

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS

ACCION DE LA FITOHEMAGLUTININA
EN LA REGENERACION DE LA
PLANARIA DUGESIA DOROTOCE-
PHALA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
BIOLOGO

P R E S E N T A

PAULA ROMO RUIZ

MEXICO, D. F. 1969



FACULTAD DE CIENCIAS
Biblioteca



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.

FC-T-779

A mis padres

8

 Mi agradecimiento al Biólogo Alfredo
Laguarda Figueras por su cooperación y em
peño en la realización del presente traba
jo. Así mismo deseo manifestar mi grati_
tud al Antropólogo Rodrigo Díaz por la
ayuda prestada.

Deseo manifestar especialmente mi agradecimiento al Dr. Agustín Ayala-Castañares, Director del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México, por haber dado las facilidades necesarias para la elaboración del presente - trabajo, en el Laboratorio de Genética del Departamento de Biología Experimental del Instituto a su digno cargo.

CONTENIDO

	Página
INTRODUCCION	1
MATERIAL Y METODO	4
RESULTADOS ESTADISTICOS	7
DISCUSION Y CONCLUSIONES	27
RESUMEN	29
BIBLIOGRAFIA	30
APENDICE "A". Cuadros de concentración ...	33
APENDICE "B". Gráfica	42

INTRODUCCION

1

El presente trabajo se realizó con el objeto de examinar la acción de la substancia vegetal llamada fitohemaglutinina en la regeneración de la planaria Dugesia dorotocephala. La fitohemaglutinina, también denominada Lectina y representada por las siglas P.H.A. (iniciales del nombre en el idioma inglés), es una mucoproteína parcialmente purificada. Se la encuentra en la mayoría de los vegetales, pero se aísla, principalmente, de las leguminosas como Phaseolus vulgaris L., utilizando una modificación del método de Rigas (1955), la P.H.A., se ha extraído de 420 especies de leguminosas, y se localiza en todo el vegetal pero en mayor proporción en las semillas.

Por otra parte, esta substancia ha sido estudiada, tanto en criptógamas como en fanerógamas, encontrándose en una proporción mayor en la Clase Basidiomicetos, Dubovoy (1966).

La propiedad de la P.H.A., que la hace importante en citología es la de aglutinar a los eritrocitos o glóbulos rojos de ciertos animales, incluyendo al hombre.

Bird (1963), hizo una diferenciación de eritrocitos de

algunas especies animales, utilizando extracto de P.H.A. de diferentes semillas, de acuerdo con su afinidad a los diversos tipos de P.H.A.

Otra propiedad muy importante de la P.H.A., es la de presentar una acción mitogénica. Esta propiedad ha sido descubierta en la P.H.A. de Phaseolus vulgaris, la cual ha sido utilizada en diferentes investigaciones como en "cultivo de tejidos" humanos.

Zeck (1966), ha empleado la P.H.A. en tres ciliados diferentes Bursaris truncatella, Stentor coeruleus y Paramecium, en donde obtuvo una reducción del período intermitótico.

Agrell (1966a, 1966b,) trabajando en Acanthamoeba, observó que, añadiendo P.H.A. al medio, se producía un aumento en la multiplicación celular durante más de cinco generaciones. Pero también al agregar una solución salina este aumento se observó nuevamente sin P.H.A. Sin embargo, este autor acepta que la acción mitogénica pudo haber sido debida al resultado indirecto de la P.H.A.

Los estudios realizados por Nowel (1960), sugieren que la acción de la P.H.A. sobre los leucocitos no estimula directamente la mitosis pero predispone la transformación de los monocitos y linfocitos grandes a un estado capaz de división. Por otra parte, las células de la médula ósea y los blastos de leucemia, mostraron un aumento en la actividad mitótica en pocas horas, ba_

jo las mismas condiciones de cultivo "in vitro". Esto ha_ ce pensar que existe un período de latencia largo y otro corto que determinarían el estímulo mitogénico. En el ca_ so de las células de la médula ósea, cuya división celu_ lar es muy frecuente, responden a la estimulación en po_ cas horas. Este hecho no se observa en otras células, por ejemplo en las del hígado, las cuales no tienen como fun_ ción primordial la de dividirse, ya que este tipo de célu_ las responden solamente después de un período de latencia largo.

Naspitz (1968), utilizó la P.H.A. en cultivos " in vi_ tro" de linfocitos a diferentes concentraciones, observan_ do que durante períodos cortos de 35 días, las concentra_ ciones de 0.1, 0.3 y 0.6 tienen una acción semejante; pero en períodos largos a concentraciones de P.H.A. de 0.1 y 0.3, el mantenimiento de los linfocitos era más eficaz.

MATERIAL Y METODO

2

Las planarias examinadas pertenecen a la especie Dugesia dorotocephala. Fueron colectadas en el Jardín Botánico Exterior de la Universidad Nacional Autónoma de México y mantenidas en el laboratorio en recipientes que contenían agua electropura, la cual fue renovada cada tercer día. Se les alimentó dos veces por semana, con hígado de res licuado.

El diseño del trabajo comprende, básicamente, dos grupos experimentales: el primero, sin fitohemaglutinina (P.H.A.) y el segundo, con fitohemaglutinina. En este último, se utilizó la substancia en solución acuosa (agua purificada al 8%) para lo cual, se seleccionaron planarias cuya longitud osciló entre 1.5 y 2.0 cm. Se cortaron transversalmente en la zona comprendida entre la faringe y las aurículas, ya que ésta es de fácil localización, y además, presenta una mayor superficie para la regeneración.

A partir del momento de la separación de los fragmentos cortados, el animal empieza a regenerar la parte mutilada. al cabo de cierto tiempo, se inicia la formación de una cicatriz característica en la zona del corte, denominada blastema, este tejido está formado por cé

lulas indiferenciadas o neoblastos, las cuales se encuentran distribuidas en todo el parénquima de la planaria y emigran hacia el sitio del corte. Los blastemas utilizados se formaron a expensas de los fragmentos anteriores que dan origen a la región posterior del animal.

La división mitótica de los neoblastos del blastema fue detenida con colchicina en la etapa denominada metafase. La interrupción de la cariocinesis en la fase señalada, se verificó en diferentes horas a partir del momento en el que se inició la regeneración posterior al corte, estos tiempos fueron: 35.15 horas, 38.0 horas, 40.0 horas, 43.0 horas, 46.30 horas, 50.0 horas y 55.0 horas para el grupo control (sin fitohemaglutinina); en tanto que los tiempos para el grupo tratado fueron a 5.0 horas, 15.0 horas, 19.30 horas, 24.0 horas, 38.0 horas y 45.0 horas, a partir del momento de la disección, durante las cuales las planarias permanecieron en la solución de fitohemaglutinina M (Difco Laboratories, Detroit Michigan. 0528-56).

Una vez terminado el período de regeneración a cuyo nivel se desea analizar el blastema, las planarias fueron transferidas a una solución acuosa de colchicina al 1% durante tres horas, con el fin de inhibir la formación del huso acromático. Posteriormente, se fijó el material en alcohol acético (3:1) durante un tiempo no menor de 20 min. En este momento, se separó el blastema del resto del animal. Una vez efectuado esto, se qui

tó el excedente del material y se prosiguió a hidrolizar el material en ácido clorhídrico normal, durante 15 min. a temperatura ambiente. La tinción se efectuó utilizando las solucipnes I y II a base de aceto-orceína verde Janus B, obteniéndose buenos resultados. Para una mejor dispersión del material y facilitar el conteo de las células, se realizó una presión ("squash") sobre la preparación, a la cual se le había añadido, previamente, una gota de ácido acético al 45%. Una vez que se hubo deshidratado y montado en bálsamo del Canadá, fueron seleccionas las mejores preparaciones, tomando en cuenta la separación de las células, así como su colocación en un solo plano para facilitar su conteo.

Se contaron aproximadamente 5000 células en cada uno de los períodos de formación del blastema, dentro de las cuales se observó un porcentaje de células en metafase, y de este modo se obtuvo un índice mitótico para cada uno de los períodos de observación.

El conteo se efectuó muestreando las preparaciones por medio de líneas imaginarias paralelas en sentido horizontal con intervalos de cinco campos entre sí, recorriendo las preparaciones de izquierda a derecha.

RESULTADOS ESTADISTICOS

Los resultados obtenidos en los experimentos, con y sin fitohemaglutinina, se encuentran concentrados en el cuadro número 1 (ver apéndice A). Las columnas número 1, contienen las diversas horas de observación; las columnas número 2, el número total de células observadas en cada uno de los períodos y en las columnas número 3, el número o frecuencia de células en período de metafase.

Como no se examinó el mismo número de células en cada una de las horas, fué necesario obtener cifras relativas, es decir, el número de células en metafase por cada 1000 células observadas. Esas proporciones llamadas índices de metafase se calculan en cada hora de observación. Se multiplicó la frecuencia de metafases por 1000 y dividiendo este producto entre el número de células contadas. Los índices de metafases representados con las letras (IM) se expresan así:

$$IM = \frac{N \times 1000}{T} \dots\dots\dots (1)$$

donde N es el número de células en metafase y T el número total de células contadas en cada una de las horas de observación; por ejemplo, en el experimento sin fitohemaglutinina a las 43 horas después de haber sido contadas las

planarias, se observaron 65 células en metafase de un total de 4074 células. El índice de metafase corresponde a este período de observación (aplicando la fórmula número 1):

$$IM_{43} = \frac{6.5 \times 1000}{4074} = 15.9$$

el subíndice 43 indica la hora cuando se efectuó la observación.

De este modo se calcularon los índices de metafases correspondientes a cada una de las horas de observación en los tratamientos con y sin fitohemaglutinina. Los diversos índices se concentran en el cuadro número 2 (ver apéndice A).

Partiendo de la información contenida en el cuadro número 2, se realizó el análisis matemático de los datos. Este análisis comprende la aplicación de una serie de métodos estadísticos que, en términos generales, podemos resumir de la siguiente manera:

- a) la descripción del fenómeno mediante una serie de estimaciones de los parámetros: la media aritmética (\bar{x}), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variabilidad (V).
- b) el cálculo de medidas de seguridad y confianza, tales como el error estándar de la media ($S\bar{x}$) y error estándar de la desviación estándar (Ss).
- c) La interpolación de la curva teórica del fenómeno de los valores observados en el laboratorio. Así

mismo, se estableció la relación matemática que define la función existente entre los índices de meta_fases obtenidas y las horas de observación, consideradas como variables dependiente e independiente, respectivamente.

- d) representación gráfica de los valores en un plano de coordenadas cartesianas.
- e) la aplicación de la χ^2 (ji-cuadrada) para probar la "bondad de ajuste" entre la distribución del fenómeno observado con respecto a la distribución teórica del mismo.
- f) finalmente, la aplicación de la prueba t "student", para juzgar si la diferencia existente entre las distribuciones de los experimentos sin y con fitohemaglutinina, es significativa estadísticamente.

Para ilustrar esta secuencia, tomaremos los datos del experimento control (es decir, en el caso de no haber usado fitohemaglutinina). Esta misma metodología es seguida en el caso del experimento con fitohemaglutinina; por esta razón ya no explicaremos cada uno de los pasos, limitándonos a presentar en cuadros los resultados de los cálculos.

Antes de iniciar la exposición, es necesario enfatizar un hecho que constituye la base de la metodología seguida. Examinando la columna que contiene los índices de meta_fases observados en el experimento sin fitohemaglutinina

(cuadro número 2), a las 35 horas 15 minutos, el índice es de 5.7, a las 38 horas este índice se encuentra a 11.4, a las 40 horas prosigue este aumento a 13.5 y a las 43 horas el índice es máximo, a partir de este período lejos de seguir aumentando, disminuye paulatina_ mente hasta llegar a las 55 horas a 11.1. En otras pala_ bras existe un período de observación que se localiza a la mitad de la escala donde el índice es óptimo; a medi_ da que nos alejamos de este período central, es decir, nos aproximamos a los extremos, el índice disminuye. Si_ guiendo la terminología impuesta por los estadísticos, diremos que los índices de metafases en el experimento sin fitohemaglutinina se distribuyen normalmente.

En el experimento con fitohemaglutinina éste se repite y por ello los índices mitóticos también se distribuyen normalmente.

Es importante hacer notar el concepto anterior ya que la teoría matemática de los métodos estadísticos aplica_ dos, se basan en este hecho y son utilizables a estos ca_ sos, para mostrar como se han obtenido ciertas cifras que constituyen el punto de partida del análisis estadístico, elaboramos el cuadro número 3, (ver apéndice A).

Como se hizo en los cuadros números 1 y 2, la columna marcada con la letra X, representa las diversas horas de observación; la siguiente columna designada con la letra Y muestra los índices de metafases correspondientes a ca_ da X; la tercera columna denominada X^2 , se obtiene multi_

plicando cada X por sí misma, es decir, elevando las equis al cuadrado, por ejemplo:

$$35.15^2 = 35.15 \times 35.15 = 1235.5225$$

La columna XY constituida por los productos de cada X por su correspondiente Y; esto es:

$$35.15 \times 5.7 = 200.355$$

y la última columna X^2Y , se obtiene multiplicando el cuadrado de las X por su respectiva Y, es decir:

$$1235.5225 \times 5.7 = 7042.4782$$

los valores contenidos en la 2a., 4a., y 5a. columnas se suman. Estas cifras están contenidas en la última hilera titulada "totales".

En este paso incluimos un nuevo símbolo algebraico " Σ " (sigma mayúscula, letra del alfabeto griego) que se lee "suma de valores". Esto nos permite resumir los datos como sigue:

$$\Sigma Y = 76.9$$

$$\Sigma XY = 3403.155$$

$$\Sigma X^2Y = 153480.1982$$

La suma de todos los valores obtenidos multiplicando cada X por su respectiva Y ó ΣXY es elevado al cuadrado.

$$(\Sigma XY)^2 = 3403.155 \times 3403.155 = 11581463.954$$

Este cuadrado se divide entre la suma de todos los indi_

ces ó ΣY

$$\frac{(\Sigma XY)^2}{\Sigma Y} = \frac{11581463}{76.9} = 150604.2126$$

Como se ha establecido en párrafos anteriores, estos totales son el punto de partida de las estimaciones de los parámetros que definen o caracterizan al tratamiento sin fitohemaglutinina. A continuación ejemplificaremos estos cálculos.

Esencialmente, nosotros deseamos saber qué período de observación es el óptimo, es decir, a qué hora se observa el mayor número de células en metafase. Estadísticamente, ésto corresponde al punto más alto de la curva que representa al fenómeno y el problema se resuelve estimando el período de observación que corresponde a este punto. En términos probabilísticos, este punto es llamado la media aritmética que representaremos como (\bar{x}) (equis barra) y definiremos como el cociente que resulta de dividirse ΣXY (suma de productos del período de observación por su índice de metafases) y ΣY (suma de los índices). Utilizando la simbología establecida, se expresa así:

$$\bar{x} = \frac{\Sigma XY}{\Sigma Y} \dots\dots\dots (2)$$

aplicando la fórmula número 2, tenemos:

$$\bar{X} = \frac{3403.155}{76.9} = 44.2543$$

es decir, que aproximadamente, a las 44 horas 15 minutos existe el máximo número de metafases.

Además de calcular la media aritmética cuyo significado biológico ya se explicó, necesitaremos, para aplicar las pruebas de significación citadas en el inciso (f) (página 9), una estimación de la medida de dispersión de los diferentes períodos de observación, con respecto a \bar{x} . Esta medida de dispersión se denomina desviación estándar y representamos con la letra (S); su valor se obtiene restando a $\sum YX^2$ el cociente $\left[\frac{(\sum XY)^2}{\sum Y} \right]$, esto es:

$$\sum YX^2 - \frac{(\sum XY)^2}{\sum Y} \dots\dots\dots (3)$$

cantidad que recibe el nombre de "suma de cuadrados" y que representaremos con la abreviatura SC.

$$SC = 153480.1982 - 150604.2126 = 2875.9856$$

Dividiendo la fórmula número 3 ó SC entre $\sum Y$, obtenemos la varianza representada con la letra S^2

$$S^2 = \frac{SC}{\sum Y} \dots\dots\dots (4)$$

substituyendo en la fórmula número 4, tenemos:

$$s^2 = \frac{2875.9156}{76.9} = 37.399$$

Por último, la desviación estándar ó S, es la raíz cuadrada de la varianza s^2

$$S = \sqrt{s^2} \quad \dots\dots\dots (5)$$

en consecuencia

$$S = \sqrt{37.399} = 6.1154$$

Para poder establecer comparaciones en relación con el grado de variabilidad entre los fenómenos analizados, es necesario, obtener, además de una medida de dispersión en valores absolutos (como es la desviación estándar), una medida de dispersión en términos de valores relativos o porcentuales. Esta medida de variabilidad relativa se llama coeficiente de variabilidad y se representa con la letra V; su cálculo se logra multiplicando la desviación estándar por 100 y dividiendo el producto entre la media aritmética.

$$V = \frac{S \times 100}{\bar{x}} \quad \dots\dots\dots (6)$$

aplicando la fórmula número 6, tenemos:

$$V = \frac{6.11 \times 100}{44.2543}$$

es decir, el porcentaje de variabilidad del fenómeno sin

fitehemaglutinina en relación a su media aritmética es de 13.8%.

Con las estimaciones de \bar{x} (media aritmética), S (desviación estándar), V (coeficiente de variabilidad), concluimos el primer paso citado en el inciso (a) (página 8). Ahora procedemos a establecer los intervalos de confianza señalados en el inciso (b). Para el cálculo nos fijaremos previamente, el 95% de seguridad, el límite aceptado unánimemente en trabajos de investigación biológica. El error estándar de la media aritmética está dado por la fórmula:

$$ES\bar{X} = \frac{S}{\sqrt{\sum Y}} \dots\dots\dots (7)$$

dándole valores numéricos a las literales, tenemos:

$$ESX = \frac{6.11}{76.9} = 0.7$$

como hemos elegido el nivel de 95% de seguridad, multiplicamos $ES\bar{X}$ por 2

$$2ES\bar{X} = 2 \times 0.7 = 1.4$$

entonces el intervalo de confianza para \bar{X} es:

$$\bar{X} = 2 ES\bar{X} = 44.2543 \pm 1.4$$

que nos da un intervalo cuyo límite inferior es:

$$\bar{X} = 2ES\bar{X} = 44.2543 - 1.4 = 42.8543$$



y el límite superior

$$\bar{X} + 2ES\bar{X} = 44.2543 + 1.4 + 45.6543$$

En forma análoga, calculamos el error estándar de la desviación estándar dado por la relación:

$$ESs = \frac{S}{\sqrt{2 \Sigma Y}} \dots\dots\dots (8)$$

Las fórmulas números 7 y 8 pueden prestarse a confusión. Sin embargo, la diferencia estriba en el denominador, mientras que para $ES\bar{X}$ es la raíz cuadrada de ΣY , para ESs es la raíz cuadrada del duplo de ΣY .

Substituyendo en la relación número 8

$$ESs = \frac{6.11}{\sqrt{2 \times 76.9}} = \frac{6.11}{12.4} = 0.4$$

pero como seleccionamos el nivel del 95%, tenemos:

$$2 ESs = 2 \times 0.4 = 0.8$$

por lo tanto, el intervalo de confianza para la desviación estándar es:

$$S \pm 2 ESs = 6.11 \pm 0.8$$

cuya interpretación biológica es la misma que la de $ES\bar{X}$.

Una vez calculados los intervalos para la media y desviación estándar, es decir, el error estándar de la media y de la desviación estándar, respectivamente, procedemos

primero a calcular e interpolar la curva teórica del fenómeno. La relación existente entre la hora de observación (x) y la frecuencia de las células en metafase, expresadas por el índice mitótico (IM) es la siguiente:

$$f(x) = \frac{N}{S\sqrt{2\pi}} e^{-\frac{1}{2} \left(\frac{X - \bar{X}}{S} \right)^2} \dots\dots\dots (9)$$

donde \bar{x} es la media aritmética, S la desviación estándar, $\pi = 3.1416$ es una relación de circunferencia-diámetro y $e = 2.7182$, es la base de los logaritmos neperianos.

El empleo de esta fórmula ha sido considerablemente simplificado. Existen tablas que contienen las ordenadas de la curva normal. Estas tablas indican la altura de una ordenada correspondiente a la curva normal: esta ordenada está determinada por la distancia existente entre la media aritmética y el punto que se desea conocer, expresado como un porcentaje de la ordenada máxima. La distancia de la media aritmética se expresa en términos de la desviación estándar, como sigue:

$$\frac{(X - \bar{X})}{S} \dots\dots\dots (10)$$

En el cuadro número 4, columna 1, están las horas de observación. En la columna número 2 se restó algebraicamente a las horas de observación la media aritmética. En la columna

número 3, se dividió esta diferencia entre la desviación estándar, obteniéndose la fórmula número 10 ó distancia de la media aritmética a un punto deseado en términos de la desviación estándar, (ver apéndice A).

Para calcular la frecuencia teórica de la curva normal elaboramos el cuadro número 5 (ver apéndice A). En este cuadro en el que la columna 1, contiene las desviaciones; columna 2, la altura relativa de las ordenadas. Por ejemplo, para la primera desviación de -1.48, las dos primeras cifras omitiendo el signo, es decir, 1 y 4, se buscan en la columna titulada $\frac{x}{\sigma}$ de las tablas de ordenadas y la tercera cifra, es decir 8, en la columna 0.08. El número localizado en el cruce de la hilera 1.4 y la columna 0.08, igual a 0.3354, corresponde a la altura relativa de la ordenada del punto que analizamos, de este modo se obtiene el resto de la columna número 2.

Para obtener la columna 3, primero determinamos la relación

$$C \left(\frac{N}{S} \right) \dots\dots\dots (11)$$

donde N es la suma de los índices de metafase ó $\sum Y$, S es la desviación estándar y C es el tamaño del intervalo.

Substituyendo en la relación número 11, tenemos:

$$C \frac{N}{S} = 1.35 \left(\frac{76.9}{6.11} \right) = 16.98$$

este cociente se multiplica por cada una de las alturas

relativas de las ordenadas, o sea, multiplicamos cada uno de los valores de la columna 2 por el resultado de la fórmula número 11. Por ejemplo, la ordenada relativa 0.3344 se multiplica por 16.98, obteniéndose la ordenada teórica de 5.67. De este modo se calcula el resto de la columna 3.

La diferencia existente entre la suma de los índices teóricos (76.54) y la suma de los índices observados (76.90) es de 0.36, lo cual indica un alto grado de exactitud en nuestros cálculos.

Con objeto de representar gráficamente el fenómeno, lo calizamos cada par de datos en un sistema de coordenadas cartesianas. Para ello trazamos dos líneas perpendiculares, en la horizontal o eje de las abscisas, anotamos las horas de observación y en la vertical o eje de las ordenadas anotamos los índices mitóticos. La localización del primer par de datos en este sistema de coordenadas se realizan trazando perpendiculares al punto 35.15 en el eje de las abscisas y al 5.67 en el eje de las ordenadas, prolongamos estas perpendiculares y en el cruce de ambas queda ubicado el punto.

Así graficamos el resto de la información y unimos los puntos con una línea continua, obteniendo una distribución normal cuya fórmula figura en el ángulo superior derecho de la gráfica (ver gráfica. Apéndice B).

Para saber hasta que punto los índices mitóticos se

distribuyen normalmente y en consecuencia, conocer el grado de confiabilidad de toda la información matemática, basada en el supuesto formulado en la página 9, aplicamos la χ^2 (ji cuadrada) para probar la "bondad de ajuste" entre la distribución del fenómeno observado y el teórico. Para tal fin, procedemos a elaborar el cuadro número 6, (ver apéndice A), cuya columna 1, contiene los índices mitóticos observados; la columna número 2, los índices teóricos calculados mediante la fórmula número 9; la columna número 3, el cuadrado de la diferencia de los índices reales observados y los teóricos; y, finalmente, en la columna 4, el cociente que resulta de dividir el cuadrado de la diferencia de lo observado y lo teórico entre su correspondiente frecuencia teórica; la suma de esta última columna es el valor de la χ^2 y su fórmula es:

$$\chi^2 = \sum \left[\frac{(IM_o - IM_t)^2}{IM_t} \right] \dots \dots \dots (12)$$

donde los subíndices "o" y "t" se asocian a los índices mitóticos observados y esperados, respectivamente.

Substituyendo en la fórmula número 12, tenemos:

$\chi^2 = 8.31$. Además del valor de la χ^2 , necesitamos obtener el número de grados de libertad cuya fórmula es:

$$(C-1)(h-1) \dots \dots \dots (13)$$

en donde C es el número de columnas y h el número de hileras. En nuestro cálculo hemos utilizado dos columnas, una correspondiente a la columna teórica y la otra a la fre_

cuencia observada; en tanto que, hemos empleado seis hileras, es decir seis períodos de observación, y por ello tenemos:

$$(2 - 1) \quad 6 - 1) = 5$$

grados de libertad. Con estos valores consultamos la tabla de distribución de la X^2 y en el punto de cruce de la hilera 5 (número de grados de libertad) y la columna 0.05 (probabilidad de error) encontramos la cifra 11.07, que es mayor a la obtenida por nosotros de 8.31; en consecuencia, las discrepancias existentes entre los índices mitóticos observados y los teóricos no son significativos, es decir, los índices se distribuyen normalmente, pues están sometidos a la función expresada por la fórmula número 9 y por lo tanto, todos los parámetros calculados tienen la máxima probabilidad de encontrarse situados entre las mejores estimaciones estadísticas.

Esta secuencia descrita en párrafos anteriores, es la misma que se aplicó en la investigación con fitohemaglutinina. Por ello limitamos nuestra exposición a los resultados obtenidos.

Basándonos en el cuadro número 2, que contiene los índices de metafases en las diferentes horas de observación, construimos el cuadro número 7, cuya última hilera contiene los totales necesarios para calcular los diversos parámetros, (ver apéndice A).

Estos parámetros son:

a) Media aritmética:

$$\bar{X} = \frac{2276.792}{84.607} = 26.90$$

b) Suma de cuadrados:

$$SC = 75709.11 - \frac{(2276.79)^2}{84.61} = 14442.45$$

c) Varianza:

$$s^2 = \frac{14442.45}{84.61} = 17.04$$

d) Desviación estándar:

$$s = \sqrt{17.04} = 4.12$$

e) Coeficiente de variabilidad:

$$V = \frac{4.12 \times 100}{26.90} = 15.31$$

f) Error estándar de la media aritmética:

$$ES\bar{X} = \frac{4.12}{84.61} = .45$$

y los límites fiduciaros del 95% para la media aritmética son de:

$$26.90 \pm 0.09$$

g) El error estándar de la desviación estándar:

$$ESs = \frac{4.12}{13.02} = 0.44$$

consecuentemente, sus límites fiduciaros al 95% son:

$$4.12 \pm 0.88$$

Para ilustrar la curva teórica del fenómeno, construimos el cuadro número 8, cuya última columna contiene las frecuencias teóricas. (Ver apéndice A).

La conexión del valor de la χ^2 se obtiene multiplicán_dola por el factor de 0.335, debido a que está fuertemen_ te influída por el agrupamiento de los intervalos, como puede observarse en el cuadro número 9, (ver apéndice A).

Para aplicar la prueba de la χ^2 , se elaboró el cuadro número 9, cuyo valor fué de $\chi^2 = 42.62$. La χ^2 corregida es igual a 1.4277, (ver apéndice A).

$\chi^2_5 = 42.62$, χ^2 (corregida) = $42.62 \times .0335 = 1.4277$ por lo que concluimos que la diferencia entre lo real y lo esperado no es significativo.

Antes de continuar, haremos un breve resumen del análi_sis estadístico de los datos. Hasta aquí, hemos cumplido con la primera fase; es decir, estimando los parámetros re_presentativos de cada fenómeno, eliminamos los errores ex_perimentales mediante el ajuste de la curva teórica y pro_bamos el grado de concordancia obtenido en dicho ajuste. Todo esto constituye una fase descriptiva de los fenómenos y estamos preparados para iniciar la segunda etapa del aná_lisis estadístico o fase de diferenciación.

El planteamiento básico del problema es el siguiente: por una parte existe una hipótesis denominada "nula" que establece que la diferencia existente entre las medias arit_méticas del fenómeno sin fitohemaglutinina (A) y con fitohe_maglutinina (B) no es significativo, y ambas medias son iguales, esta hipótesis se representa así:

$$H_0 = \bar{X}_A = \bar{X}_B$$

Por otra parte, la hipótesis alterna establece que la diferencia entre ambas medias es significativa, y por ello, son diferentes; dicha hipótesis se designa como:

$$H_0 = \bar{X}_A \neq \bar{X}_B$$

El procedimiento estadístico para aceptar o rechazar la "hipótesis nula" es conocida con el nombre de prueba "t" (student) y su fórmula es:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_w \sqrt{\frac{1}{Y_1} + \frac{1}{Y_2}}} \dots\dots\dots (14)$$

en donde S_w es una desviación estándar promedio y cuya ponderación se logra

$$S_w = \sqrt{\frac{SC_1 + SC_2}{\sum Y_1 + \sum Y_2}} \dots\dots\dots (15)$$

substituyendo en la fórmula número 15, tenemos:

$$S_w = \sqrt{\frac{2875.9856 + 14442.45}{76.9 + 84.60}} = 10.305$$

empleando este valor en la fórmula 14, obtenemos:

$$t = \frac{44.2543 - 2690}{10.15 \sqrt{\frac{1}{76.9} + \frac{1}{84.60}}} = 10.98$$

a la prueba "t" se le asocia el siguiente número de gra_

dos de libertad

$$\sum y_1 + \sum y_2 - 2$$

..... (16)

Dándole valores numéricos a la fórmula 17, tenemos:

$$76.9 + 84.60 - 2 = 159.5$$

grados de libertad. Consultando la tabla de distribución "t", en la intersección de la hilera 150 (grados de libertad) y la columna 0.05 (probabilidad de error elegida), está el número 1.98, notablemente inferior del resultado de la prueba "t" calculada por nosotros. Si repetimos esto mismo, pero ahora siendo más estrictos y eligiendo una probabilidad de 0.01, con los mismos 150 grados de libertad, encontramos el valor de 2.60, que todavía es mucho menor que el encontrado en nuestro estudio.

La aplicación de la prueba "t" al problema, nos informa que existe una probabilidad muy alta del 99% de que ambos fenómenos discrepan notablemente. En otras palabras, desde el punto de vista estadístico, nos vemos obligados a rechazar la "hipótesis nula"

$$H_0 = \bar{X}_A = \bar{X}_B$$

y aceptar la "hipótesis alterna",

$$H_0 = \bar{X}_A \neq \bar{X}_B$$

que establece que el período de observación (donde se en_

cuenta el mayor número de metafases), no es el mismo en los dos fenómenos observados y por lo contrario se alejan notablemente.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

4

El análisis estadístico expuesto en páginas anteriores, demuestra que la distribución de los índices mitóticos observados en los diferentes tiempos de regeneración analizados, se distribuyen de acuerdo con la ecuación que expresa la función de la distribución normal señalada en la página 17. Por ésto, las constantes biométricas utilizadas para la comparación de los resultados obtenidos en los grupos experimentales con y sin fitohemaglutinina, son la media aritmética y la desviación estándar, cuyo significado biológico, en esta tesis, quedó expuesto en la página 8 inciso (a). En el caso del grupo control, en el cual no se utilizó P.H.A., el período donde se obtiene el máximo índice mitótico, fué de 44.15 horas, en tanto que, el mismo período óptimo con P.H.A. fué de 26.54 horas. Comparando ambos resultados vemos que existe un desplazamiento de la media aritmética del grupo tratado, que reduce en 17 horas el tiempo de regeneración.

El siguiente planteamiento estadístico considera la significación de este desplazamiento en términos probabilísticos: ¿esta discrepancia de 17 horas es debida a fluctuaciones de muestreo o se origina en el efecto producido por la P.H.A.? La inferencia estadística concluye que la

diferencia en ambos grupos no se puede justificar argumentando fluctuaciones en el muestreo, sino aceptando un efecto real de la P.H.A. La P.H.A., por tanto, reduce el tiempo de regeneración en la planaria Dugesia dorotocephala. Las células del blastema de la planaria son influenciadas por el efecto de la P.H.A. utilizada. La regeneración de la planaria queda incluida dentro de los fenómenos que son activados por la P.H.A.

RESUMEN

5

El propósito de esta investigación fue el análisis de la acción de la fitohemaglutinina (P.H.A.) en los neoblastos del blastema producidos en la regeneración cuando se realiza un corte transversal en la zona localizada entre la faringe y las aurículas de las planarias.

El análisis de los datos recolectados en la investigación demuestra que la fitohemaglutinina reduce en un 60% el tiempo de regeneración de la planaria. Este resultado incorpora a la planaria en el grupo de organismos en los que la P.H.A. ejerce un efecto mitogénico.

Sin embargo, considero importante mencionar que dentro de la bibliografía consultada, en ningún caso se demuestra el efecto mitogénico de la P.H.A. como en el presente, en donde queda claramente establecida dicha influencia (ver gráfica apéndice B).

BIBLIOGRAFIA

1. Agrell, I.P.S. (1966a). Phytohaemagglutinin as a mitotic stimulator on free-living Amoebae. Exp. Cell. Res. 42, p. 403-406.
2. Agrell, I.P.S. (1966b). The mitogenetic action of phosphate and phytohaemagglutinin on free living Amoeba. Exp. Cell. Res. 43, 691-694.
3. Arkin H., & Colton R. R. 1962. Tables for statisticians. p. 115.
4. Benazzi M. 1938. Ricerche sulla riproduzione delle Planarie tricladi paludicole con particolare riguardo alla moltiplicazione asessuale. Att. R. Acc. Naz. Lincei. Serie VI. Vol. VI. Fascicolo II.
5. Benazzi M. e Pochini N. 1959. Alcune osservazioni citologiche sulla planaria Dendrocoelum lacteum. Vol. 26, Fasc. II. p. 435-443. Boll. di Zool.
6. Benazzi, M. 1966. Cariologia della planaria americana Dugesia dorotocephala. Acc.Naz. Lincei serie VIII. Fasc. 6.
7. Benazzi M. 1967. Nuovi dati sul differenziamento citologico e genetico di planarie delle isole Tirreniche. Atti. R. Acc. Naz. Lincei. Vol. 42. p. 460-472.
8. Bird G.W.G. 1953. Cold agglutinins in Glycine soja. Current Sci. Vol. 22. p. 273.

9. Cazal M. & Lalaurie M. 1952. Recherches sur quelques phytoagglutinins spécifiques des groupes sanguins. ABO. Acta Haemat. Vol. 8 p. 73.
10. Boyd W. C. 1950. Hemagglutinating substances for human cells in various Egyptian plants. J. Immunol., 65. p. 281.
11. Dubovoy R. C. y Cols. 1966. Investigación de fitohemagglutininas en algunas criptógamas. Anales del Instituto de Biología. Tomo XXXVII. p. 9-39.
12. Grasée P. P. 1938. Traité de Zoologie. Tome IV. Masson & C^{ie} p. 87-95.
13. Jenkins M. M. 1966. Note on stalk formation in cocoons of *Dugesia dorotocephala*. Trans. Amer. Microscop. Soc. 85(1); p. 158-159.
14. Hirschhorn K., Kolodny L. R., Hashemi N., Bach F. 1963. Mitogenic action of phytohemagglutinin. The Lancet. Vol. II. p. 305-306.
15. Holland P. 1965. Haemagglutinating precipitating and lymphocyte-stimulating factors of phytohaemagglutinin. Nature, Vol. 207. p. 1397-1398.
16. Ioachin L. H. 1966. Effects of phytohaemagglutinin "in vitro" on cells other than Lymphocytes. Nature. Vol. 210. p. 919-921.
17. Naspitz K. C., Richter M. (1968). The effects of varying concentration of phytohemagglutinin and conditions of incubation on the enhanced survival of human peripheral Lymphocytes in vitro. Blood. Vol. 32. No. 1. p. 134-139.

18. Nowel C. P. 1960. Phytohemagglutinin: An initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. Can. Res. Vol. 20. p. 462-466.

19. Rigas, D. A., and Osgood E. E. 1955. Purification and properties of the Phytohemagglutinin of Phaseolus vulgaris. J. Biol. Chem. 212: 507-9.

20. Snedecor W. G. 1956. Statistical methods. The Iowa State University Press. Ames Iowa. U.S.A. 5a. Ed.

21. Villalobos P. R. 1965. Alteraciones inducidas por los rayos X en los cromosomas de las células meristemáticas de la raíz. Bol. Soc. Bot. de México 29. p. 178-183.

22. Zeck L. 1966. The effect of phytohemagglutinin on growth and DNA syntethesis of some Protozoa. Exp. Cell. Res. 44. p. 312-320.

APENDICE "A"

7

Cuadros de concentracion

CUADRO NUMERO 1. Resultados obtenidos en el experimento.

Sin fitohemaglutinina			Con fitohemaglutinina		
Horas de observación (1)	Número total de células (2)	Número de células en metafase (3)	Horas de observación (1)	Número total de células (2)	Número de células en metafase (3)
35.15	5082	29	5.00	5049	43
38.00	4824	55	15.00	3534	44
40.00	5029	68	19.30	3053	27
43.00	4074	65	24.00	4356	110
46.30	5328	43	38.00	5886	53
50.00	2372	27	45.00	4975	103
55.00	5157	57			

CUADRO NUMERO 2. Indice de metafases en las --
diversas horas de observación.

Sin fitohemaglutinina		Con fitohemaglutinina	
Horas de observación	IM	Horas de observación	IM
35.15	5.7	5.0	8.50
38.00	11.4	15.0	12.40
40.00	13.5	19.30	8.80
43.00	15.9	24.00	25.20
46.30	8.0	38.00	9.004
50.00	11.3	45.0	20.703
55.00	11.1		

CUADRO NUMERO 3. Cálculo de totales necesarios para estimar los parámetros de posición y dispersión, sin fitohemaglutinina.

Horas de observación X	Indice de metafases Y	(X ²)	(xy)	YX ²
35.15	5.7	1235.5225	200.355	7042.4782
38.00	11.4	1444.0000	433.200	16461.6000
40.00	13.5	1600.0000	540.000	21600.0000
43.00	15.9	1849.0000	683.700	29399.1000
46.30	8.0	2143.6900	370.400	17149.5200
50.00	11.3	2500.0000	565.000	28250.0000
55.00	11.1	3025.0000	610.500	33577.5000
TOTALES	76.9		3403.155	153480.1982

CUADRO NUMERO 4. Desviación de cada hora de observación con respecto a la media aritmética, sin fitohemaglutinina.

(1) \bar{x}	(2) $(x - \bar{x})$	(3) $(x - \bar{x})$
35.15	-9.10	-1.48
38.00	-6.25	-1.02
40.00	-4.25	-1.69
43.00	-1.25	-0.20
46.30	2.05	0.33
56.30	5.75	0.93
55.00	10.75	1.75

CUADRO NUMERO 5. Cálculo de las ordenadas teóricas,
sin fitohemaglutinina.

(1)	(2)	(3)
$\frac{(X-\bar{x})}{S}$	Altura de la ordenada relativa (ver tablas)	Col. 2 x $C\left(\frac{N}{S}\right)$
-1.48	0.3344	5.67
-1.02	0.5944	10.09
-0.69	0.7882	13.38
-0.20	0.9802	16.64
0.33	0.9470	16.08
0.93	0.6489	11.01
1.75	0.2163	3.67

CUADRO NUMERO 6. Cálculo de la χ^2 , sin fitohema
glutinina.

(1)	(2)	(3)	(4)
IM_o	IM_t	$(IM_o - IM_t)$	$\frac{(IM_o - IM_t)^2}{IM_t}$
5.7	5.67	0.0009	0.00
11.4	10.09	1.7161	0.17
13.5	13.38	0.0144	0.00
15.9	16.64	0.5476	0.03
8.0	16.08	65.2864	4.06
11.3	11.01	59.5984	4.05
11.1	3.67	14.68	

$$\chi^2 = 8.31$$

CUADRO NUMERO 7. Cálculo de totales con fitohemaglutinina necesarios para estimar los parámetros - de posición y dispersión.

Horas de observación X	Indice de metafases Y	(X ²)	(xy)	yx ²
5.0	8.50	25.00	42.50	212.50
15.0	12.40	225.00	186.00	2790.00
19.30	8.80	372.49	169.84	3277.91
24.0	25.20	576.00	604.80	14515.20
38.0	9.004	1444.00	342.152	12996.00
45.05.0	20.703	2025.00	931.50	41917.50
TOTALES	84.607		2276.792	75709.11

CUADRO NUMERO 8. Cálculo de las ordenadas teóricas,
con fitohemaglutinina.

Horas de observación	$\frac{X - \bar{X}}{S}$	Ordenadas relativas	Col 2 x $C\left(\frac{N}{S}\right)$
5.0	-53.15	.00017	0.0117
15.0	- 2.88	0.01581	1.0874
19.30	- 1.35	0.40202	27.6509
24.0	- .703	0.7827	53.8341
38.0	2.69	0.2683	1.8454
45.0	4.39	0.00034	0.0234

CUADRO NUMERO 9. Cálculo de la χ^2 , con fitohemaglutinina.

χ^2	IM_t	$(IM_o - IM_t)$	$\frac{(IM_o - IM_t)^2}{IM_T}$
8.5000	0.0117	28.7500	555.3825
12.4000	1.0874		
8.8000	27.6509		
25.20000	53.8341	55.7029	1298.8029
9.0040	1.8454		
20.7030	0.0234		
			$\chi^2 = 42.62$

APENDICE "B"

8

Gráfica

