

## ESTUDIO MORFOMETRICO DE LAS INTRUSIONES CITOPLASMATICAS INTRANUCLEARES EN CELULAS HeLa.

(MORPHOMETRIC STUDY OF INTRANUCLEAR CYTOPLASMIC INTRUSIONS IN  
HeLa CELLS)

por

BALBINA MORALES\*

### *Introducción.*

Las intrusiones citoplasmáticas intranucleares de las células HeLa se presentan con gran abundancia y complicación. Tratamos de esclarecer algunos de sus aspectos dinámicos y funcionales. Kleinfeld *et al.* (10) describieron estas intrusiones con el nombre de inclusiones intranucleares en observaciones realizadas sobre células del parénquima hepático humano y de rata. Tanto estos autores como Leduc y Wilson (11) las presentaban como delimitadas por una doble membrana diferenciada, continua con la membrana nuclear. Una descripción análoga fue presentada por Bernhard y Grandboulan (2). Bruni *et al.*, (3) observaron frecuentemente numerosas y profundas invaginaciones de la membrana nuclear, en sus cultivos de células HeLa sobre colágeno, al igual que Rose (12) en sus experiencias sobre células HeLa entre tiras de celofán. Bererhi y Malcani (1), estudiando la morfología de las citadas células mediante la técnica de criofractura, sorprendieron unas anfractuosidades del núcleo, delimitadas por la membrana nuclear, que contienen orgánulos citoplasmáticos. Existe también un estudio de Forteza (5) sobre cultivos viejos de linfocitos transformados por fitohemaglutinina, que se refiere al mismo tipo de deformaciones de la membrana nuclear. Una publicación de Scotto y Stralin (14) alude a la relación entre diferentes tipos de cuerpos nucleares y las profundas invaginaciones de la membrana del núcleo. En el presente trabajo las hemos denominado intrusiones citoplasmáticas intranucleares, puesto que las consideramos como el resultado de una penetración hacia el interior del territorio nuclear del material citoplasmático.

Nos hemos planteado una serie de interrogantes acerca de su función dentro de la fisiología celular. ¿Son vías de penetración de metabolitos que entran como datos en el proceso citoinformático nuclear? ¿Tienen algún importante papel en el mecanismo de la eyección de información del núcleo al citoplasma? ¿Cuál es la cau-

---

\* Departamento de biología. Facultad de veterinaria. Universidad de Córdoba, España.  
Recibido para publicación el 2-11-1979. — 1 —

sa determinante de la formación de estas intrusiones? Pensamos que un estudio profundo sobre su morfología puede ayudar a esclarecer algunos de estos interrogantes, al menos parcialmente.

### *Métodos.*

Se cultivó en medio basal de Eagle (4) suplementado con glutamina al 5 p. 100 en solución de Hank, con penicilina y estreptomycin, bicarbonato sódico al 10 por 100 de suero fetal de ternera inactivado (pH = 7,2 - 7,4). Para el subcultivo las células se desprendieron con tripsina al 0,2 p. 100, en solución de Hank a 37° C. Células cultivadas en tubos Leighton se tiñeron con hemalum-eosina. Las inclusiones para microscopía electrónica se realizaron en Durcupan A.C.M., previa inclusión en agar al 2 p. 100. Se emplearon métodos fotogramétricos y planimétricos sobre micrografías electrónicas tomadas al azar de los campos microscópicos que presentaban núcleos completos con una o más intrusiones. Estos se delimitaron en cada micrografía con una línea recta que unía los puntos de máxima curvatura de la membrana nuclear en el cráter de entrada de la invaginación. En cada caso se estudiaron: el área de sección de la célula; el área de sección del citoplasma; las áreas de sección del núcleo y de la superficie citoplasmática invaginada; los cocientes núcleo/citoplasma (N/C), área citoplásmica/área citoplasmática invaginada (C/I); área del núcleo/área citoplásmica invaginada (N/I), así como el perímetro y el índice de contorno nuclear (ICN), calculado mediante la expresión:

$$ICN = \frac{\text{perímetro nuclear}}{\text{área nuclear}} \quad (I) \quad (13)$$

Los datos obtenidos se sometieron a tratamiento biomatemático, centrando el estudio posterior en las correlaciones simples y múltiples de orden 1 (cuadros I y II).

Se montó un modelo de alambre consistente en dos aros concéntricos, representativos del área de sección del núcleo y del citoplasma, respectivamente (fig. 1) y se calcularon los valores de dichas áreas ( $A_N$  y  $A_C$ ). Manualmente se provocó una serie de deformaciones del contorno nuclear modelado (figs. 2 y 3), con el fin de estudiar su repercusión en las áreas nucleares y citoplásmicas. Tratando de representarnos las sinuosidades del recorrido de la intrusión dentro de la masa nuclear, se hizo una reconstrucción tridimensional de un núcleo, a partir de varias micrografías seriadas (fig. 4). Las figuras 5 y 6 representan los perfiles superpuestos de dichas micrografías seriadas, correspondientes a los núcleos.

### Resultados y discusión.

Observadas *in vivo* con óptica de contraste de fases, las intrusiones aparecen como una línea de mayor refringencia. Una secuencia de micrografías tomadas a intervalos de 5 minutos sobre cultivos (figs 7, 8, 9 y 10) nos ha permitido apreciar un cambio de forma en la intrusión así como variaciones en la forma y en la disposición del nucleolo respecto a la membrana nuclear. Sin embargo, las observaciones fotomicroscópicas, tanto *in vivo* como en células teñidas, no permiten diferenciar las sinuosidades del recorrido de la intrusión dentro del núcleo, tal como se aprecia al microscopio electrónico.

La microscopía electrónica revela una gran variedad de intrusiones citoplásmicas intranucleares en cuanto a forma y tamaño. Aparecen siempre delimitadas por la membrana nuclear (1,3,8,10,12). Jordano y Niño (9) hicieron una clasificación morfológica. Se presentan en disposición paralela, opuesta o imbricada (figuras 11, 12, 13). La penetración en el núcleo varía mucho de unas a otras. Un recuento realizado revela que, aproximadamente, en un 25 p. 100 son someras; en un 38,2 p. 100, penetrantes; en un 36,8 p. 100, profundas. A veces la intrusión es tan penetrante que, a cierto nivel de corte, el núcleo se ve separado en dos o más lóbulos aparentemente independientes (figs. 14 y 15). En otras ocasiones el material citoplasmático invaginado aparece aislado dentro del núcleo (fig. 16), sin comunicación visible con el citoplasma. Hemos comprobado que se trata de hendiduras muy estrechas (2), con un cráter de entrada muy angosto, en las muy profundas, y generalmente más ancho en las poco penetrantes (11) (Figs. 11, 12 y 15). En algunos campos la membrana externa de la cisterna perinuclear contacta con la membrana externa del lado contrapuesto de la intrusión (figs. 15, 17 y 18). El contenido del material citoplásmico invaginado parece muy semejante al citoplasma que rodea al núcleo (14, 17). Hemos sorprendido mitocondrias (figs. 15 y 20), tilacoides del retículo endoplásmico (figs. 12 y 21) y polirribosomas en gran abundancia (figs. 11, 15, 19 y 20). Repetidamente aparecen haces de microfilamentos en el citoplasma yuxtannuclear (figs. 12, 13 y 17), que en algunas secciones nucleares se sitúan en la embocadura de las intrusiones (figs. 17 y 20).

Las experiencias sobre el modelo de alambre proporcionaron resultados interesantes. Una deformación isoperimétrica del núcleo en el que se produce artificialmente una intrusión (fig. 2) provoca una disminución del área del núcleo evaluada en un 36,4 p. 100 del área primitiva, mientras que el área citoplásmica se incrementa en un 36,3 p. 100. Igualmente, un pequeño incremento del área del núcleo deformado ( $\Delta A_1 + \Delta A_2 = 0,35$  p. 100) (fig. 3) y, consiguientemente, de su perímetro ( $\Delta P = 0,41$  p. 100), se traduce en un incremento ( $\Delta I$ ) del 23,7 p. 100 del área de intrusión. O sea: por una parte la deformación isoperimétrica del modelo

nuclear provoca una disminución del área de sección del núcleo y un aumento del área de sección del citoplasma. Por otra un pequeño incremento del área de sección y del perímetro del núcleo se traduce en un gran incremento de la superficie invaginada.

Entre los valores obtenidos para los coeficientes de correlación lineal simple (cuadro I), nos ceñimos a los que consideramos de mayor importancia para nuestra investigación. Destacamos que el área citoplásmica invaginada (intrusiones) se incrementa de manera muy significativa cuando aumenta: el área de sección del núcleo ( $r = 0,37^{**}$ ); el área de sección de la célula ( $r = 0,39^{**}$ ); el perímetro nuclear ( $r = 0,59^{***}$ ) y, consiguientemente, el índice de contorno nuclear ( $r = 0,43^{**}$ ). Según esto, las correlaciones entre el área del núcleo y el área de intrusión ( $r = 0,37^{**}$  y  $r = 0,59^{***}$ ), obtenidas a partir de los datos de experiencias de laboratorio, coinciden con las del modelo de alambre.

En la correlación entre la superficie de las intrusiones y, respectivamente, el perímetro nuclear ( $r = 0,59^{***}$ ) y el índice de contorno nuclear ( $r = 0,43^{**}$ ) se destaca que un incremento del número y extensión de las intrusiones produce una mayor irregularidad en su contorno o sea un mayor perímetro con relación al área del núcleo. Sin embargo, el valor de  $r = 0,09$  (N.S.) refleja que no hay correlación entre el aumento del área del citoplasma y la superficie citoplásmica invaginada. A la vista de este resultado y de los obtenidos experimentalmente en el modelo descrito, podríamos deducir que la deformación del núcleo se produce con un aumento de su perímetro (deformación anisoperimétrica), y por tanto, de su área. Dicho de otro modo: sería el incremento del tamaño del núcleo con respecto al citoplasma el que provocaría la formación de intrusiones por deformación del perímetro nuclear. Por otra parte, como esta deformación del perímetro del núcleo no coincide con un aumento del citoplasma, cabría pensar que se produce mediante una atracción del núcleo sobre el citoplasma, con la consiguiente deformación de la membrana nuclear.

El aumento del área celular no afecta a la razón N/C ( $r = -0,05$ , N. S.); indicio de la constancia de este cociente. Tampoco afecta a las razones N/I y C/I ( $r = -0,11$ , N. S. y  $-0,07$ , N. S.); nuevo hecho en favor de la hipótesis de que la presencia de intrusiones supone una redistribución de materia y no una variación del volumen conjunto del protoplasma.

Por último, la correlación altamente significativa ( $r = 0,86^{***}$ ) entre índice de contorno nuclear y perímetro nuclear, revela que cuanto más irregular sea el contorno mayor valor alcanzará el ICN. Puesto que éste es un índice de deformación del contorno, el alto valor obtenido refleja la eficacia del mismo para cuantificar su irregularidad.

CUADRO 1. Correlaciones lineales simples.

	ACI	AN.	AC.	INTR.	N/C	N/I	C/I	PN.	ICN.
ACI		-0,09NS	0,75***	0,09NS	0,66***	-0,30*	0,31*	-0,29*	-0,19NS
AN.			0,59***	0,37**	0,73***	0,27*	-0,42**	0,20NS	-0,26*
AC.				0,39**	-0,05NS	-0,11NS	-0,07NS	-0,06NS	-0,29*
INTR.					0,24NS	-0,51***	-0,72***	0,59***	0,43**
N/C						0,42**	-0,40**	0,39**	-0,05NS
N/I							0,44**	-0,18NS	-0,31*
C/I								-0,56***	-0,38**
PN.									0,86***

GL = 49

P ≤ 5 P. 100 = 0'275

P ≤ 1 P. 100 = 0'368

P ≤ 1 P. 1.000 = 0'458

## MORALES, B.: INTRUSIONES CITOPLASMATICAS INTRANUCLEARES EN CELULAS HeLa

CUADRO II. Correlaciones lineales múltiples de orden 1.

GL = 47,  $p \leq 5$  p. 100 = 0,2816 ;  $p \leq 1$  p. 100 = 0,3646 $p \leq 1$  p. 1.000 = 0,4558

	ACI.	AN.	AC.	INTR.	N/C	N/I	C/I	PN	ICN
PN. ICN	0,85****	0,96****	0,88****	0,83****	0,93****	0,86****	0,84****		
PN. AN.	0,18NS		0,29*	-0,02NS	0,13NS	0,26NS	-0,05NS		0,86****
PN. INTR.	0,65****	0,57****	0,67****		0,56****	0,59****	0,32*		0,48**
AN. ACI	1,00****			0,52****	0,92****	0,65****	0,62****	0,62****	0,56****
AN. INTR.	0,08NS		0,19NS		0,29*	0,28*	0,29*	0,32*	0,55****

10

AC = Sección del área celular.  
 AN = Sección del área nuclear.  
 ACI = Sección del área citoplasmática.  
 INTR = Sección del área citoplasmática invaginada (intrusiones).  
 N/C = Razón núcleo/citoplasma.  
 N/I = Razón núcleo/intrusiones.  
 C/I = Razón citoplasma intrusiones.  
 PN = Perímetro nuclear.  
 ICN = Índice de contorno nuclear.

De los coeficientes de correlación lineal múltiple de orden 1 hemos calculado los que nos parecen de mayor interés (cuadro II). Puesto que nuestra investigación trataba de averiguar si la deformación de la membrana nuclear responde a un crecimiento de la propia membrana, bien por intususcepción, bien por estiramiento elástico (deformación anisoperimétrica), o si se trata de una deformación isoperimétrica debida a una fuerza o empuje, probablemente hidrodinámico, que hundiría la membrana sin aumentar su área, la consideración del valor  $r = 0,32^*$ . (correlación entre área nuclear-área de las intrusiones/perímetro nuclear) reviste particular interés, puesto que incluye la condición de anisoperimetría. Este resultado, considerado juntamente con el coeficiente de correlación lineal simple entre área nuclear/área de las intrusiones ( $= 0,37^{**}$ ) refuerza la hipótesis de que el crecimiento de la membrana nuclear es el determinante de la formación de intrusiones. Sin embargo, este tipo de análisis no nos ha permitido dirimir entre las dos posibilidades señaladas. En favor de la segunda hipótesis se manifestaron Kleinfeld *et al.* (10), al señalar que las invaginaciones se producirían por una corriente centrípeta del material citoplásmico acompañada de un crecimiento de la membrana nuclear. Esta interpretación se refuerza al profundizar en el sentido heurístico del coeficiente de correlación lineal múltiple de orden 1 : área nuclear-intrusiones/índice de contorno nuclear ( $r = 0,55^{***}$ ). El coeficiente que discutimos traduce el hecho de que al aumentar el área nuclear se incrementa el área de las intrusiones, aún cuando se mantenga constante el índice (I), es evidente que para mantener la invariancia de ICN se requiere un incremento correspondiente del perímetro nuclear y, por consiguiente; de la superficie de la membrana del núcleo.

La interpretación de las figuras 22, 23 y 24, que corresponden respectivamente a la distribución de frecuencias de las áreas de sección de la superficie citoplásmica invaginada, y las razones N/I y C/I, indican una gran amplitud de variación y, por otra parte, una masificación de frecuencias en torno al valor modal. El primer hecho se puede interpretar de dos maneras: a) las intrusiones serían unas formaciones que comienzan, se desarrollan e involucionan, volviendo a su posición de equilibrio (11), de ahí su variabilidad numérica; b) las intrusiones permanecerían invariantes pero sus dimensiones aparentes se mostrarían como muy variables por efecto de su posición al azar dentro del plano de corte. La masificación de frecuencias en torno al valor modal reflejaría que las intrusiones muy pequeñas y las muy grandes son anormalmente infrecuentes. Esto puede indicar un crecimiento rápido de las invaginaciones. En la hipótesis dinámica cabría interpretar que el estado inicial y el final son los más transitorios, de modo que las intrusiones permanecen más tiempo en el estado en que serían más eficientes.

### *Sumario.*

Sobre células HeLa de la línea S3, suministradas por el Instituto de investigaciones citológicas de Valencia (España), se ha realizado un estudio morfométrico de las intrusiones citoplásmicas intranucleares, basándose en datos obtenidos a partir de micrografías electrónicas, por métodos gravimétricos y planimétricos. Estos datos han sido tratados bioestadísticamente y se ha realizado el estudio de las correlaciones lineales simples y múltiples de orden 1. Se han considerado las áreas de sección del citoplasma, del núcleo, de la célula y de la superficie citoplásmica invaginada (intrusiones); las razones núcleo/citoplasma; núcleo/intrusiones y citoplasma/intrusiones, así como el perímetro nuclear y el índice de contorno nuclear (ICN). La consideración de un modelo bidimensional ha reforzado los resultados del estudio. Se observa una influencia positiva del área de sección del núcleo sobre el área de sección de la superficie citoplásmica invaginada. El aumento del citoplasma no induce la deformación del perímetro nuclear ni la formación de intrusiones. Existen invaginaciones de variados tamaños y formas, y las más frecuentes son las de tamaño medio. Parecen formaciones dinámicas que se inician, crecen y regresan, y formarían parte de un mecanismo teleonómico que aumentaría la frontera núcleo-citoplásmica. Se producirían por deformación anisoperimétrica de la membrana nuclear, a causa del crecimiento y plegamiento consecutivo de ésta, con aumento del volumen del núcleo, sin que pueda dirimirse bioestadísticamente si se trata de un crecimiento elástico o de un crecimiento por intususcepción.

### *Summary.*

A morphometric study of intranuclear cytoplasmic intrusions was performed on HeLa cells of the S3 Line provided by Institute of Cytological Investigations of Valencia (Spain). The work was based on data obtained from electron micrographs by gravimetric and planimetric methods. The data were reviewed biostatistically and a study was carried out on simple and multiple linear correlations of the first order. Section areas of the cytoplasm, nucleus, cell and the surface of the invaginated cytoplasm (intrusions) were taken into consideration as well as ratios nucleus/cytoplasm, nucleus/intrusions and cytoplasm/intrusions. Finally the nuclear perimeter and the nuclear contour index (NCI) were determined. The use of a bidimensional model has reinforced the results of the study. A positive influence of the sectional area of the nucleus over the sectional area of the invaginated cytoplasmic surface was observed. An increase in cytoplasm does not alter the nuclear perimeter nor induce the formation of intrusions. The invaginations exist in various sizes and shapes, the majority being of intermediate size. They appear to be dynamic formations which originate, grow and regress, and form part of a teleonomic mechanism that increases the nuclear-cytoplasmic border. They are produced by anisoperimetric deformation of the nuclear membrane with a resultant increase in nuclear volume. A biostatistical study does not settle whether the membrane experiences an elastic growth or growth by intususception.

*Pies de las figuras.*

- Fig. 1. Modelo de alambre representativo de un área de sección celular.
- Fig. 2. El modelo correspondiente a la figura 1, en el que se ha provocado manualmente una intrusión. La deformación del núcleo es isoperimétrica ( $PN = P'N$ ).  $Ac$  = Área citoplásmica inicial.  $AN$  = Área del núcleo inicial.  $A'N$  = Área nuclear después de provocada la intrusión.  $I$  = Área de la superficie citoplásmica invaginada (intrusión).  $A_0$  = incremento del área citoplásmica.  $A_0 + I$  = Decremento del área nuclear.
- Fig. 3. El modelo correspondiente a la figura 2, en el que se ha provocado un pequeño incremento ( $\Delta A_1 + \Delta A_2$ ) del área de sección del núcleo (0,35 p. 100, respecto del área anterior).  $\Delta I$  = incremento producido en el área de intrusión como consecuencia del incremento del área nuclear. Equivale a un 23,7 p. 100 respecto del área de intrusión inicial.
- Fig. 4. Núcleo reconstruido a partir de varias microfografías electrónicas seriadas.  $\times 9.384$ .
- Figs. 5 y 6. Perfiles superpuestos de dos núcleos obtenidos a partir de microfografías seriadas. Algunas secciones presentan el núcleo separado en dos o tres lóbulos (NL).  $\times 10.591 - \times 9.384$ .
- Figs. 7, 8, 9 y 10. Secuencia obtenida sobre una célula *in vivo* con un intervalo de 5 minutos. Parece observarse un cambio de forma en las invaginaciones (Int.) de la membrana nuclear y en el nucleolo (Nu).  $\times 400$ .
- Fig. 11. Varias intrusiones en disposición paralela. Destacamos el cráter de entrada, amplio (X) para las invaginaciones poco profundas y angosto (Y) para las muy profundas. Igualmente, la acumulación de mitocondrias (Mi) a la entrada de las intrusiones.  $\times 12.905$ .
- Fig. 12. Dos intrusiones opuestas. Tilacoides del retículo endoplásmico (RE) en el material citoplásmico invaginado. Acúmulo de microfilamentos (Mf) en el citoplasma yuxtannuclear  $\times 15.645$ .
- Fig. 13. Disposición imbricada en varias intrusiones. Abundancia de microfilamentos (Mf) en el citoplasma yuxtannuclear.  $\times 16.281$ .

MORALES, B.: INTRUSIONES CITOPLASMATICAS INTRANUCLEARES EN CELULAS HeLa

- Figs. 14 y 15. Núcleos divididos en dos lóbulos (LN) como consecuencia de una intrusión perpendicular al plano de corte. En la fig. 15 se observa una mitocondria en el material citoplasmático invaginado. Se destaca la distinta apertura (X,Y) del cráter de entrada según la profundidad de la intrusión. En X contactan las dos membranas contrapuestas del espacio perinuclear.  $\times 10.786$ .  $\times 13.129$ .
- Fig. 16. Citoplasma (Ci) aparentemente aislado dentro del núcleo. Puede corresponder a la sección transversal de una intrusión en forma de dedo de guante perpendicular al plano de corte.  $\times 6.185$ .
- Fig. 17. Sección del núcleo con varias invaginaciones de la membrana nuclear. La apertura del cráter de entrada varía de unas a otras (X,Y). En X contactan las dos membranas contrapuestas de la cisterna perinuclear. Acumulación de microfilamentos (Mf) en el citoplasma yuxtannuclear y en la boca de entrada de una intrusión.  $\times 28.747$ .
- Fig. 18. Detalle del contacto de las membranas contrapuestas del espacio perinuclear, correspondiente a la fig. 17.  $\times 51.005$ .
- Fig. 19. Acumulación de mitocondrias (Mi) en el cráter de entrada de una intrusión profunda.  $\times 12.972$ .
- Fig. 20. Presencia de mitocondrias (Mi) y microfilamentos (Mf) en el cráter de entrada de una intrusión.  $\times 16.629$ .
- Fig. 21. Tilacoides del retículo endoplásmico (RE) y gran abundancia de poli-ribosomas en el material citoplásmico invaginado de estas dos intrusiones contrapuestas.  $\times 17.729$ .
- Figs. 22, 23 y 24. Histograma y polígono de frecuencias de la sección de la superficie citoplásmica invaginada (intrusiones) y de las razones núcleo/intrusiones (N/I) y citoplasma/intrusiones (C/I).

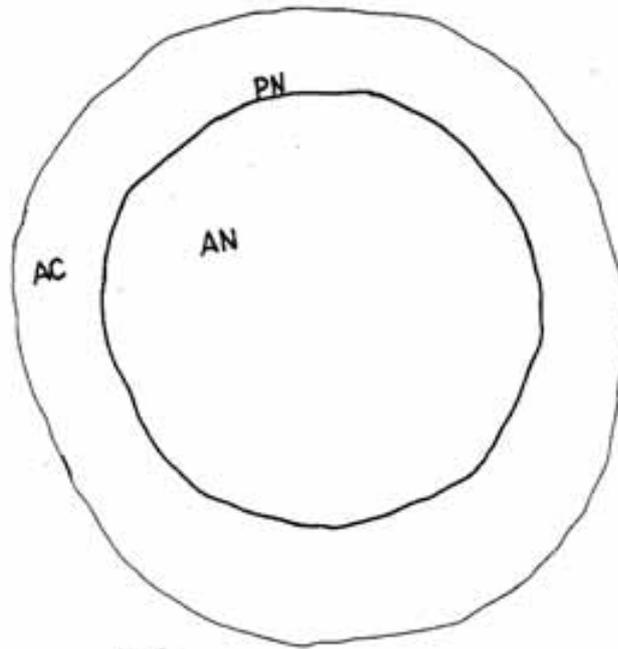


Fig. 1

AC = AREA CITOPASMATICA INICIAL  
AN = AREA NUCLEAR INICIAL  
PN = PERIMETRO NUCLEAR

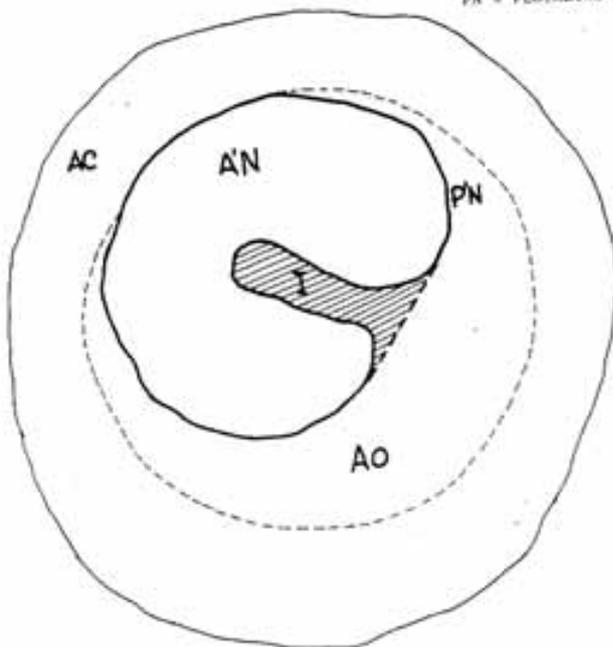


Fig. 2

P'N = PN  
A'N = AREA DEL NUCLEO DESPUES DE PROVOCADA LA INTRUSION (DEFORMACION ISOPERIMETRICA)  
A0 = AREA EN QUE DISMINUYE EL AREA NUCLEAR Y SE INCREMENTA EL AREA CITOPASMATICA  
I = AREA DE LA SUPERFICIE CITOPASMATICA INVAGINADA (INTRUSION)

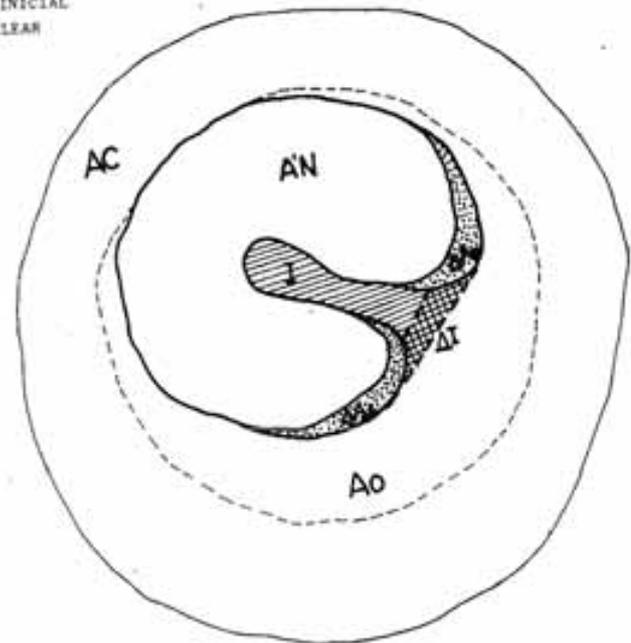
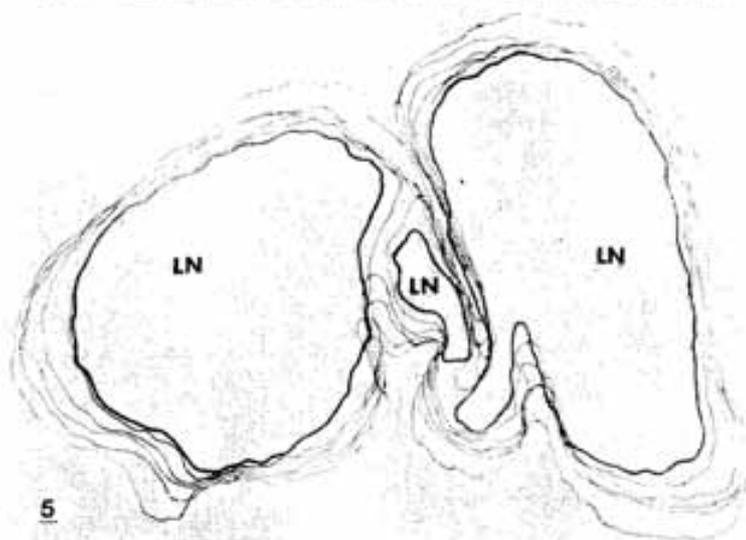
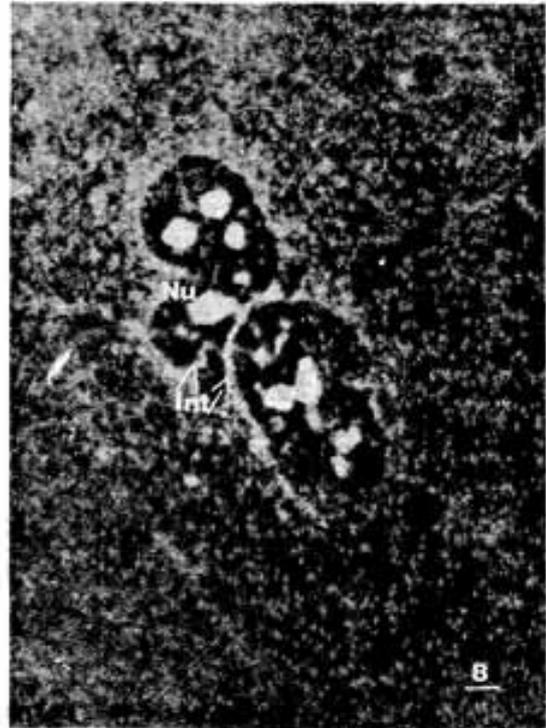
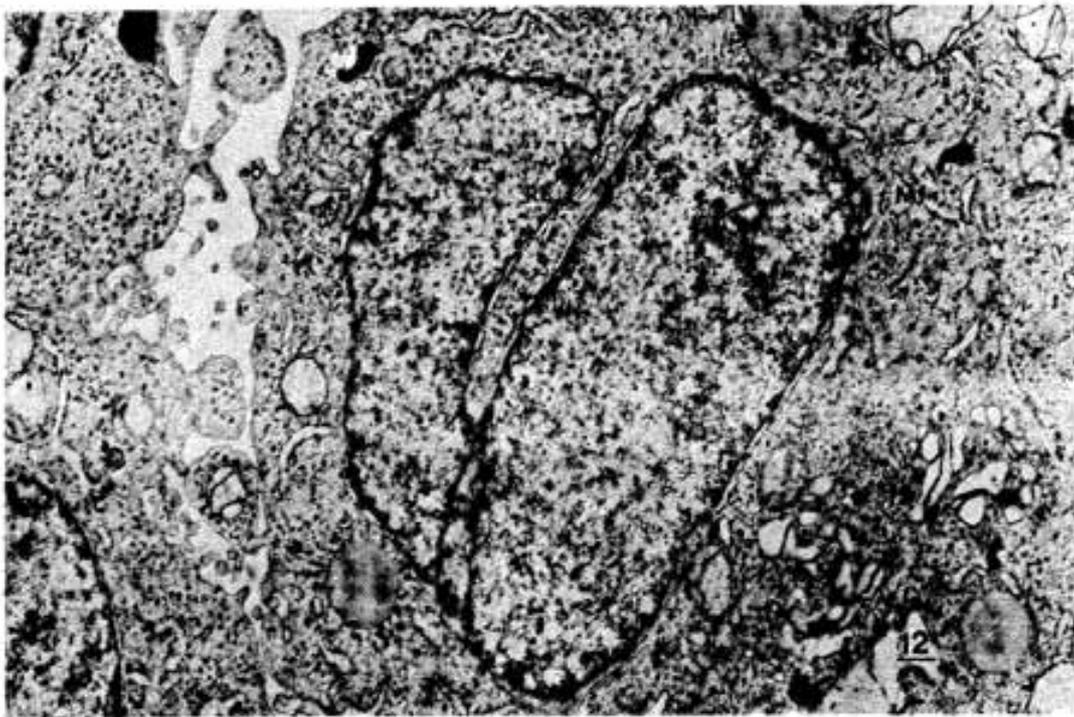
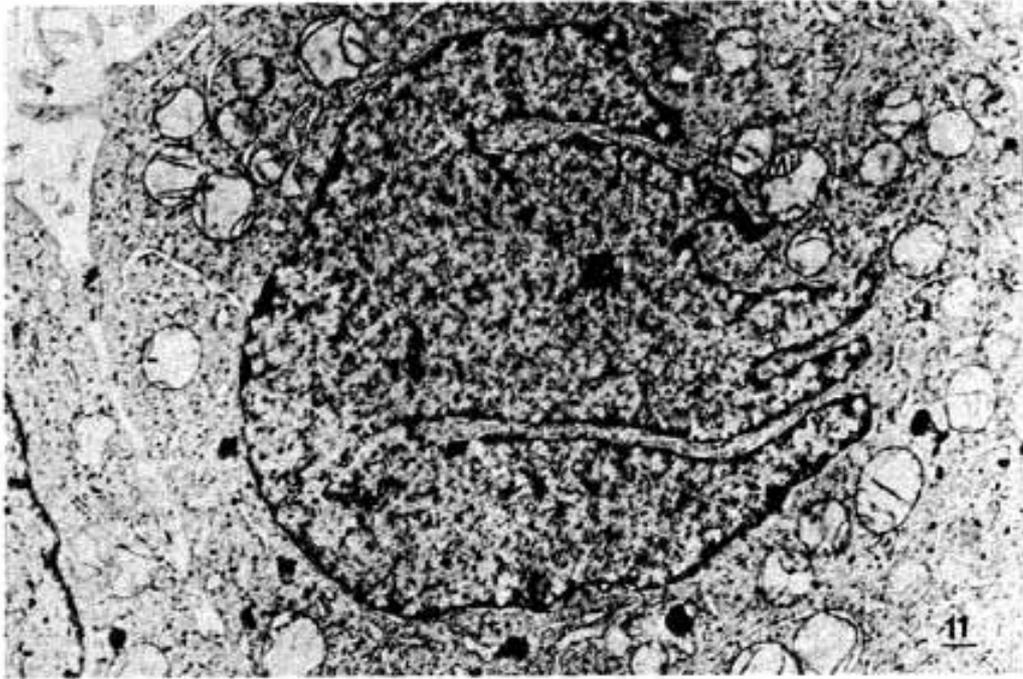


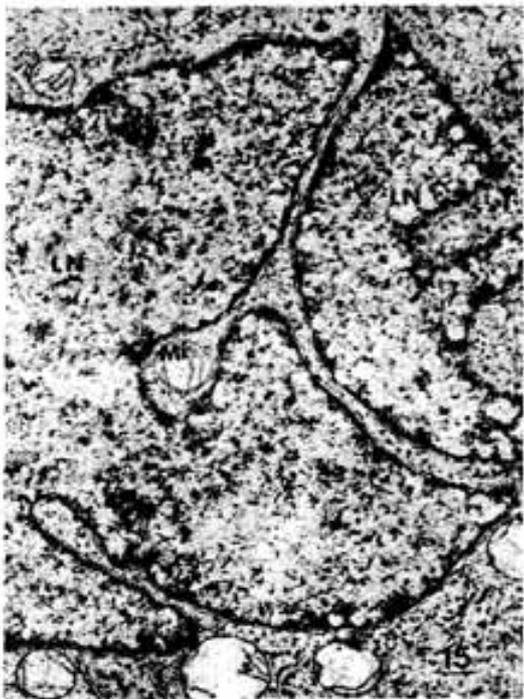
Fig. 3

$\Delta A_1$  y  $\Delta A_2$  = INCREMENTO PROVOCADO EXPERIMENTALMENTE EN EL AREA DEL NUCLEO  
 $\Delta I$  = INCREMENTO PRODUCIDO EN EL AREA DE INTRUSION COMO CONSECUENCIA DEL INCREMENTO DEL AREA DEL NUCLEO

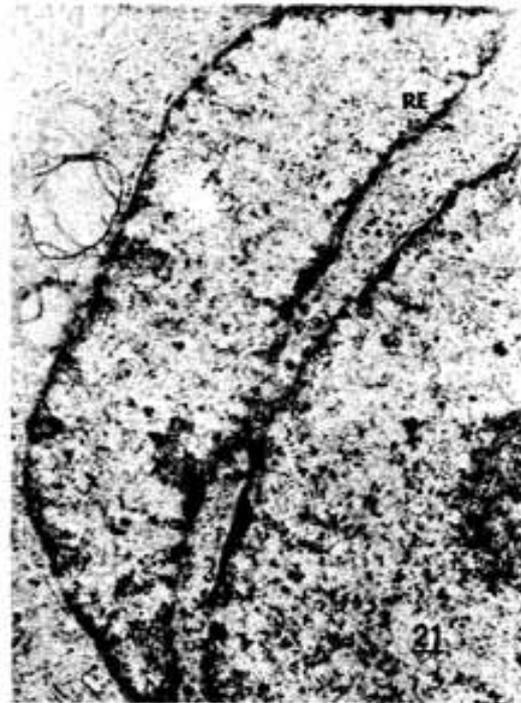
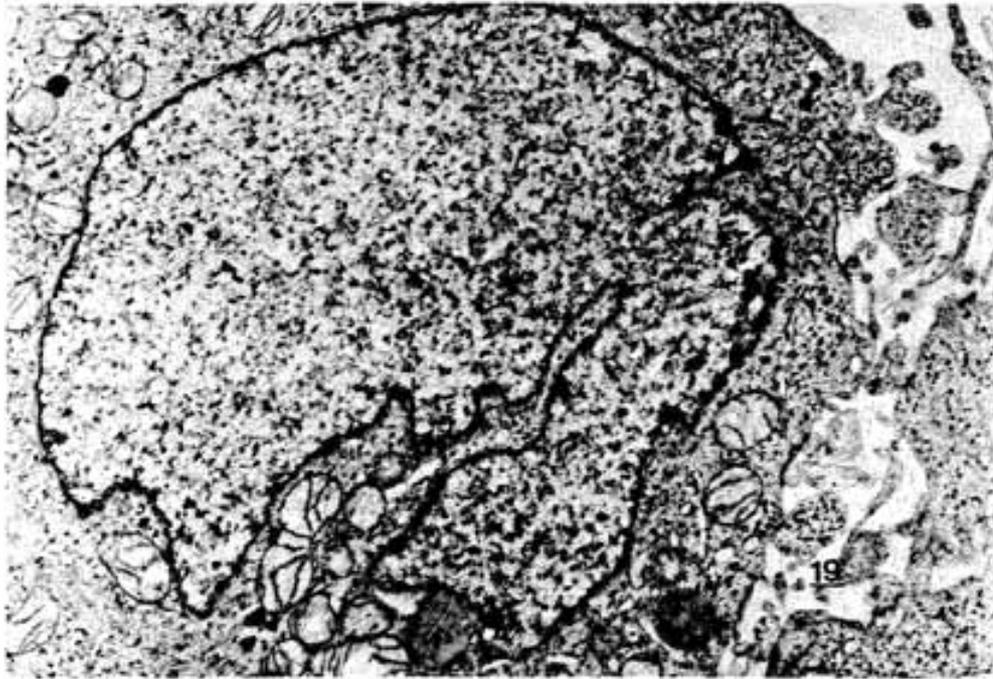












MORALES, B.: INTRUSIONES CITOPLASMATICAS INTRANUCLEARES EN CELULAS HeLa

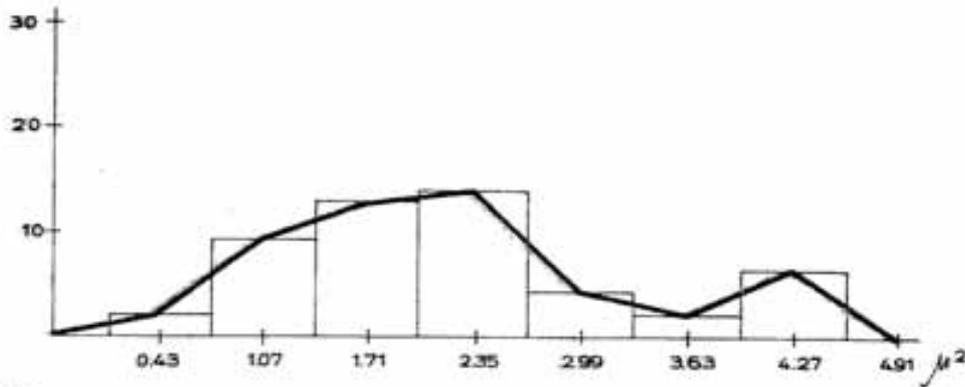


Fig-22 HISTOGRAMA Y POLIGONO DE FRECUENCIAS DE LAS AREAS DE SECCION DE LA SUPERFICIE CITOPLASMATICA INVAGINADA (INTRUSIONES)

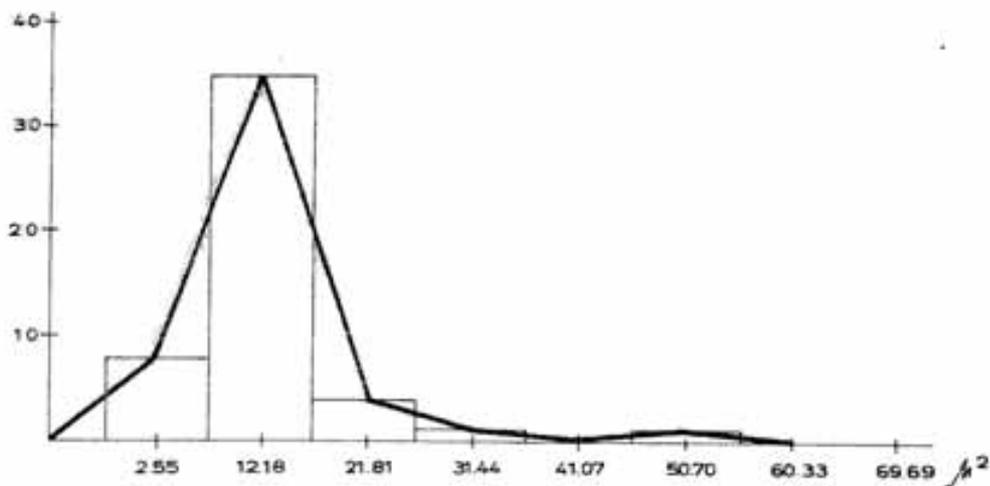


Fig-23 HISTOGRAMA Y POLIGONO DE FRECUENCIAS DE LA RAZON N/I

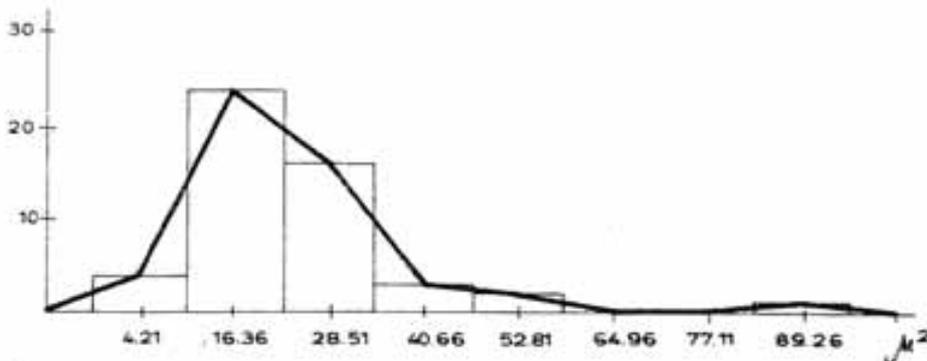


Fig-24 HISTOGRAMA Y POLIGONO DE FRECUENCIAS DE LA RAZON C/I

*Bibliografía.*

1. Bererhi, A. and K. Malkani, 1970.--*J. Ultras. Res.* 32: 23-31.
2. Bernhard, W. and N. Grandboulan, 1963.--*Exptl. Cell Res. Suppl.* 9: 19-53.
3. Bruni, C., K. M. Gey and M. Svtelis, 1961.--*Bull. Johns Hopkins Hosp.* 160: 1771.
4. Eagle, H., 1955.--*Science*, 122: 43-46.
5. Forteza, G., 1969.--*Sangre*, 14: 4.
6. Gey, G. O.; W. O. Coffman and M. T. Kubicec, 1952.--*Cancer Res.*, 12: 264.
7. Gey, G. O.; F. B. Band and M. K. Gey, 1954.--*Tex. Rep. Biol. Med.*, 12: 805-827.
8. Hoshino, M., 1961.--*Exptl. Cell. Res.*, 24: 606-609.
9. Jordano, D. and F. Niño, 1975.--XX<sup>th</sup> World. Vet. Cong. 1, p. 43.
10. Kleinfeld, R. G.; M. H. Greider and W. Frajola, 1956.--*J. Biophys. Biochem. Cytol.* 2 (4) suppl. 435.
11. Leduc, E. H. and J. W. Wilson, 1959.--*J. Biophys. Biochem. Cytol.* 6: 427.
12. Rose, G. G., 1962.--*J. Cell Biol.*, 12: 153-157.
13. Rozman, C. and H. G. Stralin, 1976.--*Sangre*, 22: 986-933.
14. Scotto, J. M. and H. G. Stralin, 1976.--*J. Microsc. Biol. Cell*, 25: 233-235.
15. Sokal, R. R. and F. J. Rohlf, 1969.--*Biometry*, p. 137. Ed. Freeman and Co. San Francisco.
16. Selby, S. M. and B. Girlin (Eds.), 1965.--*Standard Mathematical Tables*. The Chemical Rubber Co.
17. Tripier, M. F.; M. Berrard and M. Toga, 1974.--*J. Microscopie*, 21: 21-30.
18. Waugh, A. E., 1952.--*Statistical Tables and Problems*. Ed. McGraw-Hill Book Company, INC, New York.