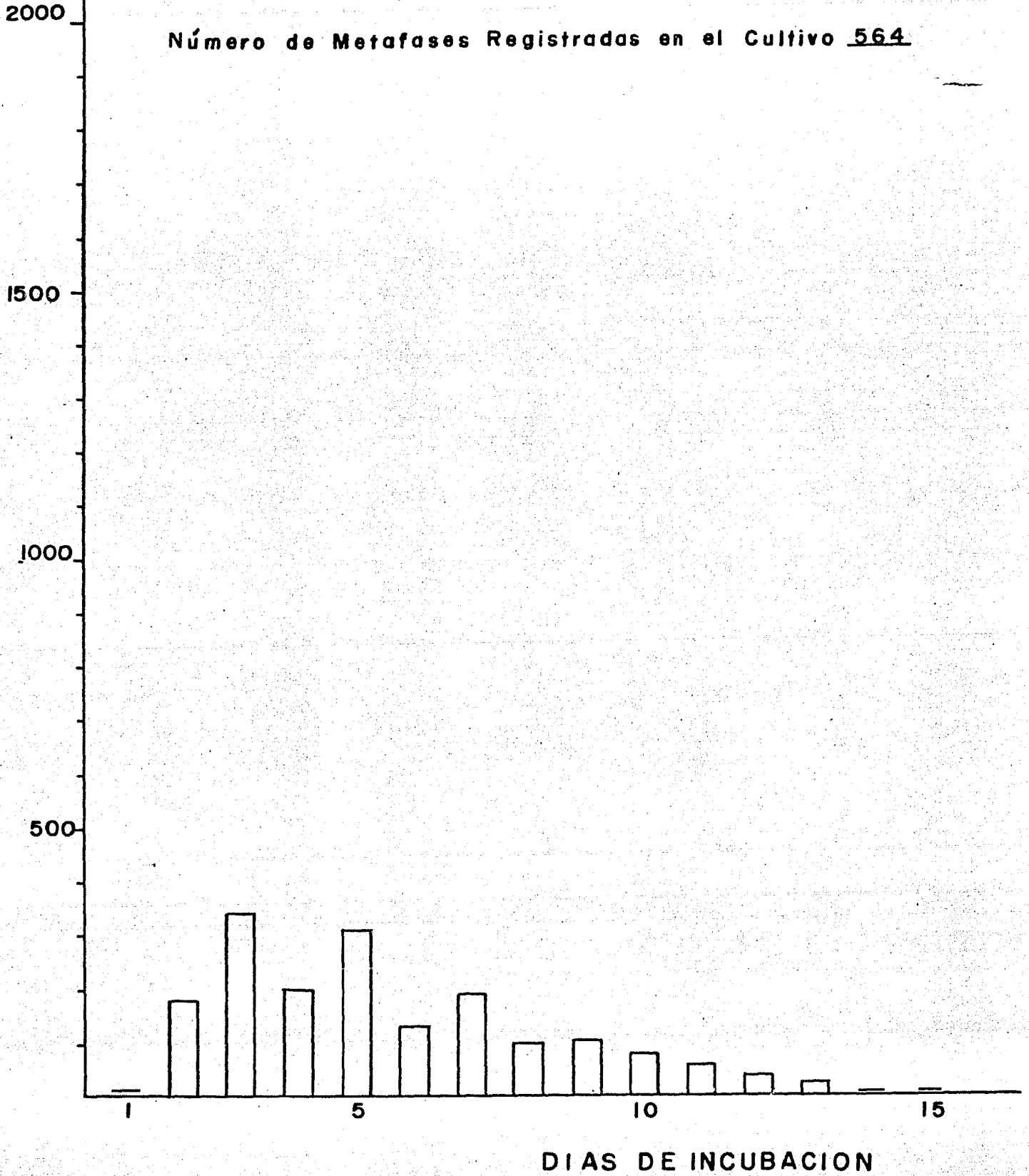
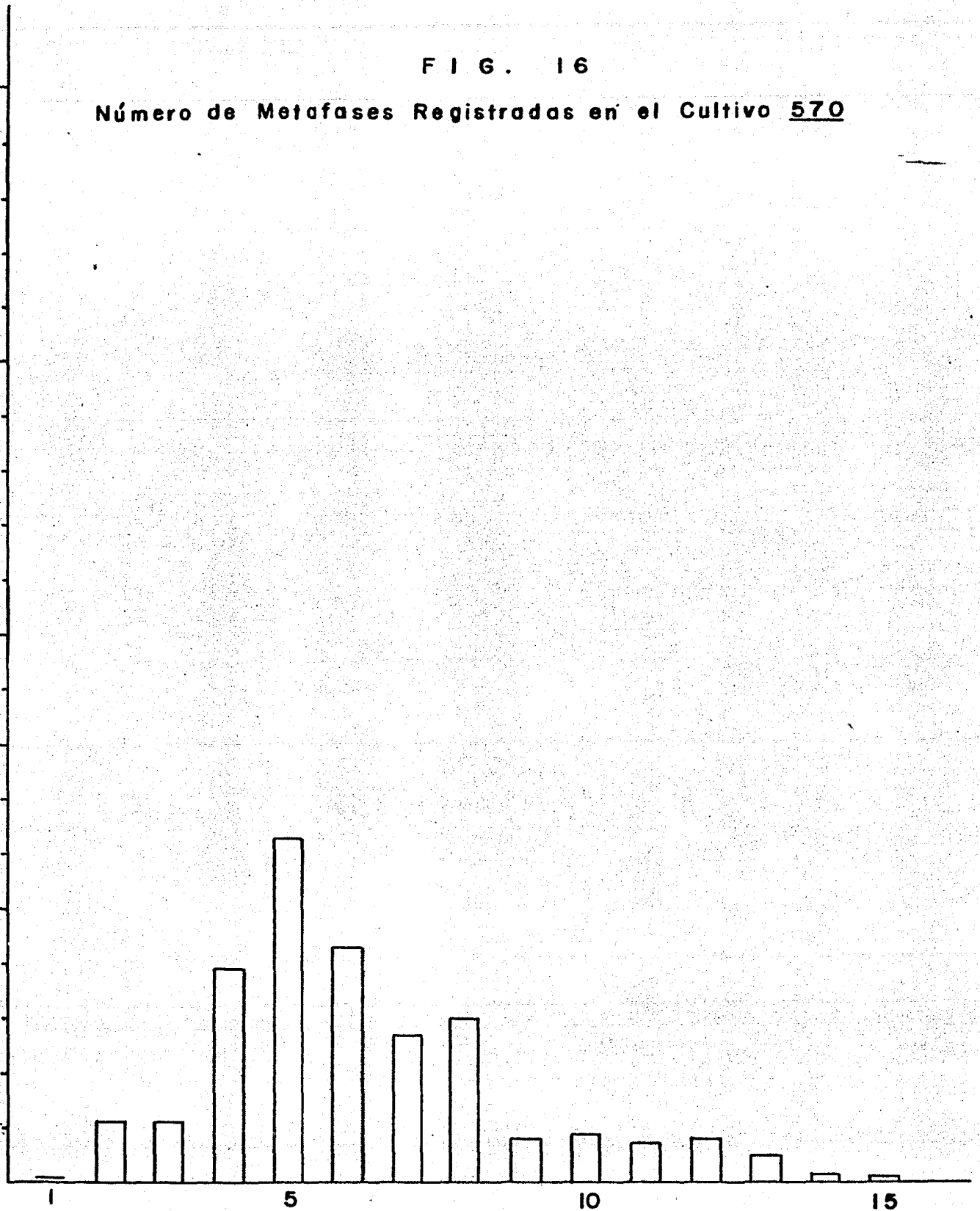


FIG. 16

Número de Metafases Registradas en el Cultivo 570

N.º DE METAFASES

2000
1500
1000
500



DÍAS DE INCUBACION

teriales y métodos; estos datos se muestran también en la Tabla 8 y la Figura 17. Puede observarse en ellas un gran aumento desde el día 1 hasta el día 4, donde se encontró el valor máximo que es de 774 metafases; y después una disminución en el día 5, alcanzando un valor máximo de 470 metafases; en el día 6 se registró otro aumento que casi alcanza el valor del día 4; el número de metafases disminuyó después paulatinamente, hasta que en el día 15 se encuentran 3 metafases como promedio.

Se elaboró un índice de metafases en cada día de incubación, mediante la conversión siguiente:

$$\text{Índice Mitótico} = \frac{\text{Número de Metafases} \times 100}{\text{Número de Células Vivas}}$$

Los valores calculados se muestran en la Tabla 9 y la Figura 18. Se puede observar en ellas que el comportamiento de la población en cada cultivo fué igual al descrito para el número de metafases, lo mismo ocurrió para el índice calculado para el promedio de los tres cultivos; solamente en día 12 de incubación, hubo un pequeño aumento en el índice mitótico, que vuelve a disminuir después hasta el día 15.

FIG. 17

Valores Promedio del Número de Metafases Registradas en los Cultivos 551, 564 y 570

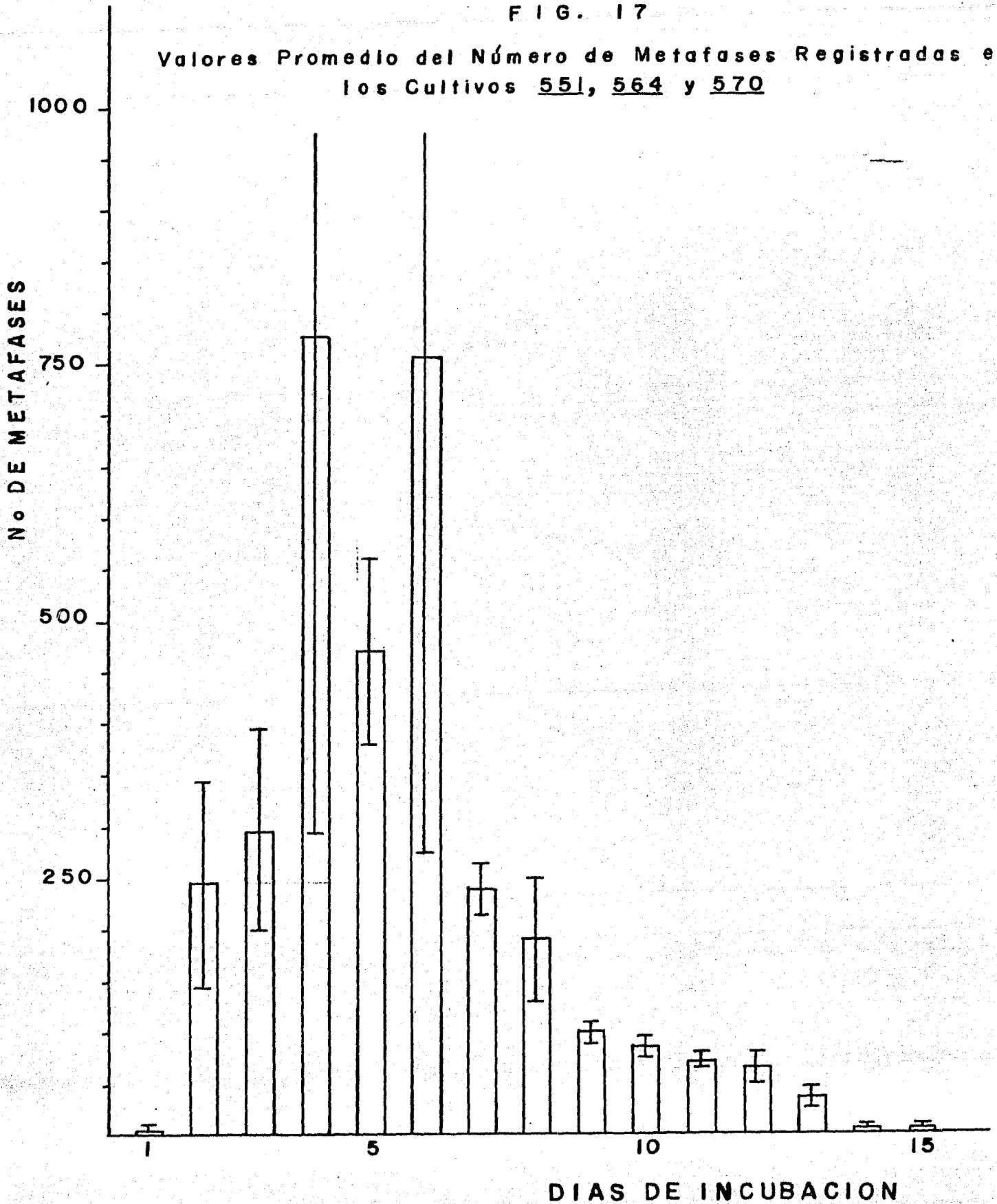


Tabla No. 9

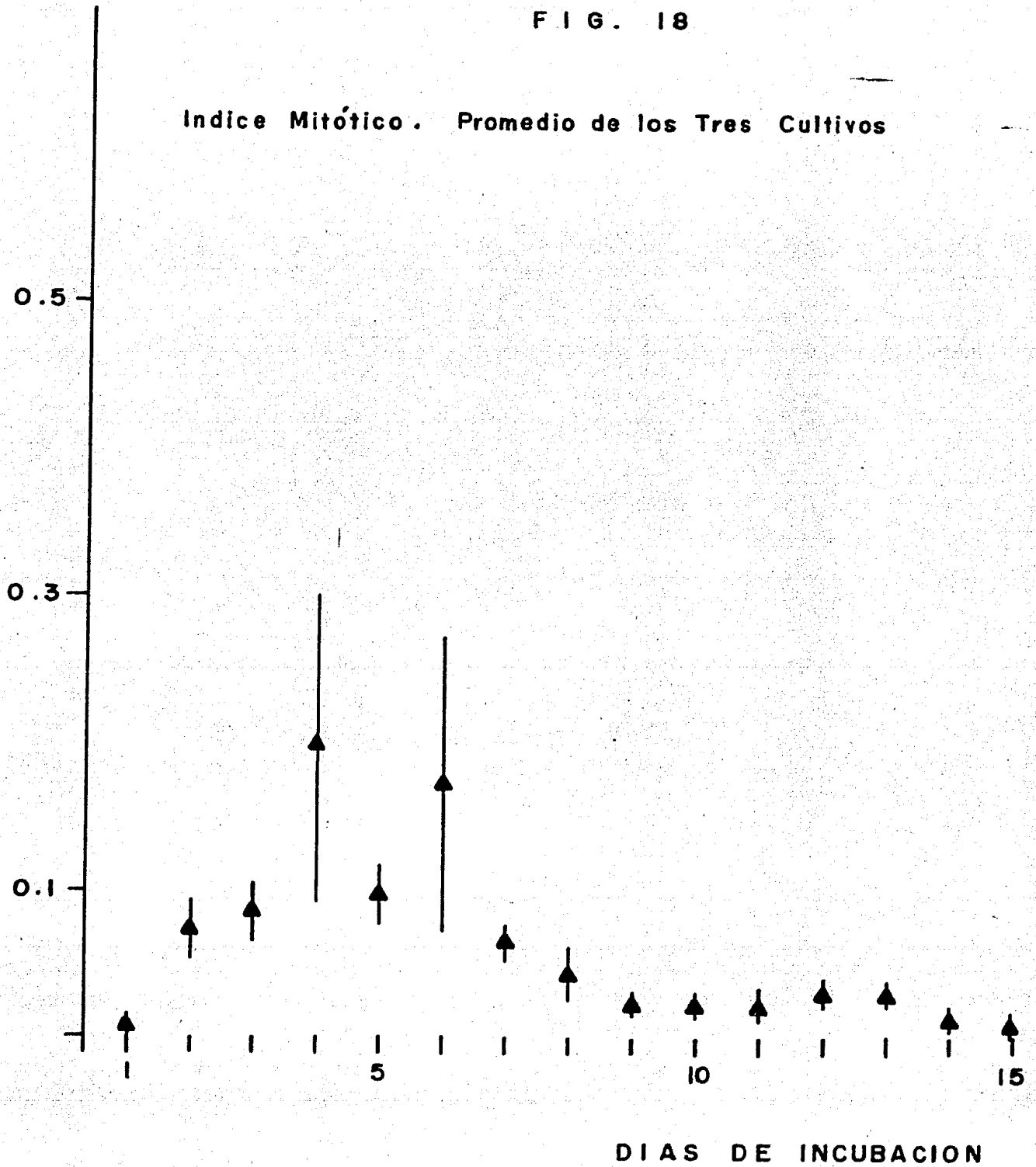
Indice Mitótico de los Cultivos 551, 564 y 570; el Promedio de Ellos y sus
Respectivos Parámetros Estadísticos

Días de in cubación	C. 551	C. 564	C. 570	\bar{X}	$S\bar{X}$	$E\bar{X}$	$\%E\bar{X}$
1	0.0002	0.0003	0.0013	0.0006	0.0006	0.0004	58.53
2	0.1311	0.0531	0.0367	0.0736	0.0504	0.0291	39.57
3	0.1330	0.0894	0.0314	0.0846	0.0510	0.0294	34.78
4	0.4119	0.0546	0.1013	0.1893	0.1942	0.1121	59.23
5	0.0883	0.0611	0.1505	0.1000	0.0458	0.0265	26.46
6	0.4067	0.0302	0.0967	0.1779	0.2009	0.1160	65.21
7	0.0578	0.0519	0.0818	0.0638	0.0158	0.0091	14.33
8	0.0302	0.0197	0.1030	0.0510	0.0454	0.0262	51.36
9	0.0244	0.0226	0.0228	0.0233	0.0010	0.0006	24.44
10	0.0169	0.0216	0.0352	0.0246	0.0095	0.0055	22.30
11	0.0161	0.0191	0.0484	0.0279	0.0178	0.0103	36.93
12	0.0255	0.0162	0.0678	0.0365	0.0272	0.0159	43.50
13	0.0131	0.0263	0.0481	0.0292	0.0177	0.0102	34.95
14	----	0.0116	0.0200	0.0158	0.0059	0.0042	26.58
15	----	0.0074	0.0096	0.0085	0.0016	0.0011	12.94

FIG. 18

Indice Mitótico. Promedio de los Tres Cultivos

INDICE MITOTICO



A manera de resumen se ha elaborado un esquema que conjunta los valores promedio, obtenidos de los tres cultivos en cuanto a incorporación de timidina tritiada, células vivas y número de metafases.

Estos valores se muestran en la Tabla 10 y la Figura 19, en las que se puede observar que los máximos de incorporación de timidina tritiada y número de células vivas, se presentan en el día 5 de incubación, el mayor número de células muertas se presenta en el día 15 y el mayor número de metafases en el día 4. Los valores mínimos de incorporación de timidina tritiada, de número de metafases y de células muertas, se presenta en el día 1 de incubación y el valor mínimo de células vivas se presenta en el día 15.

Se observa además, que el comportamiento de la población en cuanto a número de metafases, es muy similar al de incorporación de timidina tritiada.

Tratando de relacionar cada una de las variables observadas, se llevó a cabo el cálculo del coeficiente de correlación entre los índices de incorporación de timidina tritiada, de mitosis y de células vivas, se tomaron en cuenta solamente los valores promedio de los tres cultivos, escogiendo intervalos de tiempo de incubación donde las curvas se comportaran de manera parecida, ya que la curva descrita por estos índices es muy compleja.

En la Tabla 11 que muestra dichos valores, se puede apreciar que la correlación entre el índice de células vivas y el índice de incorporación de timidina tritiada, en los diferentes intervalos de incubación es muy baja, esto quiere decir que el comportamiento de ambas curvas es muy diferente y no hay relación aparente entre ellas; en cuanto al índice de células vivas y el índice mitótico, se puede observar que solamente en el intervalo de incubación del día 11 al 15, se presenta un coeficiente de correlación que indica que en este intervalo el comportamiento de la pobla-

Tabla No. 10

Valores Promedio de Incorporación de Timidina Tritiada, Viabilidad Celular y Número de Metafases de los Cultivos 551, 564 y 570 con sus Respective Errores Típicos

Días de incubación	VIABILIDAD				INCORPORACION		METAFASES		
	No. de Células X 10 ⁻³	VIVAS	EX̄	MUERTAS	EX̄	³ H-Timidina DPM X 10 ⁻³	Es	No. de Met	EX̄
0	475.3	291.9	150.3	87.7	-----	-----	-----	-----	-----
1	419.3	95.9	143.0	54.1	0.6	0.1	2.0	1.0	
2	326.6	11.0	166.6	52.3	38.6	18.5	243.6	99.2	
3	354.0	13.8	163.6	44.8	40.4	7.6	296.0	97.0	
4	392.3	14.7	176.3	66.3	51.2	6.4	774.0	479.3	
5	486.0	36.3	230.0	100.0	64.9	22.1	469.6	91.8	
6	434.6	7.3	184.3	58.2	41.1	3.7	755.6	483.6	
7	381.0	35.9	206.6	63.9	37.1	9.1	239.0	23.6	
8	447.3	79.0	192.6	73.2	22.1	7.8	189.6	60.9	
9	423.3	31.7	207.6	63.3	17.0	6.4	98.6	8.6	
10	364.3	50.9	276.0	41.0	12.3	5.4	84.0	6.1	
11	313.0	85.6	391.0	32.1	10.1	4.4	70.6	3.9	
12	220.6	55.6	594.3	75.8	4.5	1.7	66.6	14.3	
13	125.0	14.1	657.6	29.9	3.4	1.3	34.0	9.5	
14	84.3	33.2	816.3	85.5	2.8	1.0	5.6	3.5	
15	59.3	16.2	959.6	84.1	2.7	0.8	3.0	2.1	

FIG. 19

Resumen de los Tres Parametros Medidos. Valores Promedio

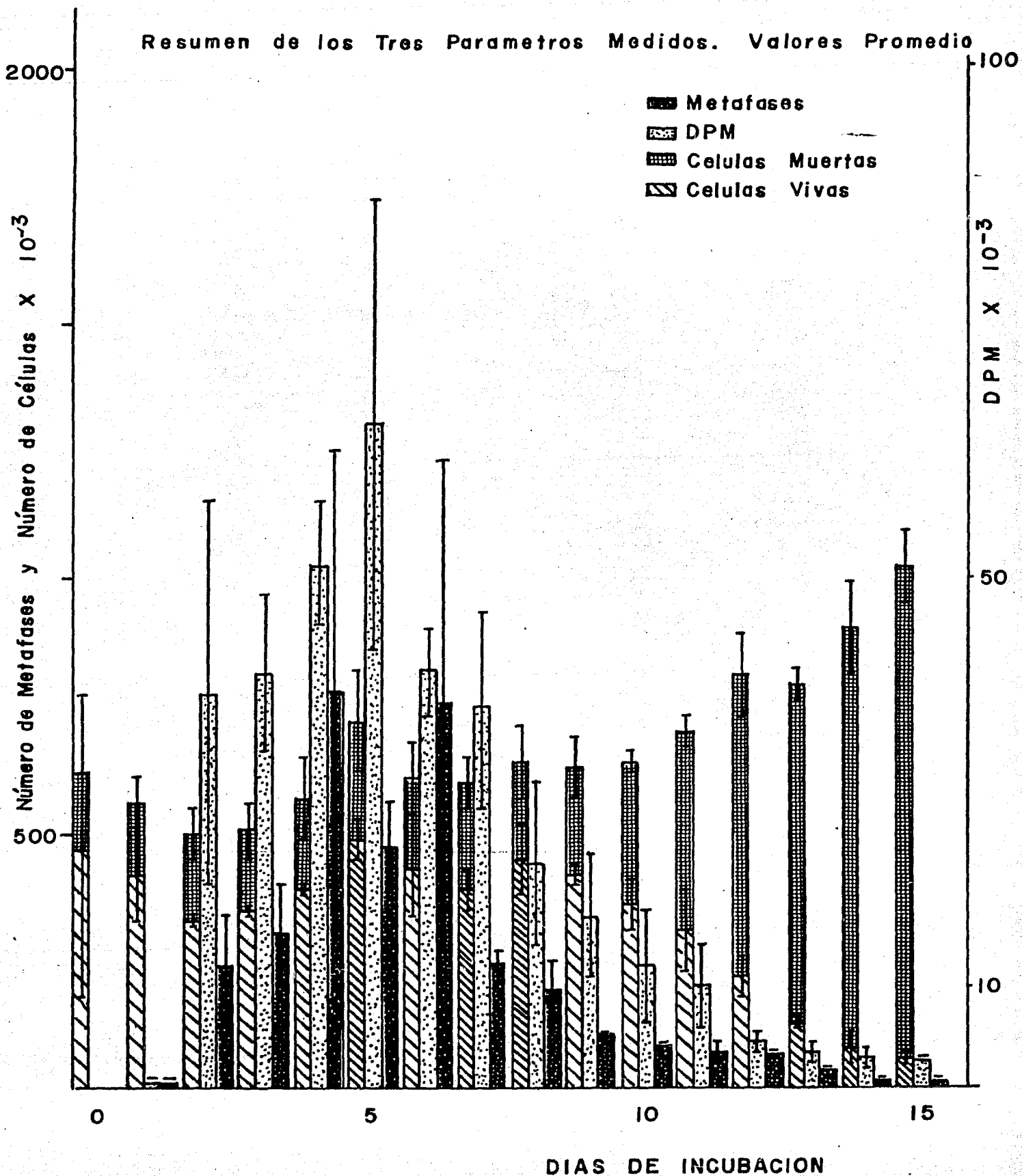


Tabla No. 11

Coeficiente de Correlación (r), entre los Indices de Células Vivas (ICV), de Incorporación de Timidina Trittiada (II) y de Metafases (IM), en Diferentes Intervalos de Incubación.

Intervalos de Incubación	ICV e II	ICV e IM	II e IM
1 - 5	r = 0.47	r = 0.13	r = 0.80
6 - 10	r = 0.41	r = 0.50	r = 0.71
11 - 15	r = 0.17	r = 0.68	r = 0.86

ción está relacionado; si se comparan las figuras 8 y 18, - se puede observar que entre los días 12 y 15, ambas curvas describen el mismo comportamiento, esto es, que tanto el índice de células vivas como el índice mitótico, disminuyen.

En lo que respecta al coeficiente de correlación entre el índice de incorporación de timidina tritiada y el índice mitótico, se observa que dichos valores son muy altos, esto indica que el comportamiento de la población en cuanto a es tos dos parámetros es similar; comparando las figuras 13 y 18, se puede observar, que las curvas son parecidas, lo que indica gran relación.

V Discusión y Perspectivas

Observando en conjunto todos los valores, se pueden apreciar cuatro etapas principales en el crecimiento de la población de linfocitos.

La primera de ellas se presenta en los dos primeros días de incubación, donde al parecer existe un ajuste de la población

Según Carrel (1931), las células que componen un tejido, pueden oponerse a cambios del medio en el que se encuentran, durante algún tiempo, antes de adaptarse a las nuevas condiciones a través de profundas o ligeras transformaciones.

En la población de linfocitos en cultivo, se necesita un período de entre 24 y 48 horas, después de haber agregado el mitógeno, para que se lleve a cabo la síntesis de ADN y subsecuentemente la mitosis (Cooper y Braverman, 1980). Podría esto explicar el comportamiento del cultivo 551, donde se sembraron más de un millón de células; es probable que esta cantidad de individuos haya sobrepasado el potencial de carga del medio y la población necesitara un ajuste, para poder entonces iniciar su crecimiento. Un indicio más de esta suposición es que los linfocitos en este cultivo y alrededor de estos días, no presentan un aumento en incorporación de timidina tritiada (Figura 9) ni en número de metafases (Figura 14).

Se puede descartar la posibilidad de que todas las poblaciones, independientemente del número de individuos de que consten, sufran un ajuste, ya que en los cultivos donde se sembraron un número de células menor de medio millón, no hubo tal disminución de la población; de ahí el gran error típico encontrado en cuanto a número de células vivas, en el primer día de incubación.

Según Ling y Kay, (1975), la población de linfocitos no fácilmente crece y sobrevive a concentraciones menores de medio millón de células por mililitro; los datos obteni-

dos de los cultivos 551, 564 y 570 indican todo lo contrario, cuando el número de células vivas es menor de 500,000 por mililitro, se reproducen y sobreviven fácilmente. Datos similares han sido encontrados con anterioridad, (Sörén, - 1973), en los cuales el número de células vivas decrece hasta cerca del 50%, durante las primeras 24 horas de incubación, de un total de 900,000 células y después se eleva a los 3 y 4 días, siendo casi exponencial.

No obstante todo lo anterior, sería conveniente llevar a cabo un número confiable de cultivos de linfocitos, sembrando diferentes concentraciones de células, de tal manera que se llegue a una conclusión a este respecto.

La segunda etapa se presenta entre los días 2 y 5 de incubación y es un período donde los parámetros observados aumentan. Esta etapa podría ser asociada con la etapa de crecimiento logarítmico que presenta cualquier población, agregando además que el aumento de incorporación corresponde con el aumento de células vivas dentro de la población. Se podría decir entonces que el incremento del número de células que sintetizan ADN entre los días 2 y 5, es debido casi enteramente a la proliferación celular.

En el cultivo 564, el pico de incorporación, se presenta en el día 2 de incubación, saliéndose de la curva patrón elaborada por Ongay, (1978) y la curva promedio del presente trabajo (Figura 12). Esto hace que se encuentre una gran desviación típica en el día 2 y el día 5 en cuanto a incorporación de timidina tritiada.

El número máximo de células que están sintetizando ADN, se encuentra generalmente entre las 72 y 96 horas después de la adición del mitógeno, sin embargo, el período de inducción a la síntesis de ADN, varía marcadamente de célula a célula, los valores extremos están separados por más de 50 horas; se ha encontrado que algunos linfocitos en cultivo, ini

cian su primer período de síntesis de ADN durante las primeras 24 horas, otros en cambio, hasta después de 100 horas de haber agregado el mitógeno; esta gran variabilidad en el sistema pudo ser la causa de encontrar tal efecto en el cultivo 564. Se ha demostrado que esta variabilidad no depende del tiempo de exposición o la disponibilidad del mitógeno en el medio de cultivo, (Sasaki y Norman, 1966., Jasińska et al, 1970., Sörén, 1973).

Podría pensarse también que el hecho de que la población haya respondido tan tempranamente al mitógeno, se debió a que el individuo del que se extrajo la muestra de sangre, presentaba una infección subclínica y los linfocitos se encontraban retados con algún antígeno, entonces no hubo necesidad de esperar hasta el día 5 de incubación, para encontrar la mayor incorporación de timidina tritiada.

Por otro lado el número de células muertas no sufre cambios apreciables, incluso el porcentaje de células vivas se mantiene más o menos constante hasta el día 9 de incubación. La razón por la cual no se encuentra un mayor porcentaje de células vivas en el día 5, donde tanto la incorporación de timidina tritiada como el número de células vivas alcanzan su valor máximo; se podría explicar por la gran mortalidad de las células cuando son tratadas con la solución lisadora de las células rojas, que puede afectar también y en forma apreciable, a los linfocitos, (Thomson et al, 1966).

Puede apreciarse entonces, que en esta 2a. etapa existe un aumento de división celular, demostrándose que las células están en un período de respuesta al mitógeno agregado al medio.

Con respecto al número de metafases, el gran número de ellas registrado en el día 4 de incubación, en el cultivo 551, podría explicar que en el día 5, se encontrara el mayor número de células vivas; pero existe también un gran número de metafases en el día 6 de incubación, sin embargo, no

se encuentra en el día 7 otro pico de células vivas. De ahí la gran desviación típica encontrada en los días 4 y 6 de la curva promedio.

Carrel, (1931), consideró que un tejido consiste de una sociedad de organismos complejos que no responden de una manera instantánea a los cambios del medio en el que se encuentran.

En una población de linfocitos en cultivo, la variabilidad interindividual es también muy compleja; existen por lo tanto, muchos factores que podrían explicar el número tan diferente de metafases registradas entre los días 4, 5 y 6; uno de ellos sería que no existe sincronía alguna en el cultivo. Bender y Prescott, (1962), examinaron cultivos de linfocitos al final del día 3 de incubación, mediante el rastreo de elementos radiactivos en los cromosomas y encontraron la primera, segunda y subsecuentes generaciones de mitosis presentes juntas; esta asincronía de la respuesta de proliferación podría ser originada por la variabilidad del tiempo intermitótico de células individuales o subpoblaciones y la diferencia en la duración del período de inducción mencionado con anterioridad. Otro de los factores sería la diferente sensibilidad de las células al mitógeno o a la presencia de distintas poblaciones de linfocitos. Jasińska et al, (1970), bloquearon la síntesis de ADN en linfocitos cultivados y encontraron que la curva de acumulación de las células en el punto G_1/S , es bifásica y llegaron a la conclusión, por este motivo, que están presentes en el cultivo dos subpoblaciones de linfocitos con diferente reactividad al mitógeno.

No obstante todo lo anterior, la gran variabilidad encontrada en cuanto a número de metafases, se presenta solamente en el cultivo 551, pero en tal grado que llega a afectar la curva promedio e incluso el índice mitótico elaborado; por lo tanto se debe pensar también en una posible fa-

lla en el método para la preparación de metafases en este cultivo.

Llevando a cabo cultivos de linfocitos sincronizados y estando seguros que el donador no ha presentado alguna infección, podría encontrarse alguna respuesta a los hechos anteriores.

La tercera etapa se presenta entre los días 5 y 9 de incubación, en donde a pesar de existir una disminución en la incorporación de timidina tritiada, el número de células tanto vivas como muertas, permanece más o menos constante, encontrándose poca variación en el porcentaje de células vivas; esto hace pensar que los linfocitos pierden su capacidad para ser estimulados por el mitógeno, o bien que la población ha alcanzado un punto de equilibrio con su medio y que éste sólo le permite pequeñas fluctuaciones alrededor de un valor, debidas tal vez a cambios mínimos en temperatura, pH, etc. Se puede decir entonces, que la población ha llegado a una estabilización en donde el decremento en la síntesis de ADN, no es debido a una disminución en el número o porcentaje de células vivas.

En este caso se pueden utilizar medios condicionados, esto es, colocar a las células en un medio de cultivo nuevo o sembrar más células en el medio de cultivo previamente usado; para observar más detenidamente el efecto del mitógeno sobre la población, también podría calcularse la cantidad de proteínas, para determinar si la población se presenta en una etapa de síntesis o no.

Por otro lado, el número de metafases disminuye, presentando un comportamiento similar al de incorporación de timidina tritiada; el coeficiente de correlación muestra un valor alto, lo que indica gran relación entre uno y otro parámetro.

Los linfocitos estimulados in vitro, proliferan con un tiempo de generación de 20 a 22 horas aproximadamente; las células hijas se parecen a la célula progenitora estimulada, no habiendo evidencias de diferenciación. Estas células hijas son capaces de dividirse de 2 a 4 veces y una vez llevado a cabo este número de divisiones, el cultivo tiende a morir, (Deutch, 1981., Cooper y Braverman, 1980). Esto pudo haber sucedido en la cuarta etapa del cultivo que se presenta del día 9 al día 15 de incubación y se caracteriza por una disminución acelerada de la cantidad de células vivas e incorporación del precursor radiactivo, además de un gran aumento en el número de células muertas y el índice de incorporación de timidina tritiada.

Según Kormondy, (1978), conforme la población se va acercando a un máximo o los recursos del medio se van agotando, se tropieza con una resistencia mayor al crecimiento, disminuyendo así, su potencial de reproducción puesto que hay menos lugares vacíos en el sistema.

El comportamiento de la población en esta última etapa, sugiere dos posibilidades.

La primera sería que al final de la incubación, la población estuviera más seleccionada; las células sobrevivientes serían pocas, pero la mayoría respondería al mitógeno sintetizando ADN y por esta razón se eleva el índice de incorporación, correspondiendo mayor incorporación de timidina tritiada por célula, al mismo tiempo la mayoría de estas pocas células, llegarían a la fase de mitosis y por eso se observan al final de la incubación, un número muy bajo de metafases. Esto nos sugeriría al mismo tiempo, que la membrana de los linfocitos es grandemente flexible, de tal manera que aún después de perder su integridad funcional, permite que la célula muerta permanezca por mucho tiempo, de dos horas a varios días, sin destruirse; esta sería la razón por la cual se observan un gran número de individuos --

muertos, en los últimos días de incubación del cultivo, en otras palabras, los individuos muertos se irían acumulando.

La segunda posibilidad sería que en realidad existe un gran número de células vivas pero ahora la mayoría son muy débiles o muy susceptibles a cualquier cambio del medio en el que se encuentran; así entonces, más células que en el caso anterior, serían capaces de incorporar timidina tritida, sería por eso el incremento en el índice de incorporación; pero solamente las células más resistentes serían capaces de completar su ciclo celular con éxito y por esa causa se registran pocas metafases en este período. Esto sugiere a su vez, que la susceptibilidad de los linfocitos es mayor mientras el tiempo de incubación aumenta, no pudiendo soportar el tratamiento con la solución lisadora para las células rojas que es necesario para llevar a cabo la prueba de exclusión del azul tripan.

La influencia de la solución hipotónica sobre la mortalidad de los linfocitos, tiene el efecto importante de destruir a la mayoría de las células frágiles. Esta susceptibilidad o fragilidad, podría ser acrecentada por la acumulación en el medio de cultivo, de materiales de desecho o bien a la falta de sustancias necesarias para sus funciones metabólicas, que al ir aumentando el tiempo de incubación se verían disminuidas.

La exclusión de colorantes vitales de la célula, es un método rápido para determinar su vitalidad, esta prueba ha sido usada por más de 50 años; en ella, la admisión del colorante por la célula, es tomada como un indicio de la pérdida de la integridad de la membrana celular. La tinción de las células ha sido estudiada con relación a la respiración, a la glucólisis, la actividad de la membrana celular, etc. (Dickson, 1970). Tomando en cuenta lo anterior, se hicieron observaciones cualitativas para determinar si en realidad la membrana de los linfocitos teñidos se rompía o no; para ello se elaboraron preparaciones frescas a partir del mate-

rial del cultivo tratado previamente con la solución lisadora para las células rojas, a diferentes tiempos de incubación; se sellaron con esmalte para evitar su evaporación; se escogió un campo en cada preparación, y se observó al microscopio de contraste de fases periódicamente durante 3 días; el efecto del rompimiento de la célula, no se pudo observar en ningún caso.

Para tratar de aclarar esta idea podrían establecerse cultivos de 10 a 15 días de incubación, utilizando linfocitos aislados que no requieren los pasos de centrifugación y lisado de eritrocitos que podrían producir la lisis de las células blancas; hacer también observaciones al microscopio electrónico para apreciar el rompimiento de la membrana y utilizar medios condicionados en este período de incubación, para apreciar si en realidad son factores ambientales los que causan la muerte de los linfocitos o si su acumulación se debe a factores fisiológicos solamente.

Por último se puede decir que como en todos los ecosistemas, el medio de cultivo de los linfocitos también tiene un límite y una cierta cantidad de individuos que pueden vivir en él.

En el caso de un ecosistema natural, las poblaciones crecen hasta alcanzar un punto de equilibrio con su medio; en el caso de un ecosistema experimental, como lo es la población de linfocitos, las poblaciones crecen hasta que los nutrimentos se agotan o los desechos metabólicos sobrepasan cierto valor, sin dejar de tomar en cuenta que el potencial reproductivo de las células es un factor muy importante en este crecimiento

Debe hacerse notar que este esquema no podrá ser extrapolado al crecimiento que sufre la población de linfocitos dentro de un organismo, que se encuentra en presencia de un antígeno, ya que las condiciones de la población en cultivo, no son iguales a las encontradas naturalmente. En las pobla

ciones naturales de linfocitos, influyen muchos factores, - gran parte de ellos aún desconocidos, por lo cual es difícil si no imposible por el momento, llegar a aplicarlos y controlarlos in vitro; no obstante esto, un estudio más intenso en este campo, llegará a aclarar hechos importantes en la proliferación de la población in vitro e in vivo.

IV Bibliografía

- Absher, M 1973. Hemocytometer Counting. Tissue Culture: Methods and Applications. Krusse, P.F. y M.K. Patterson ed. Academic Press Inc. Nueva York, N.Y. U.S.A.
- Arakaki, D.T. y P.S. Sparkes. 1963. Microtechnique for Culturing Leucocytes from Whole Blood. Cytogenetics: 2: 57-60
- Bender, M.A. y D.T. Prescott. 1962. DNA Synthesis and Mitosis in Cultures of Human Peripheral Leukocytes. Exptl. Cell. Res. 22, 221
- Boughey, A.S. 1973. Ecology of Populations. 2a. ed. Macmillan Publishing Co. U.S.A.
- Cantor, H. y R.K. Gershon. 1979. Cellular Communication Among Immunological Cells. The Role of Intercellular Signals: Navigation, Encounter, Outcome. Nicholls, J.G. ed. Verlag Chemie. Nueva York, N.Y. U.S.A.
- Carrel, A. 1931. The New Cytology. Science. 73, 1890: 297-303
- Cooper, E.H. y J.L. Amiel. 1965. La Prolifération des Lymphocytes Humains "in vitro". Rev. Franc. Etudes Clin. et Biol. X: 469 - 487
- Cooper, H.L. y R. Braverman. 1980. Protein Synthesis in Resting and Growth - Stimulated Human Peripheral Lymphocytes. Exptl. Cell. Res. 127: 351 - 359
- Daly, W.F. 1973. Electronic Enumeration and Sizing of Cells. Tissue Culture: Methods and Applications. Krusse, P.F. y M.K. Patterson ed. Academic Press Inc. Nueva York, N.Y. U.S.A.

- Deutsch, C., M.A. Price y C. Johansson. 1981. A Sodium Requirement for Mitogen - Induced Proliferation in Human Peripheral Blood Lymphocytes. *Exptl. Cell. Res.* 136: 359 - 369
- Dickson, J.A. 1970. The Uptake of Non-metabolizable Aminoacids as an Index of Cell Viability in Vitro. *Exptl. Cell. Res.* 61: 235 - 245
- Dobzhanski, T. 1970. *Genetics of the Evolutionary Process.* - Columbia University Press. U.S.A.
- Dreux, P. 1979. *Introducción a la Ecología.* 2a. ed. Editorial Alianza. Madrid, España
- Heath, O.V.S. 1977. *La Estadística en la Investigación Experimental.* Ediciones Omega S.A. Barcelona, España
- Herzenberg, L.A., R.G. Sweet y L.A. Herzenberg. 1976. Fluorescence Activated Cell Sorting. *Sci. Amer.* 234, 3: 108 - 117
- Humason, G.L. 1979. *Animal Tissue Techniques.* 4a. ed. W.F. Freeman and Company. San Francisco, California. U.S.A.
- Holden, H.T., W. Lichter y M.M. Sigel. 1973. *Cuantitative - Methods for Measuring Cell Growth and Death. Tissue Culture: Methods and Aplications.* Krüsse, P.F. y M.K. Patterson ed. Academic Press Inc. Nueva York, N.Y. U.S.A.
- Jasińska, J., J.A. Steffen y A. Michalowski. 1970. *Estudies on in vitro Lymphocytes Proliferation in Cultures Synchronized by the Inhibition of DNA Synthesis.* *Exptl. Cell. Res.* 61: 333 - 341
- Kormondy, E.J. 1978. *Conceptos de Ecología.* 3a. ed. Editorial Alianza. Madrid, España

- Lehninger, A.L. 1975. Biochemistry. 2a. ed. Whorth Publishers. Nueva York, N.Y. U.S.A.
- Ling, N.R. y J.E. Kay. 1975. Lymphocyte Stimulation. 2a. ed. North - Holland Publishing Co. Amsterdam, Holanda
- Mazia, D. 1974. The Cell Cycle. Sci. Amer. 230, 1: 55 - 64
- Mettler, L.E. y T.G. Gregg. 1972. Genética de las Poblaciones y Evolución. Editorial UTEHA. D.F. México
- Moorhead, P.S. 1973. Cultures for Chromosome Cytology. Tissue Culture: Methods and Aplications. Krusse, P.F. y M. K. Patterson ed. Academic Press Inc. Nueva York, N.Y. - U.S.A.
- Ongay, L.L.M. 1978. Modelo Experimental del Desarrollo de una Población de Linfocitos Humanos "in vitro". Tesis - Profesional. Facultad de Ciencias, Departamento de Biología. U.N.A.M.
- Parker, R.E. 1976. Estadística para Biólogos. Ediciones Omega S.A. Barcelona, España
- Phillips, H.J. 1973. Dye Exclusion Test for Cell Viability. Tissue Culture: Methods and Aplications. Krusse, P.F. y M.K. Patterson ed. Academic Press Inc. Nueva York, N.Y. U.S.A.
- Sasaki, M.S. y A. Norman. 1966. Proliferation of Human Lymphocytes in Culture. Nature. 210: 913 - 914
- Shall, S. 1973. Cells at Defined Stages of the Cell Cycle. Tissue Culture: Methods and Aplications. Krusse, P.F. y M.K. Patterson ed. Academic Press Inc. Nueva York, N.Y. U.S.A.

- Smith-Keary, P.F. 1979. Genética; Estructura y Función. Publicaciones Cultural S.A. D.F., México
- Sokal, R.R. y F.J. Rohlf 1969. Biometry. W.H. Freeman and Company. San Francisco, California. U.S.A.
- Sörén, L. 1973. Viability of the Time at Which PHA-Stimulated Lymphocytes Initiate DNA Synthesis. Exptl. Cell. Res. 78: 201 - 208
- Thomson, A.E.R., J.M. Bull y M.A. Robinson. 1966. A Procedure for Separating Viable Lymphocytes from Human Blood - and Some Studies on Their Susceptibility to Hypotonic Shock. Bri. J. Haematol. 12, 433
- Wilson, D.B. 1966. Analysis of Some of the Variables Associated With the Proliferative Response of Human Lymphoid Cells in Culture. J. Exptl. Zool. 162: 161 - 170