

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS



TESIS DOCTORAL

Interacción de 3H-DNA bacteriano con células de protozoos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Alejandro Herrero Molina

Madrid, 2015

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS

INTERACCION DE ³H-DNA BACTERIANO CON
CELULAS DE PROTOZOOS

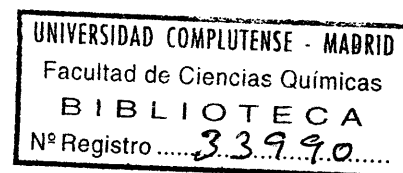
MEMORIA

que para optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas

presenta

ALEJANDRO HERRERO MOLINA

b25018061
i37435279



Madrid, 1975

**A mis padres,
por su ejemplo.**

El presente trabajo ha sido realizado en los Laboratorios del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento al Dr. Martín Municio, por su dirección, ayuda y autorizada crítica.

Asimismo al Dr. Franco, por las valiosas ideas y opiniones que de él he recibido.

El ^3H -DNA me fue proporcionado por el Grupo de Radiobiología de la Junta de Energía Nuclear. A su Jefe, el Dr. Dávila, y a sus colaboradores, les agradezco su inestimable participación, sin la cual no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

INDICE

	<u>Página</u>
I. INTRODUCCION	9
I.1. HISTORIA DE LA TRANSFORMACION GENETICA	9
I.2. PANORAMICA GENERAL Y SIGNIFICADO DE LA TRANSFORMACION GENETICA	10
I.2.1. Transformación de organismos procarióticos	11
I.2.2. Transformación de organismos eucarióticos	12
I.2.3. Transformaciones "in vitro"	12
I.2.4. Transformaciones "in vivo" de células de anima- les superiores	14
I.3. ENDOCITOSIS. MECANISMOS CELULARES DE INGESTION	16
I.3.1. Parte general	16
I.3.2. Metodología para el estudio de procesos de cito- sis	18
I.3.3. Endocitosis inducida y permanente	21
I.3.4. La superficie celular en la endocitosis	27
I.3.5. Destino intracelular de los endosomas: diges- tión celular	28
I.3.6. Influencia de la temperatura sobre la endocito- sis	31
I.3.7. Endocitosis y metabolismo energético	38
I.3.8. Ectoenzimas como receptores específicos de mem- brana	40
II. MATERIALES Y METODOS	44
II.1. REACTIVOS	44
II.2. OBTENCION DEL ³ H-DNA DE ESCHERICHIA COLI	45

II.2.1.	Crecimiento de escherichia coli	45
II.2.2.	Aislamiento y purificación del ³ H-DNA.	46
II.2.3.	Preparación de un complejo DNA-Histona	47
II.3.	CULTIVO DE PROTOZOOS	48
II.3.1.	Cultivo de Tetrahymena pyriformis	48
II.3.2.	Cultivo de Euglena gracilis	49
II.4.	EXPERIENCIAS DE INCORPORACION	50
II.4.1.	Experiencias de incorporación directa.	50
II.4.2.	Correcciones a los datos en las expe- riencias directas	51
II.4.3.	Experiencias con pulsos de ³ H-DNA de un minuto de duración	51
II.4.4.	Correcciones a los resultados de las experiencias con pulsos de 1' con ³ H- -DNA	52
II.4.5.	Tratamiento estadístico de datos	53
	II.4.5.1. Criterio de Chauvenet	
II.5.	PROCEDIMIENTO PARA EL LISADO DE LAS CELULAS ...	56
II.5.1.	Lisado de Tetrahymena pyriformis	56
II.5.2.	Lisado de Euglena gracilis	56
II.6.	CONTROL DEL TAMAÑO MOLECULAR DEL DNA INCORPORA- DO	57
II.7.	CESION DE PROTEINAS EN MEDIO NO NUTRIENTE (NaCl 0,035 M)	59
II.8.	METODOS ISOTOPICOS	60
II.8.1.	Contaje de ³ H	60
	II.8.1.1. Determinación del espectro de energías	60
	II.8.1.2. Cálculo de la eficiencia de contaje	61
II.9.	METODOS AUTORADIOGRAFICOS	62
II.9.1.	Incorporación de ³ H-DNA	62
II.9.2.	Preparación y revelado de las autorra- diografías	62
II.9.3.	Tinción y fotografías	63

III.a. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN TETRAHYMENA PYRIFORMIS , CEPA W	65
III.a.1. INCORPORACION DIRECTA DEL ³ H-DNA PRESENTE EN EL MEDIO DE INCUBACION POR CELULAS DE TETRAHYMENA PYRIFORMIS	65
III.a.1.1. Influencia de la concentración de ³ H-DNA en el medio de incubación no nutriente	65
III.a.1.2. Cinética de captura de ³ H-DNA en medios no nutrientes	68
III.a.1.3. Influencia del peso molecular del ³ H-DNA exógeno en su captura; medio no nutriente, ClNa 35 mM	75
III.a.1.4. Incorporación directa de ³ H-DNA en medio de cultivo completo	78
III.a.1.5. Estado molecular del ³ H-DNA incorporado y liberado al medio. Variabilidad con el tiempo	78
III.a.1.6. Incorporación de ³ H-DNA en un medio de cultivo definido. Efectos de ATP y GTP	80
III.a.1.7. Influencia de la temperatura de incubación, en la incorporación de ³ H-DNA exógeno. (Medio nutriente)	84
III.a.1.8. Influencia de la temperatura en la de gradación del DNA incorporado	89
III.a.2. CINETICA DE LA ASOCIACION DNA-TETRAHYMENA. PULSOS DE 1 MINUTO CON ³ H-DNA	91
III.a.2.1. Diferentes tiempos de preincubación con DNA de timo de ternera ,	92
III.a.2.2. Estado molecular del ³ H-DNA incorporado	94
III.a.2.3. Influencia de la temperatura en la recepción de ³ H-DNA	98
III.a.2.4. Influencia del tiempo de preincubación con RNA de levadura en la captura de ³ H-DNA	98

III.a.2.5. Diferentes tiempos de preincubación con un polianión sintético (poliglutámico)	101
III.a.2.6. Estado del ³ H-DNA incorporado	103
III.a.2.7. Saturación secuencial con diferentes polianiones	105
III.b. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EUGLENA GRACILIS CEPA Z	115
III.b.1. INCORPORACION DIRECTA DE ³ H-DNA PRESENTE EN EL MEDIO DE INCUBACION POR CELULAS DE EUGLENA GRACILIS	115
III.b.1.1. Influencia de la concentración de ³ H-DNA en el medio de incubación no nutriente	116
III.b.1.2. Influencia de la concentración de iones sodio en el medio	116
III.b.1.3. Cinética de captura de ³ H-DNA en medios no nutrientes	119
III.b.1.4. Cinética de la asociación ³ H-DNA-Euglena en medio de cultivo completo pH 7 (pulsos de 1 minuto)	125
III.b.1.5. Influencia del peso molecular del ³ H-DNA en su incorporación por euglena. Medios no nutrientes.....	127
III.b.1.6. Influencia de la temperatura en medios no nutrientes (NaCl, 0,035 M) ..	130
III.b.1.7. Estado molecular del ³ H-DNA incorporado y restante en el medio de incubación	132
III.b.2. CINETICA DE ASOCIACION ³ H-DNA-EUGLENA. PULSOS DE 1 MINUTO DE DURACION	148
III.b.2.1. Influencia del tiempo de preincubación con RNA de levadura, en la captura de ³ H-DNA	148

	<u>Página</u>
III.b.2.2. Influencia del tiempo de preincubación con PG en la captura de ³ H-DNA..	148
III.b.2.3. Saturación secuencial con DNA, RNA y PG	151
IV. CONCLUSIONES	153
V. BIBLIOGRAFIA	158

I. INTRODUCCION

I.1. HISTORIA DE LA TRANSFORMACION GENETICA

La Historia de la Transformación Genética comienza en los primeros años de la Segunda Guerra Mundial, con el descubrimiento del médico Alfred Griffith, a la sazón funcionario del British Ministry of Health, acerca de la transformación de *Pneumococcus* no infectivos ("rugosos") en *Pneumococcus* patógenos ("lisos"), en el seno de animales de experimentación: cuando se les inoculaba una mezcla de bacterias lisas muertas junto con bacterias rugosas vivas, éstas adquirían el carácter infectivo de las primeras. Desgraciadamente, Griffith murió antes de acertar con la interpretación correcta de su descubrimiento.

No obstante, el hecho puesto de manifiesto por Griffith, despertó la legendaria polémica acerca de qué factor sería el portador de la información genética y por tanto el responsable de la transformación -¿proteínas o ácidos nucleicos?- y sirvió de base para que otros experimentadores esclarecieran definitivamente que el DNA era el verdadero portador de la información genética.

En 1941, dos investigadores del New York's Rockefeller Institute, M.H. Dawson y J.L. Alloway, obtuvieron de nuevo los resultados de Griffith, utilizando un homogeneizado de bacterias lisas, como agente transformante de bacterias rugosas en presencia de suero de conejo anti-bacterias rugosas; de esta forma sólo habrían podido crecer aquellos *Pneumococcus* rugosos que hubieran sido *transformados* a la forma infecciosa, como en efecto ocurrió.

Tras estos experimentos preliminares, los hechos ya estaban lo sufi-

cientemente delineados para que en 1944 Oswald T. Avery, Colin M. McLeod y Maclyn McCarty, decidieran proceder al análisis sistemático del fenómeno de transformación; mediante un fraccionamiento celular convencional, demostraron que el ácido desoxirribonucleico era el único agente capaz de llevar a cabo la transformación en los organismos por ellos estudiados.

En 1945, *William M. Hotchkiss*, identificó los cuatro nucleótidos integrantes del DNA en el fluido transformante y propuso, por primera vez, *que la integración de un DNA exógeno en la información genética del organismo receptor, sería la causa de los cambios genéticos observados.*

La hipótesis de Hotchkiss, fue demostrada años más tarde en los laboratorios de Cold Spring Harbor por Alfred Hershey y Martha Chase, utilizando DNA de fago marcado con ^{32}P y bacterias receptoras sin marcaje: El DNA del fago, aparecía *integrado* en el DNA de la bacteria receptora.

I.2. PANORAMICA GENERAL Y SIGNIFICADO DE LA TRANSFORMACION GENETICA

Desde la experiencia de Hershey y Chase, el interés por los fenómenos de Transformación Genética se ha venido intensificando día tras día, tanto en organismos unicelulares (pro y eucariontes), como en organismos superiores; en consecuencia se han desarrollado estudios sobre algunos problemas teóricos y prácticos de la Biología Celular, relacionados con los distintos estadios que conducen al logro de la Transformación Genética, que supone la concatenación de varios *procesos independientes* con diferentes mecanismos citológicos y bioquímicos implicados en cada uno de ellos:

- a) *Recepción* (captura) del DNA exógeno transformante, en la envoltura de la célula huésped.
- b) *Penetración* del DNA transformante por los mecanismos endocitóticos peculiares del huésped.
- c) *Metabolismo del DNA ingerido*; en su caso, *integración* de fragmentos con información genética específica, en el sistema genético del receptor.
- d) *Expresión Genética* de la información exógena recibida.

e) *Transmisión* a la descendencia de las características genéticas adquiridas.

Los cinco procesos mencionados presentan diferentes modalidades en dependencia de la *naturaleza de las células receptoras* -procarióticas o eucarióticas- reflejo de las profundas diferencias fisiológicas y bioquímicas que separan a ambos tipos de organismos.

Los estudios realizados en cada uno de los citados aspectos han contribuido al conocimiento de fenómenos tales como la *recombinación génica* (Hotchkiss y Gabor 1970), la *diferenciación celular* (Ottolenghi Nigh tingale 1969), el *desarrollo de la infección viral abortiva* (Sarkar 1967, Spizizen, Reilly y Evans 1966) y la *corrección de taras hereditarias a nivel celular* (Merril, 1971). Queda así señalada la proyección a otros ámbitos de la Biología Celular de los estudios sobre Transformación Genética.

En la actualidad es un hecho sobradamente probado que un DNA exógeno, homólogo o heterólogo, puede penetrar en células de diverso origen, "in vivo" o "in vitro". Más problemática resulta la integración del DNA en el aparato genético de la célula -sobre todo en los organismos eucarióticos- y su eventual transcripción en proteínas fisiológicamente activas.

I.2.1. TRANSFORMACION DE ORGANISMOS PROCARIOTICOS

El DNA transformante que penetra en la célula bacteriana sólo debe atravesar la pared y membrana celulares para alcanzar su meta; la integración se produce cuando el DNA capturado alcanza el DNA del huésped en condiciones en las que ambos puedan interaccionar. Los sistemas enzimáticos bacterianos encerrados en estructuras especiales, degradan solo parcialmente el DNA homólogo incorporado (Stuy 1965; Chen y Ravin 1968) siendo más afectados los DNA donantes heterólogos y produciéndose pérdidas al medio de los componentes del DNA degradados (Lacks y Greenberg 1967). La fragmentación o la irradiación U.V. del DNA exógeno parece facilitar el ataque de las DNA-asas celulares (Setlow et al, 1968; Notani y Goodgal 1965).

Esta relativa facilidad del DNA en su camino hacia el genoma receptor ha conducido al lógico estado actual de conocimientos en torno a la Transformación Genética de las células bacterianas: se conocen en deta-

lle los *procesos de integración y transcripción de información genética exógena*, al lado de una mayor ignorancia acerca de los fenómenos de incorporación y captura de dicha información. Baste añadir aquí que en organismos procarióticos, la Transformación Genética se emplea en la actualidad de manera casi rutinaria para el estudio de su Genética, utilizándose diferentes marcadores (resistencia a drogas y requerimientos nutricionales de aminoácidos, principalmente), para el *mapeo del genoma* de los individuos objeto de estudio.

I.2.2. TRANSFORMACION DE ORGANISMOS EUCARIOTICOS

Sin embargo la situación en células eucarióticas es inversa; la mayor complejidad de la ruta del DNA hacia el genoma receptor, ha hecho que se estudien con más detenimiento los *procesos de traslocación de moléculas al medio interno celular*. Como contrapartida, los modelos de integración propuestos no descansan sobre una base experimental suficientemente firme y, en muchos casos, quedan aún por interpretar. Por otro lado, las posibilidades de lograr la transformación son menores en los organismos eucarióticos ya que el DNA ingerido debe sobrepasar los sucesivos ataques de los *sistemas enzimáticos celulares degradativos*, antes de poder penetrar en el núcleo y ejercer una acción transformante.

Los experimentos de Transformación Genética en células eucarióticas se han realizado tanto "in vivo" como "in vitro", utilizándose poblaciones de células mantenidas en cultivo u organismos completos inyectados con preparaciones de DNA de orígenes diversos. En algunos casos (Ottolenghi-Nightingale 1969) se han transformado células in vitro, con *expresión fenotípica* una vez inoculadas en los animales de que procedían.

I.2.3. TRANSFORMACIONES "IN VITRO"

Kraus (1961) sugirió que la capacidad de síntesis de la cadena β^A de la hemoglobina humana, podía ser transmitida -in vitro- a células de médula ósea de pacientes con anemia falciforme, al incubarlos con DNA extraído de la médula ósea de individuos homocigóticos para el carácter β^A de la hemoglobina. En 1962 Weisberger obtuvo el mismo tipo de resultados pero tanto en sus trabajos como en el descrito de Kraus, la falta de controles sobre la pureza del DNA usado, hace que sus conclusiones deban acogerse con relativa prudencia.

Quizás los resultados más importantes, sean los obtenidos por Szybalska y Szybalski (1962), que obtuvieron la transformación de una línea mutante de células humanas cultivadas "in vitro" deficiente en *inosinmonofosfato pirofosforilasa*, tratándolas con DNA extraído de la cepa original capaz de utilizar el monofosfato de inosina (IMP).

Uno de los ejemplos más espectaculares de transformación queda descrito en los trabajos de Ottolenghi-Nightingale (1969), con implicaciones en áreas no relacionadas con la Transformación Genética. Esta autora encontró que melanoblastos de embrión de ratón albino, cultivados en presencia de DNA extraído de cepas de ratones grises e inyectados subcutáneamente en la región cervical de ratones albinos, provocaban la aparición de células pigmentadas -sintetizadoras de melanina- en la zona de la inyección. (La síntesis de melanina se transmite en los ratones como un simple carácter mendeliano dominante y, bioquímicamente, la única enzima implicada en su síntesis es la *tirosinasa* (EC 1.10.3.1; 0-difenol: O₂, oxidorreductasa). La actividad del preparado de DNA desaparecía tratándolo con DNA-asa pancreática. Para la obtención del DNA transformante se utilizaron células de hígado, bazo, testículos, ovarios y timo de ratones grises, (órganos en los que la síntesis de melanina está ausente); puesto que la capacidad inductora de producción de tirosinasa fue siempre positiva, el experimento constituye en sí mismo una prueba en favor del postulado de la *totipotencialidad* de la información genética contenida en órganos diferenciados, capaz de codificar enzimas no presentes en esos tejidos.

En 1962, Frederic y Corin-Frederic, obtuvieron *modificaciones cromosómicas* en el cariotipo de células de pollo cultivadas "in vitro" en presencia de DNA de timo de ternera. Estas modificaciones citológicas coinciden con las encontradas por Leuchtenberg (1958) y Scaletta (1965), y es de destacar su aparición cuando se utiliza un DNA transformante con un grado de heterología muy alto respecto al de la célula receptora.

Más tarde, en 1971, Hill y Hillova describieron la captura "in vitro" de DNA de ratón por células de pollo en cultivo, con integración de aquel a los cromosomas pero sin expresar ningún cambio fenotípico.

Otros hechos significativos explicables en términos de un intercambio de fragmentos entre el DNA celular y el DNA incorporado, fueron la *restauración* de células dañadas por radiación U.V. puesta de manifiesto

to por Miletic et al. (1963) al incubar aquellas con DNA de células intactas, y la *inhibición en el crecimiento* de cultivos de fibroblastos en presencia de DNA extraído de células de tumores ascíticos, aunque no de sarcoma (Smith y Cress, 1961).

I.2.4. TRANSFORMACION "IN VIVO" DE CELULAS DE ANIMALES SUPERIORES

"In vivo", el DNA transformante *inyectado* en el organismo de experimentación deberá ser transportado por el *sistema circulatorio* correspondiente y atravesar todo el conjunto de *membranas diferenciadas* hasta llegar a sus puntos de actuación, multiplicándose los *riesgos de degradación por las nucleasas* presentes en los diferentes medios. Pese a ello, los resultados obtenidos por Ledoux, Huart et al. (1971), permiten suponer una relativa facilidad de acceso del DNA a regiones del organismo alejadas de su punto de entrada.

Bendich, Wilczok et al. (1965), han demostrado que DNA de virus de polioma o DNA transformante de Pneumococcus, inyectados intraperitonealmente en ratones, podía recuperarse en la sangre con su actividad biológica intacta, indicando así la *escasa actividad DNA-ásica de la sangre*.

La posibilidad de alterar los dispositivos genéticos celulares de forma controlada por medio de la transformación en células de animales superiores, ha dirigido la atención de numerosos investigadores hacia los aspectos prácticos del problema. Sin embargo, los estudios de integración genómica del DNA absorbido no se han desarrollado -excepción hecha de L. Ledoux y col.- en la cantidad y calidad de los efectuados con los organismos procarióticos.

La transformación de caracteres fenotípicos ha sido lograda por diversos laboratorios con distinta fortuna por lo que se refiere a su *expresión genética continuada en la descendencia* de los individuos transformados; así pues, la transformación "in vivo" de células de animales superiores, se presenta a veces con un carácter somático y epigenotípico. A su vez, la *falta de reproductibilidad* de los experimentos en muchos casos, cuestiona la verdadera integración genómica del DNA invasor -las experiencias de Ledoux son las más convincentes en este sentido-, aunque su expresión genética, siquiera transitoria, indique una resistencia a la acción degradativa de DNA-ásas sanguíneas o intracelulares.

Pioneros en el estudio de las posibilidades de transformación "in

vivo" son los trabajos de Benoy, Leroit et al. (1957), que obtuvieron modificaciones fenotípicas por transformación entre razas distintas de patos, aunque los mismos y otros autores han obtenido resultados negativos al intentar reproducir aquellas experiencias. (Benoit, Leroy et al. 1960; Svoboda y Harkova, 1959; Novikov, Cheminova et al., 1961). Con otros organismos superiores, los resultados de transformación genética han sido siempre negativos: conejo (Beatty y Billet, 1961), rata (Perry y Walker, 1958; Bearn y Kirby, 1959), gallina (Shoffner, Burger et al. 1961), pintada (Shoffner, Burger et al. 1961), ajalote (Billet, Hamilton et al. 1964), maíz (Coe y Sarkar, 1966).

La falta de conocimiento de etapas tan fundamentales como la *vía de entrada* preferente en el organismo, la *degradación* por las nucleasas celulares, el *tamaño molecular* idóneo del DNA usado, la imposibilidad de definir un *estado competente*, etc., contribuye a las contradicciones experimentales halladas, de las que puede concluirse que la obtención de cambios genéticos por DNA exógeno en organismos "in vivo" haya sido muchas veces el resultado de experiencias afortunadas más que de la aplicación rigurosa de métodos con una casuística amplia y bien comprobada.

Mencionaremos aquí la obtención de modificaciones en el color de las plumas inyectando DNA, extraído de individuos diferentes, en la vena vitelina de embriones de pollo (Martinovich, Kanazar et al. 1961); similares cambios fenotípicos han logrado Leroy, Benoit et al. (1964), inyectando en pollos *extractos nucleares* de eritrocitos de pintada.

Quizás el grupo de los insectos sea donde la transformación "in vivo" ha sido demostrada con más rigor. En *Drosophila*, se han descrito efectos mutagénicos, no específicos de ningún locus determinado, al inyectar DNA vía hemolinfa (Fahmy y Fahmy 1961, 1965) o al administrarlo vía digestiva (Gershenson 1939, 1965; Mathew, 1965). Fox y Yon (1966), demostraron cambios específicos en *Drosophila* pero los caracteres transformados muestran *disposición en mosaico*, sin lograrse cambios que afectan a la totalidad del insecto.

En *Ephestia*, Caspari y Nawa (1965) obtienen transformación en la coloración del ala, inyectando DNA en larvas. Posteriormente (Nawa y Yamada 1968), se observó que la inyección de DNA del tipo apropiado en larvas o huevos, produce cambios en la coloración de los ojos de la generación tratada y las siguientes, apuntando la posibilidad de un cambio genotípico permanente. En cualquier caso, se han encontrado unas eficien-

cias transformantes muy bajas, del orden de 10^{-3} - 10^{-4} .

Con diferentes DNA bacterianos como material exógeno, inyectado a ratones vía intravenosa o absorbido por semillas en germinación de *Arabidopsis* u *Hordeum*, Ledoux y Huart (1966), han demostrado que el DNA permanece indegradado en puntos lejanos al de entrada en el organismo. En el caso de vegetales, puede recuperarse en órganos adultos (hojas y flores), todavía no formados en el momento inicial de la captura.

La posibilidad de que el fenómeno de transformación genética sea un proceso con importancia apreciable en condiciones naturales (trabajos de Ledoux y Huart 1966, Ottolenghi-Nightingale 1969, Nawa y Yamada 1968), añade un nuevo interés a la posible introducción de cambios en el programa genético de la célula desde el medio exterior al organismo, camino distinto al clásico de mutaciones endógenas al azar del material cromosómico, y cuyas implicaciones en la consideración de cualquier teoría evolutiva son evidentes.

I.3. ENDOCITOSIS. MECANISMOS CELULARES DE INGESTION

I.3.1. PARTE GENERAL

El citoplasma está compartimentalizado en virtud de un *sistema de membranas morfológicamente similares*; dicho parecido estructural dio origen a la teoría de su *interconvertibilidad*, formulada por Wohlfarth-Bottermann (1959), así como al estudio cinético de las transformaciones habidas entre membranas topológicamente diferenciadas (Uhlrig et al. 1956). Los mecanismos de *vesiculación de membranas* en relación con la captura, transporte intracelular y eliminación del material digerido, representan un claro ejemplo de su convertibilidad.

Metschnikoff (1833) fue el primero en observar la ingestión por células de mesodermo, de partículas alimenticias de dimensiones apreciables al microscopio óptico y acuñó para este proceso el término *fagocitosis*. Posteriormente, numerosos autores han observado el mismo fenómeno en multitud de células diferentes; en consecuencia han aparecido otros términos, como *coloidopexia* (Bratinau, 1929) (captura de material coloidal), *chromopexia* (Volkonsky, 1933) (ingestión de colorantes), *atrocitosis* (Gerard y Cordier, 1934) (almacenamiento de sustancias ingeridas), *granulocitosis* (Benacerraf et al. 1955) y *fagotrofia* (Seaman, 1961) (ingestión

de partículas alimenticias por protozos mediante un aparato oral diferenciado o *citostoma*). Dichos términos expresan, desde el punto de vista de la fisiología celular, el mismo fenómeno de ingestión de material exocelular, dando cuenta al mismo tiempo de la naturaleza de la sustancia ingerida y del tamaño de la *vacuola* formada en el citoplasma. Aparte de las pequeñas variaciones morfológicas posibles, todos los procesos mencionados son idénticos al nivel de resolución brindado por el microscopio óptico.

En 1931, Lewis utilizó el término *pinocitosis*, para expresar más exactamente el proceso de ingestión de *fluido* extracelular apreciable al microscopio de contraste de fase, llevado a cabo por macrófagos y células de sarcoma. Más tarde, el mayor poder de resolución del microscopio electrónico revelaría que el contenido de las vacuolas de pinocitosis, homogéneo al microscopio óptico; era parcialmente granular, originándose de nuevo la aparición de neologismos tendentes a la mejor descripción del proceso observado. Así, aparecieron los términos *rofeocitosis* (Policard y Bessis, 1958), *micropinocitosis* (Odor, 1956) y *ultrafagocitosis* (Gosselin, 1956). De todo ello se desprende que la *diferencia entre fagocitosis y pinocitosis es principalmente un problema de resolución microscópica*, es decir, de identificación. Dentro de ambos conceptos, las diferencias cualitativas se expresan con ayuda de los términos arriba mencionados (coloidopexia, cromopexia, fagotrofia, atrocitosis, rofeocitosis, etc.), pero puesto que las expresiones -fagocitosis y pinocitosis- se usan habitualmente con diferentes significados, es preciso establecer, de acuerdo con Holter, la *identidad conceptual* entre ambos procesos que tienen, tanto a nivel morfológico como metabólico y fisiológico, un mecanismo común que consiste en la incorporación de sustancias al interior de la célula por "*desplazamiento de la membrana desde la superficie celular al interior de la célula*" (Holter, 1956).

En 1963, de Duve introdujo acertadamente los términos *endocitosis* (vesiculación de la membrana desde la superficie al interior de la célula) y *exocitosis* (vesiculación desde el interior a la superficie celular). Por analogía, Stockem (1967), propone el término *intracitosis* para describir los procesos de vesiculación ocurridos en el interior de la célula. Los tres fenómenos quedan englobados en el término *citosis*.

Los resultados de los procesos de endocitosis, son vacuolas citoplásmicas conteniendo de material extracelular envuelto en una porción de

membrana plasmática internalizada. De nuevo surge la polémica respecto a las expresiones adecuadas para designar los sistemas así creados: Strauss (1959), los denominó *fagosomas*; Novikoff (1960), consideró más apropiado el término *pinosomas* y, de acuerdo con Stockem (1967), asumiremos el término *endosomas* para designar las formaciones vacuolares aparecidas tras la endocitosis, en cualquiera de las modalidades microscópicamente distinguibles de este proceso.

El estudio de los procesos de endocitosis es importante porque explica dos fenómenos en absoluto interpretables con arreglo a la clásica teoría del transporte celular en cualquiera de sus formas (transporte activo, difusiones libre o facilitada, etc.):

a) La endocitosis posibilita el *acceso al interior de la célula a toda clase de partículas, microscópicamente diferenciadas del medio* (incluidos los iones), *sin necesidad de atravesar la membrana*. El material capturado se transporta en el citoplasma por intracitosis.

b) Determinados *receptores de la superficie celular reaccionan de manera específica* con cierta clase de sustancias del medio extracelular que, de esta forma, quedan *retenidas selectivamente* por la célula y se incorporan más tarde por endocitosis.

Para la célula, una ventaja adicional ofrecida por el sistema de endocitosis-intracitosis, es la separación del citoplasma y el material ingerido por una estructura membranosa, que protege a aquel de los efectos nocivos que pudieran derivarse de tal ingestión.

Por otro lado, el transporte del contenido vacuolar hasta zonas citoplásmicas especializadas, aparece más fácil de comprender que el transporte de sustancias libres en el citoplasma.

I.3.2. METODOLOGIA PARA EL ESTUDIO DE PROCESOS DE CITOSIS

Los *métodos* desarrollados para el estudio de los procesos citóticos, se han orientado a la elucidación de los *mecanismos de formación vacuolar y el destino intracelular de los endosomas*. Sin embargo, en la mayoría de los casos estudiados, la metodología empleada introduce artefactos tanto morfológicos como fisiológicos. Por ello, *los resultados deben discutirse con arreglo a una revisión crítica previa de la metodología y un análisis de las técnicas utilizadas*. Veamos a continuación,

una panorámica histórica de los principales métodos de estudio de la endocitosis:

El descubrimiento del *microscopio de contraste de fase*, abrió el camino para la observación celular en *condiciones próximas a la fisiológicas*. No obstante, esta técnica tenía la limitación de que la ruta intracitótica de los endosomas solo podía seguirse en un corto periodo de tiempo, previo a su disgregación en estructuras más finas o menos diferenciadas del resto de orgánulos citoplásmicos. Por ello, se intentó marcar el medio extracelular con *colorantes vitales*. Sin embargo, la mayoría de ellos exhibían efectos tóxicos, causando *reacciones patológicas* e incluso perturbaciones morfológicas en las células objeto de estudio. A este respecto, nos remitimos a los estudios de pinocitosis realizados en diferentes amebas por Rustad (1959) (y Champan Andresen (1962)). Se ha intentado el uso de *colorantes de fluorescencia* (Holter y Marshall) y *proteínas fluorocromadas*, que actuaban como inductores propios de la endocitosis (Wolpert y O'Neill; Jeon y Bell).

Posteriormente se llevaron a cabo estudios utilizando *sustancias inertes* fácilmente identificables, pero que como contrapartida, eran digeridas con dificultad o en absoluto y, por consiguiente, la intracitosis quedaba fuera de toda realidad. Citaremos como ejemplos de tales sustancias inertes, el poliestireno-latex (esferas de tamaño controlado) y gránulos de melanina.

Gropp (1963) describe *cinemicrográficamente* la ingestión por macrófagos de alimentos naturales tales como bacterias y "ghosts" de eritrocitos, en un intento de aproximación a las condiciones realmente fisiológicas; pero de nuevo surgieron problemas en cuanto al rastreo del material ingerido.

Cuando se generalizó el empleo de técnicas isotópicas, la *autorradiografía* proporcionó un método preciso y eficaz para la observación en condiciones fisiológicas de la endocitosis y la intracitosis (Chapman-Andresen y Holter, 1955). Estos resultados aludidos se obtuvieron principalmente en amebas, microorganismos en los que los procesos de endocitosis pueden visualizarse por microscopía óptica. El estudio en células de tejidos hubo de esperar hasta el perfeccionamiento de la *microscopía electrónica* (Odor en células de peritoneo de rata; Karrer, en células de pulmón y Kayes y Pappas en células de córnea). Sin embargo, una de las mayores dificultades encontradas fue la distinción entre los proce-

Endocitótico y exocitótico, que se resolvió en parte, gracias al empleo de *marcadores del medio extracelular* de alta densidad al microscopio electrónico, tales como los ya citados gránulos de melanina, (Félix y Dalton), ferritina (Farquhar y Palade), oro coloidal (Staubesand 1960), y hemoglobina (Rudzinska et al.).

La *selección del marcador* debe ir precedida de un detallado estudio previo, respecto a las consecuencias de su interacción con el material biológico objeto de estudio y debe elegirse de acuerdo con el proceso que quiera analizarse:

1) Determinación de la *actividad endocitótica*: En general se eligen sustancias inertes, como el poliestirol-latex, oro coloidal, aerosil, etc.

2) Determinación de las *sustancias capturables por endocitosis*, y de su efecto en la célula receptora. Pueden usarse pues, sustancias inductoras de la endocitosis aunque ello conduzca, en general, a la aparición de fenómenos patológicos o letales para la célula. Ejemplos de tales sustancias son la ferritina y la clara de huevo (Stockem 1966). Dichos marcadores son lógicamente, los más utilizados en los estudios *morfológicos* de la endocitosis, junto con colorantes vitales y otros *marcadores* elegidos en consonancia con el material biológico. La clara de huevo y determinados colorantes, (alcian blue) ejercen una vigorosa acción inductora de la endocitosis produciendo simultáneamente una *fuerte* inhibición de la motilidad celular.

La mayoría de las investigaciones se han realizado en *amebas*, excelentes materiales para el estudio de las actividades endocitóticas, *inducida y permanente*, por medio de la microscopía óptica. No obstante, los resultados obtenidos en amebas no pueden extrapolarse a otros tipos de células, puesto que la sustancia marcadora apropiada tiene que ser específicamente elegida para cada material de experimentación, y en atención al problema investigado. De todos modos, los hechos revelados por el estudio de la endocitosis en amebas constituyen, cuando menos, un buen *sistema modelo* en el que se pueden hallar analogías con otros organismos, a la vez que aportan datos para juzgar la metodología y los resultados conseguidos en otros materiales biológicos.

I.3.3. ENDOCITOSIS INDUCIDA Y PERMANENTE

Los procesos de endocitosis se inducen por una multiplicidad de factores conducentes a situaciones fisiológicas extremas. Entre ellos destacan los valores del pH, la temperatura y la concentración de la sustancia inductora, variables todas ellas en función de la naturaleza del medio de inducción. (Chapman-Andresen 1962).

Soluciones de sales inorgánicas, de aminoácidos y proteínas, exhiben diferentes propiedades inductoras de la endocitosis en función del pH. Para las soluciones salinas mencionadas, la máxima inducción se presenta en la zona de pH neutro; para los aminoácidos, en la zona alcalina y para las proteínas en la zona ácida. La acción de los numerosos colorantes histológicos que actúan como inductores es, en general, independiente del pH.

La concentración de estas soluciones, es obviamente un factor decisivo en la eficacia inductora de las mismas. Este punto ha sido ampliamente estudiado por Cooper (1968), autor que ha encontrado valores óptimos desde $10^{-1}M$ hasta $10^{-6}M$, en dependencia de la naturaleza de los iones disueltos por la sal.

Cooper ha revisado extensamente los efectos de soluciones de cloruros de diferentes cationes en la endocitosis (pinocitosis) de *Amoeba proteus*. El estudio de la influencia de estas moléculas sencillas proporciona, de nuevo, un sistema modelo claro sobre el que razonar la interpretación del fenómeno endocitótico.

Según Cooper, la pinocitosis se induce por muchas sales pero a concentraciones diferentes y con intensidades variables. Sobre el efecto inductor de los cationes alcalinos, se superpone un efecto negativo del ion calcio y una dependencia con el pH en todo caso.

Marshall y Nachmias (1965) sugirieron que *la superficie celular podría comportarse como una resina cambiadora de cationes*, explicándose así la preferencia exhibida por ciertas moléculas cargadas positivamente. De este modo, las diferentes concentraciones requeridas por las distintas soluciones catiónicas para inducir la pinocitosis, se deberian a *las diferencias en la afinidad* que, frente a dichos cationes, presenta la superficie celular.

Los resultados de Cooper, indican que *la afinidad de la membrana por los cationes ensayados* (monovalentes) aumentarían en el orden:

$\text{Li}^+ < \text{Na}^+ < \text{C}_s^+ < \text{K}^+ < \text{TMA}^+ \text{ (Tetrametilamonio)} < \text{TEA}^+ \text{ (Tetraetilemonio)}$. La afinidad de una resina sulfónica por los metales alcalinos es, sin embargo, la observada por Reichemberg (1966): $\text{Li}^+ < \text{Na}^+ < \text{K}^+ < \text{C}_s^+ < \text{TMA}^+ < \text{TEA}^+$; pero sorprendentemente, Reichemberg describe una afinidad de dichas resinas, coincidente con la encontrada por Cooper en amebas, cuando aquellas presentan un *moderado grado de uniones cruzadas*. La variación que estas uniones cruzadas producen en la afinidad del cambiador, son debidas a que muchos grupos activos quedan confinados en poros y *lugares difícilmente accesibles*, explicándose la preferencia por el TMA^+ frente al TEA^+ , más voluminoso (Millar et al. 1964).

La envoltura exterior de las amebas, (y de muchas otras células animales y vegetales), compuestas por *esteres sulfúricos de mucopolisacáridos*, podrían actuar como una resina cambiadora modificada que explique la aparentemente caprichosa concentración inductora de las soluciones catiónicas. Una prueba de la efectividad de esta *capa mucoide* (su significación en la endocitosis se expone en la sección I.3.4.) la ofrece el hecho de la fijación a la parte externa del plasmalema de colorantes básicos utilizados en la observación de amebas.

Es igualmente posible que dichas soluciones inductoras ejerzan su acción al alterar el equilibrio de Gibbs-Donnan (y por tanto el *potencial de membrana*), promoviéndose de este modo en la superficie celular, una reorganización de los grupos atómicos cargados que provocaría la formación de los plegamientos iniciales y las modificaciones físico químicas conducentes al proceso de invaginación y posterior vesiculación del material absorbido por la capa mucoide. (Cooper, 1968).

La *temperatura* tiene un margen de variación más estricto, en general óptimo entre 20°C y 23°C, si bien, en función de la naturaleza de la solución inductora, se han encontrado valores óptimos extremos a 5°C y 30°C, siendo negativos los efectos resultantes del establecimiento experimental de temperaturas que sobrepasen dichos límites (Chapman-Andersen, 1962).

Brandt y Pappas (1960) y posteriormente otros muchos autores, han establecido categóricamente, *la no dependencia con la temperatura de la fase de fijación a la superficie celular del material endocitado*, atribuyendo esta unión a interacciones simples de naturaleza electrostática. La influencia de esta variable se interpreta como un efecto producido en la fisiología de los *estadios posteriores* del proceso.

Zimmerman y Rustad (1965) encontraron que *presiones* del orden de 200 Kg/cm², ocasionaban la desaparición de los canales endocitóticos ya formados en amebas. En el mismo material de experimentación, Chapman-Andersen (1965) encontró un efecto análogo provocado por ciertos *inhibidores metabólicos* (véase sección I.3.5.), como el monóxido de carbono, el cianuro potásico y el 2,4 dinitrofenol.

Resulta cuestionable si en otras células es factible o no la inducción de la pinocitosis. Holter y Holtzer (1959) apuntan su posibilidad *en células de tejidos animales*, habiéndose logrado escasos datos al respecto hasta fechas más recientes (Sección I.3.6.).

Por otro lado, la naturaleza del agente inductor no tiene que ser necesariamente química; a este respecto cabe destacar el hecho puesto de manifiesto por Rinaldi (1959) acerca de la inducción de procesos de pinocitosis en amebas mediante *radiación ultravioleta*.

En la Tabla I se reseñan los agentes inductores de la pinocitosis más característicos.

En los casos de las proteínas reseñadas es obvio que, en los márgenes de pH a los que se exhibe el efecto óptimo, la carga neta de dichas proteínas es positiva.

En los aminoácidos puede observarse un hecho análogo, si bien existe una diferencia significativa en la concentración requerida para su actuación.

Sin embargo, Cohn (1969) ha encontrado que las macromoléculas más activas para la inducción de endocitosis en macrófagos de ratón, son *de carácter aniónico*, dependiendo sus propiedades de características estructurales (forma y tamaño). Asimismo, encontró la potente acción inductora de *adenosina y AMP*.

Los estudios cuantitativos realizados sobre la inducción de procesos endocitóticos, han revelado unos niveles de captura de material exocelular sorprendentemente elevado: en la primera fase de la inducción (unos 20 minutos en amebas), el volumen de medio exocelular ingerido corresponde a un 5-10% del volumen celular inicial y el peso seco de la célula se incrementa entre el 0,5% y el 1%. Según Holter (1965) se produce un aumento simultáneo de la superficie de membrana celular en un 50% de su valor inicial. Para Holter, este resultado es indicativo (aunque no concluyente) de que la endocitosis consiste principalmente en la ingestión de sustancias previamente absorbidas a la superficie celular.

TABLA I

Agentes inductores de la endocitosis

SUSTANCIA INDUCTORA	pH		MAX	CONCENTRACION
	Min.	Opt.		
<u>Sales inorgánicas:</u>				
Cloruros, Sulfatos y nitratos, de Li ⁺ , K ⁺ , Mg ⁺²	-	7,0	-	0,1-0,15 m (y concentraciones milimolares, según organismos).
<u>Amino-ácidos:</u>				
Glutámico	5,0	8,0	10,0	
Lisina	6,0	8,0	10,0	
Arginina	6,0	8,0	9,0	
Asparagina	9,0	10,0	9,0	0,06 M - 0,065 M
Triglicina	8,5	9,5	-	
Glutamina	9,0	9,5	-	
Metionina	9,5	10,0	-	
<u>Proteínas:</u>				
Albúmina de suero, (bovina)	-	4,0	5,5	10 ⁻⁴ M
Beta-Lactoglobulina	-	4,0	5,0	10 ⁻⁴ M
Conalbúmina	-	4,0	5,5	10 ⁻⁴ M
Hemocianina	-	4,0	-	10 ⁻⁶ M
Insulina	-	4,0	-	10 ⁻⁴ M
Ribonucleasa	-	4,0	8,5	10 ⁻⁴ M
Gamma-globulina (bovina)	-	4,0	-	10 ⁻⁴ M
Clupeína	-	4,0	-	10 ⁻⁴ M
Clara de huevo	-	4,5	-	0,5%
Ferritina	-	4,6	-	-

Sin embargo, cuando se induce la endocitosis con ^{131}I -albúmina de plasma bovino y a la vez el medio extracelular ofrece una sustancia no inductora marcada, tal como la glucosa ^{14}C , se observa la *captura simultánea de ambas*, pero con *diferencias cuantitativas* que señalan claramente la hipótesis de Holter: la proteína se captura unas diez veces más que la glucosa ^{14}C del medio exocelular. La consecuencia, verdaderamente trascendental, que puede obtenerse a partir de la idea de Holter, es que la endocitosis puede establecerse conceptualmente como la *ingestión de un material exógeno unido selectivamente en la membrana plasmática tras la puesta en juego de los puntos funcionales adecuados, para la recepción de la sustancia endocitada.*

Aunque la ingestión selectiva de sustancias extracelulares juega un importante papel en la nutrición celular, hemos de señalar que la endocitosis inducida debe tener una significación fisiológica de escaso valor, al menos en amebas. Estos microorganismos, abandonados en las soluciones inductoras -por otro lado de difícil aparición en la naturaleza- acaban pereciendo. Si la solución inductora es reemplazada por un medio de cultivo apropiado, durante un periodo mínimo de 3-4 horas, puede tener lugar un *segundo ciclo de endocitosis inducida*, a condición de la resuspensión en el medio inductor. En cualquier caso, este segundo ciclo es de características cinéticas y cuantitativas desfavorables respecto al primero.

La primitiva idea de Champan-Andresen formulada en 1962, de que el proceso endocitótico se iniciaba en amebas solo por medio de inductores específicos y, por lo tanto, que dicho proceso seguía un *curso discontinuo*, estuvo desde el principio en oposición con las observaciones de Wohlfarth-Bottermann (1960) en sus estudios al microscopio electrónico en *Hyalodiscus simplex*; en ellos se demostraba la existencia de una *continua ingestión* de membrana plasmática durante el proceso de locomoción de dicha ameba (*endocitosis permanente*).

Dicha hipótesis, aplicada en estudios realizados sobre *Amoeba proteus* por Wolpert y O'Neill (1961), fue demostrada de manera concluyente por Wohlfarth-Boltermann y Stockem (1966) utilizando el microscopio de contraste de fase. Esta técnica ha permitido el estudio preciso de la *cinética* del proceso endocitótico permanente, revelando que la formación y fragmentación ulterior del canal de endocitosis no presenta diferencias cualitativas entre los procesos inducido y permanente. Por el contrario,

Las diferencias cuantitativas son relevantes y quedan constatadas en la tabla II.

TABLA II

Diferencias fisiológicas entre la endocitosis inducida y permanente

Propiedades de los Canales de endocitosis						
Endocitosis	Duración	Nº	Longitud	Anchura	Situación	% membrana capturada.
Permanente	-1 min.	1-3	10-20	1-2	Uroidal	5%/30 min.
Inducida	3-5 min.	50-100	30-80	1-2	Toda la membrana.	50%/30 min.

El tanto por ciento de la membrana ingerida, está referido a la superficie celular total, considerada esférica (Holter, 1965).

Las principales diferencias son pues relativas al número, duración y longitud de los canales de endocitosis, así como a la situación generalizada de éstos, en el proceso inducido, frente a su localización concreta (en la zona uroidal) en el proceso permanente.

Los endosomas producidos en ambos procesos son de tamaños y características similares.

Sorprenden los resultados de Holter (1965) referentes tanto a las cantidades de membrana ingerida, como a la cinética con que se produce este fenómeno en condiciones de inducción o de endocitosis permanente. En un proceso inducido, durante un ciclo endocitótico de 20-30 minutos la membrana incorporada por amebas alcanza hasta un 50% de la superficie celular. Si aceptamos un periodo de 4 horas, durante el cual no puede endocitarse nuevo material, obtenemos un valor del 50% de ingestión durante las 4 horas y media que dura el proceso total. En la endocitosis permanente la captura de la propia membrana alcanza tan solo un 5% de la superficie celular, en un intervalo de tiempo similar de 20-30 minutos. Ello corresponde también a un resultado del 50% en las 4 horas y media comparativas con el proceso inducido.

Este valor del 50% aparece como un valor límite, determinado por dos

factores de importancia palpable y susceptibles de ser generalizados, a nivel cualitativo, para otros tipos de organismos cuyas condiciones fisiológicas permitan un transporte endocitótico de material exocelular. Dichos factores limitantes del proceso son:

- a) Disponibilidad de membrana celular.
- b) Tiempo requerido para la síntesis "de novo" de la membrana celular total necesaria para la formación de los endosomas.

La endocitosis inducida es pues un caso singular de la endocitosis permanente, que se produce en circunstancias fisiológicas definidas y con una velocidad mayor. El significado real de este fenómeno queda restringido a casos muy especiales ocurridos rara vez en la Naturaleza. En contraposición existe un mecanismo de ingestión permanente, operativo en todas las fases del ciclo celular y sensible a estímulos fisiológicos normales.

I.3.4. LA SUPERFICIE CELULAR EN LA ENDOCITOSIS

Mediante métodos citoquímicos, Revel e Ito (1967) han revelado la presencia de una *envoltura de mucopolisacáridos en la casi totalidad de las células capaces de realizar procesos endocitóticos*. Esta película mucoide exhibe un alto grado de diferenciación morfológica, y posee una afinidad especialmente elevada por las sustancias conocidas como inductoras de la endocitosis. Los *inductores* se adhieren en la envoltura mucoide de la célula, *concentrándose* hasta alcanzar *niveles locales* cuantitativamente significativos, capaces de promover el desencadenamiento rápido de los mecanismos fisiológicos y bioquímicos que conforman el proceso endocitótico. Esta *ingestión concentrada y selectiva*, también tiene lugar con partículas alimenticias grandes (fagocitosis en *Paramecium*); en células endoteliales, Staubesand (1965), postula la inducción local de invaginaciones de membrana como consecuencia de partículas absorbidas en la superficie celular.

Los estudios al microscopio electrónico (Marshall y Nachmias, Stockem, 1966), realizados en amebas, revelaron el importante papel llevado a cabo por la capa de *mucopolisacáridos* que rodeaba la membrana plasmática. La película mucoide, alcanza en amebas un grosor de 200-300 Å, rodeando a la membrana celular, así como una zona gruesa filamentosa de 1000 a 2000 Å, cooperando en cerca de un 4% al peso seco total de la

ameba; por análisis bioquímico, se observa su alto contenido en mucopolisacáridos ricos en sulfato (4-5%) y cuyo azúcar componente es principalmente manosa.

La unión de una sustancia inductora a la película mucoide es, según numerosos autores, *el estímulo primario del fenómeno endocitótico*, iniciando la formación del canal de endocitosis. Este proceso se induce en amebas sólo cuando se alcanza una *cantidad crítica de inductor*, asociado a la membrana. Dicha unión ocasiona un pronunciado gradiente local de concentración que puede ocasionar el bloqueo parcial, e incluso perjudicar la estructura, de unidades funcionales de la envoltura celular o de otros orgánulos, desencadenándose entonces el mencionado proceso endocitótico.

Cuando una sustancia internacciona con la película mucoide, ésta se bloquea reversiblemente o se daña de manera irreversible en detrimento de la capacidad locomotora de la célula, que *reacciona* al estímulo exterior con una intensa actividad endocitótica conducente a la *reparación por síntesis de novo de la película mucoide y de la membrana plasmática*; si el medio inductor no es reemplazado por un medio fisiológico, la capacidad regenerativa de la célula se agota y ésta acaba por morir.

I.3.5. DESTINO INTRACELULAR DE LOS ENDOSOMAS: DIGESTION CELULAR

Tanto los endosomas derivados de la endocitosis permanente como de la inducida, exhiben un *comportamiento cinético y dinámico similar*; ello confirma la idea de que la inducción es un fenómeno acaecido en la superficie celular, sin otras implicaciones diferentes de las múltiples posibilidades de interacción entre los inductores y la envoltura celular, considerándose como una modificación funcional del proceso permanente.

La película mucoide con el material exógeno retenido, una vez incorporada al interior junto con la membrana, comienza a experimentar cambios estructurales y morfológicos que llegan a hacer imposible su identificación cuando se han formado los *endosomas primarios*, uniformes en forma y tamaño; estos se fragmentan en los llamados *endosomas secundarios* que por *intracitosis* coalescen con otros en diferentes estados de digestión dando origen a los *lisosomas*.

En este estado, cabe establecer una *diferencia cinética, cualitativa*

mente importante, entre los procesos inducido y permanente: la digestión en los lisosomas procedentes de endosomas permanentes es más rápida que la acaecida en aquellos derivados de una endocitosis inducida. Ello con cuerda con el *escaso significado fisiológico* atribuido a esta modalidad de la ingestión celular; el material capturado no tiene porqué ser útil al funcionalismo de la célula receptora y, por tanto, nada asegura la provisión de enzimas específicas para el metabolismo de la sustancia incorporada en las circunstancias concretas de la célula.

Los lisosomas son el destino intracitótico de *enzimas digestivos* que, procedentes del ergastoplasma, se han rodeado de una porción intacta de membrana suministrada por el aparato de Golgi (*lisosomas primarios de de Duve*).

Los endosomas secundarios pueden transformarse en lisosomas no sólo mediante la fusión con dichas vesículas enzimáticas, sino también por coalescencia con lisosomas preexistentes (Thoenes et al., 1968).

Una vez digerido, el contenido de los lisosomas es reexcretado al me dio celular (exocitosis); a veces esta excreación no tiene lugar y se almacenan los llamados "*cuerpos residuales*" o "*postlisosomas*", con mate rial no digerido.

Lagunoff (1964) encuentra en Chaos Chaos, un "pool" de hidrolasas ácidas (proteasas y fosfatasa) estable y no afectado por la actividad celular de ingestión o excreción. Sin embargo, en condiciones de inducción seguidas de ayuno, la coalescencia vacuolar representa un mecanismo de *redistribución de las hidrolasas ácidas*, desapareciendo los cuer pos residuales y los endosomas secundarios. Más tarde, en 1966, Chapman-Andresen y Lagunoff, describieron la presencia prioritaria de la fosfa tasa ácida en lisosomas de amebas.

Muller (1969) ha encontrado seis actividades enzimáticas asociadas con los lisosomas de protozos: RNA-asa, fosfatasa y proteasa (ácidas), β -glucosidasa, α -N acetil glucuronidasa, y α -glucuronidasa.

En macrófagos de ratón, Cohn (1969) encuentra la formación de liso mas secundarios en la zona perigolgi, donde transcurre una digestión proteólita hasta aminoácidos que, en parte y de *forma selectiva*, son ex cretados.

El contenido vacuolar, no parece tener gran influencia en la redis tribución de hidrolasas consiguiente a la endocitosis. Muller (1965) en contró en *Paramecium multinucleatum* y en *Tetrahymena pyriformis*, la apa

rición de actividad de fosfatasa ácida en vacuolas que contenían sustancias inertes, tales como talco, o poliestireno-latex. Chapman Andresen y Lagunoff (1966) encontraron una conducta similar en Chaos Chaos. Todos estos autores llegan a la conclusión de que la formación de los endosomas secundarios, es el factor responsable de la *redistribución de estas enzimas*, siendo el contenido de aquellos (transformados en lisosomas) de ninguna importancia al respecto.

En *Tetrahymena pyriformis*, Lantos et al. (1964) han observado que la cantidad de hidrolasas celulares depende del *estado de nutrición celular*: las actividades de fosfatasa y proteasa ácidas, decrecen durante el ayuno y se recuperan cuando las células vuelven a su medio nutriente habitual.

Este hecho puede estar relacionado con la *cesión de proteínas específicas* a los medios de cultivo en tiempos cortos de crecimiento, es decir, cuando no se habría iniciado aún la fase exponencial de mortalidad (regresión) del cultivo. El fenómeno ha sido abundantemente descrito en *Tetrahymena pyriformis*. Así, Smith (1961) reseña la aparición exocelular de fosfatasa ácida y ribonucleasa. Esta ribonucleasa cedida al medio presentaba propiedades diferentes a la intracelular (sensibilidad al calor); Haesler et al. (1957) y Smith (1961), describieron la presencia de *desoxirribonucleasa*; Dikie y Liener (1962 a y b) identificaron proteasas exocelulares con propiedades diferentes a las interiores de *Tetrahymena pyriformis*, en cuanto al pH óptimo y a la especificidad de enlace atacado. Por último, también Smith encontró la presencia de *amilasas*.

El significado biológico de esta *secreción específica*, debe relacionarse con el proceso de reordenación enzimática que las células siguen durante la asimilación, respondiendo más a un fenómeno de reajuste fisiológico que a la búsqueda de un efecto directo sobre los sustratos apropiados, dada la gran dilución a que estas enzimas así segregadas son sometidas en los habitats naturales de los protozoos no gregarios (*Tetrahymena pyriformis*) y en general, de muchos microorganismos que presentan esta propiedad secretora.

La digestión celular del material lisosómico, se completa en los protozoos con ayuda de todo el conjunto de hidrolasas conocidas, presentes todas ellas en esta clase de microorganismos.

En estados de ayuno, los protozoos pueden llegar a digerir su propio

citoplasma, mediante un proceso de vesiculación intracitótico por el que algunos orgánulos celulares o porciones indiferenciadas de citoplasma, se rodean de una membrana no perforada, para dar lugar a los *autolisomas* o *citolisomas*. En estas condiciones, algunos ciliados, excretan aminoácidos, purinas, pirimidinas y ortofosfato, como principales productos de su autodigestión, (Leboy et al., 1964; Soldo et al., 1961).

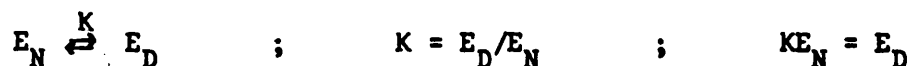
Cabe señalar que en condiciones de ayuno e inducción de la endocitosis con sustancias no nutritivas, *Tetrahymena pyriformis* y especies de *Paramecium*, *seleccionan*, concentrándolas en su superficie, aquellas otras partículas del medio con propiedades nutritivas (Elliot y Clemmons, 1966).

Por otro lado, en *Tetrahymena pyriformis* se ha detectado un efecto estimulador del crecimiento en condiciones axénicas por adición de material microparticulado, no nutriente, correlacionándose la velocidad específica de crecimiento con el número medio de formación de vacuolas digestivas (Rasmussen y Kludt, 1970).

I.3.6. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE LA ENDOCITOSIS

En sentido amplio puede establecerse que la temperatura afecta a todos aquellos procesos metabólicos gobernados por una actividad enzimática principal.

Sobre esta base, es posible la utilización del modelo de Jhonson et al. (1954), propuesto sobre la hipótesis de la existencia de un equilibrio termodinámico de desnaturalización reversible de la forma enzimática biológicamente activa (E_N):



La concentración total de la enzima (E_T) vendrá dada por la suma de las formas nativas y desnaturalizada (E_D);

$$E_T = E_N + E_D \quad ; \quad E_D = E_T - E_N \quad ; \quad KE_N = E_T - E_N$$

de donde,

$$E_N = \frac{E}{1 + K}$$

según Jhonson la *velocidad del proceso* (V_p) gobernado por esta enzima será proporcional a su concentración, según:

$$V_p = C' \frac{E}{1 + K} K'$$

siendo C' una constante de proporcionalidad y K' la constante de velocidad de la reacción catalizada por la enzima principal.

Si escribimos K' y K en sus respectivas formas de *funciones de la temperatura*, reordenando constantes junto con C' , puede obtenerse la ecuación:

$$V_p = \frac{CT_e - AH/RT}{1 + e^{\frac{AS^\circ/R}{e^{-AH^\circ/RT}}}}$$

Esta expresión describe aceptablemente las variaciones de procesos dependientes de la temperatura, tan complejos como el crecimiento de microorganismos; sin embargo, otros autores han corregido el modelo de Jhonson puntualizando dos hechos fundamentales:

1) En el caso de la desnaturalización reversible de las proteínas, por calor, el cambio de energía libre no es una función lineal de la temperatura, de la forma $AF^\circ = AH^\circ - TAS^\circ$, sino un polinomio en T de grado mayor que uno (Brandts, 1967).

2) En realidad, los procesos fisiológicos considerados en su conjunto, no pueden separarse del total de acciones metabólicas concurrentes; en otras palabras, hay *más de una "enzima clave"* cuyas concentraciones (en sus formas activas), repercuten en el desarrollo alcanzado por los procesos fisiológicos citados. (Van Uden y Madeira-Lopes, 1967).

Esta *relación temperatura-actividad enzimática* debe considerarse incluso en las fases tempranas del proceso endocitótico, puesto que puede establecerse, por analogía, la relación temperatura - conformación del receptor. Los autores que postulan una atracción electrostática de la membrana (proceso independiente de la temperatura) (Chapman-Andresen, 1962; Brandt y Pappas, 1960 y 1962; Marshall y Nachmias, 1967) señalan a su vez una *cierta especificidad de captura*: las moléculas son seleccionadas por ciertos *receptores* en función de la carga de aquellas y la de éstos. Si bien es obvio que la temperatura no puede afectar a la

cuantía de la carga, los efectos de esta variable sobre la conformación de los complejos macromoleculares receptores son evidentes; la accesibilidad a estas estructuras que las moléculas asociantes presenten, se verá modificada por el microambiente termodinámico en el que la célula se desenvuelve.

Wallach et al. (1966, 1968) y Singer (1972), han considerado las biomembranas como *disposiciones móviles de proteínas asociadas con lípidos* característicos mediante enlaces no covalentes; los dominios apolares de lípidos y proteínas posiblemente formen un núcleo central, mientras que los correspondientes grupos cargados se orientan hacia las dos superficies de la membrana dando lugar a la formación de canales que la atraviesan.

Las biomembranas responden a variaciones de la temperatura con cambios en diferentes propiedades fisicoquímicas que implican necesariamente *alteraciones en su organización* molecular. Testimonio de estas modificaciones funcionales, son los estudios de Chang y Matsou (1972), sobre la influencia de la temperatura sobre la *permeabilidad*, así como de Gitler (1971) sobre la *excitabilidad* como función dependiente de dicha variable termodinámica.

Estas transiciones estructurales se ponen de manifiesto por el hecho de que las señales térmicas obtenidas por calorimetría diferencial de biomembranas de Mycoplasma, son alteradas reversiblemente por efecto de la temperatura. Los cambios observados se interpretan como transiciones reversibles "líquido cristalino ↔ estado cristalino" de la bicapa de fosfolípidos del interior de la membrana de este organismo.

Aún no están claras las causas por las que la temperatura provoca estos cambios reversibles en las biomembranas. Por el momento, está probado el hecho de que los lípidos de las membranas naturales poseen *domi*nios *fluidos* (Levine y Wilkins, 1971), Wilkins et al. (1971), Tourtelotte et al. (1970). A este respecto son particularmente interesantes los trabajos de Trauble (1972); utilizando la técnica de *resonancia de spin electrónico* en sistemas artificiales de experimentación (complejos vesiculares de monocapas de dipalmitoil-lectina), Trauble ha encontrado una clara correlación entre la *difusión lateral* de componentes de la membrana, como fenómeno dependiente de la *movilidad de las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos que la constituyen*. A bajas temperaturas estas monocapas pueden albergar en su interior gotitas de esteroides

(marcados para su identificación experimental); cuando la temperatura se eleva por encima del punto de transición de la fase lipídica, las cadenas hidrocarbonadas ganan movilidad y permiten la difusión al azar, en el plano lateral de la membrana, de las moléculas de esteroide en ella albergadas. La reestructuración de la biomembrana es reversible (al recuperar la temperatura inicial), si no se ha sobrepasado cierto umbral superior de temperatura.

Speth y Wunderlich han encontrado un fenómeno interpretable a la luz de estos hechos, acaecido en biomembranas del microorganismo poiquilotérmico *Tetrahymena pyriformis* GL. Mediante microscopía electrónica, estos autores describen la existencia de *transiciones reversibles* en la estructura de la membrana alveolar de dicho protozoo, provocadas por cambios de temperatura rápidos. A una temperatura de crecimiento óptima de 28°C, se advierten, en la cara externa de la membrana alveolar, unas partículas protuberantes distribuidas al azar, así como los correspondientes orificios en la parte interna de la misma. Después de enfriar a 5°C estas partículas (y orificios), se observan agregadas en grandes núcleos que desaparecen cuando se vuelve a calentar a la temperatura óptima de crecimiento.

La naturaleza química de estas partículas no está clara todavía; hay, no obstante, pruebas indirectas de una estructura proteica (y/o glicoproteica), que está formando complejos con diferentes lípidos (Speth et al., 1972); Marchesi et al. (1972), Branton y Deamer (1972). Pinto da Silva, (1972) ha asociado estas partículas en eritrocitos humanos con estructuras de la membrana que funcionan como "*conductos proteicos*", de importancia trascendental en diferentes *fenómenos de transporte*.

El fenómeno de agregación de partículas en membranas como respuesta a cambios de temperatura, fue observado previamente por Wallach (1969) en "ghosts" de eritrocitos tratados con fosfolipasa C, o por tratamiento con tripsina a fondo del mismo material biológico (Speth et al., 1972). Ambos hechos abundan en las conclusiones deducidas para la naturaleza química de estas partículas: son parcialmente proteínas y parecen estar asociadas con lípidos.

En cuanto al mecanismo por el que la temperatura ejerce su acción, aún en el orden especulativo, Speth y Wunderlich (1972), proponen la siguiente ordenación de acontecimientos: Los lípidos, en el estado de líquido cristalino a la temperatura óptima de crecimiento, cristalizan

al ser enfriados a partir de un *punto inicial*, formando centros de cristalización que progresivamente se transmiten en las dos dimensiones del plano de la membrana. Junto al desplazamiento del límite entre ambas fases, las partículas serían arrastradas hacia zonas más líquidas (de mayor carácter lipídico), hasta quedar empaquetadas ocupando los dominios apolares totalmente (observación de agregados). A temperaturas elevadas, cuando los lípidos recuperan sus propiedades líquidas cristalinas, las aglomeraciones desaparecen volviendo las partículas a su distribución al azar.

Otro proceso fisiológico importante modulado en *Tetrahymena* por la temperatura y con implicaciones evidentes en los fenómenos de endocitosis, es la *regulación iónica*. Obviamente la carga de la superficie receptora será el *resultado indirecto* de la concentración de iones en el interior y exterior de la célula.

Mediante técnicas de intercambio isotópico, Dunham y Child (1961) describen como la cepa W de *Tetrahymena pyriformis* (utilizada en nuestros estudios) mantiene una alta concentración protoplásmica de ión potasio y baja de ion sodio cuando crece en un medio peptonado. Los datos de estos autores revelan una concentración de potasio en el interior al menos seis veces mayor que la encontrada en el medio externo, siendo tan sólo de un tercio la misma relación para el ion sodio. En un medio análogo diluido, la relación K^+ interior/ K^+ exterior alcanza valores superiores a 100.

Cuando gradualmente se incrementa la concentración exterior de potasio hasta un valor de 11 mM, se observa que sus niveles en el interior aumentan de forma exponencial. Entre 11 mM y 140 mM, este incremento se manifiesta con carácter lineal alcanzándose rápidamente el estado de equilibrio K^+ interior \rightleftharpoons K^+ exterior.

Sorprende que el aumento de potasio en el interior no vaya asociado con la correspondiente pérdida de sodio, sugiriéndose que ambos iones sigan *modelos de transporte independientes* en su difusión a través de la membrana de *Tetrahymena*.

Asimismo, la respuesta de este protozoo a cambios en la concentración de iones sodio en el medio es también diferente de la exhibida respecto al potasio: Desde valores externos 5 mM hasta 20 mM el nivel de Na^+ en el interior se mantiene constante, indicando la existencia de un *mecanismo de extrusión para el sodio*. Por encima de 20 mM en el medio,

la concentración interior de sodio aumenta linealmente, siendo mayor que en el caso del ión potasio el lapso de tiempo requerido para alcanzarse el estado de equilibrio iónico.

Posteriormente Andrus y Giese (1963), tras comprobar los datos de Dunham y Child, pusieron de manifiesto una *variación en los flujos* -independientes- de sodio y potasio, cuando se sometía a *Tetrahymena pyriformis*, cepa W, a *cambios de temperatura*. En un medio libre de sodio es tos autores pudieron observar que al enfriar el medio líquido en donde crecían las células, el potasio interior se cedía en un 30% aproximadamente; cuando la temperatura alcanzaba la cota normal de adaptación de la cepa, el potasio liberado volvía a recuperar su nivel habitual hasta restablecerse el estado de equilibrio iónico inicial.

Si el descenso de temperatura se verificaba en medios nutrientes o no nutrientes que contuvieran ión sodio, la pérdida de potasio persistía aunque se originaba una ganancia de sodio. Aparentemente, el transporte de ambos iones obedecía a procesos independientes. Los niveles normales de sodio y potasio interiores y exteriores, quedaban restablecidos al llevar la temperatura a 25°C.

Se sugirió que el mecanismo de expulsión de potasio, estaba acoplado con una simultánea liberación de agua, relacionándose el fenómeno en su conjunto con el funcionamiento de la vacuola pulsátil de *Tetrahymena*.

De importancia trascendental para nuestros estudios, son los trabajos de Pruet (1965) relativos al *proceso de entrada y acumulación en Tetrahymena pyriformis, del anión ortofosfato*. Este proceso no puede explicarse en términos de una captura vía vacuola alimenticia exclusivamente.

En una suspensión de células 2% (V/V) y a concentraciones 10^{-4} M de ortofosfato, cerca del 30% del isótopo trazador desaparece del medio en una hora. En estas condiciones, las células deberían haber ingerido, co mo mínimo, 15 veces su volumen después de haber retenido selectivamente, la totalidad del isótopo en su superficie. De esta forma, las cantidades de ortofosfato acumuladas son demasiado grandes para que puedan jus tificarse con arreglo a un fenómeno de endocitosis normal. Hemos de aceptar pues, la existencia de un *sitio receptor con una afinidad muy alta para el ortofosfato*, cuya actuación selectiva permite la acumulación en la superficie de *Tetrahymena* de grandes concentraciones del ión ortofosfato en los momentos iniciales de la *formación de vesículas pino* citóticas.

Pruett concluye la existencia del *receptor de ortofosfato*, en base a dos criterios experimentales:

- 1) Dependencia de la *velocidad de captura* con la concentración exterior de ortofosfato.
- 2) Dependencia de la *velocidad de captura* con la *Temperatura* a la que se realiza el proceso.

Los estudios sobre el primer proceso, revelaron una cinética de Michaelis-Menten, con una K_M de 8×10^{-5} M a pH 7,5 y $2,8 \times 10^{-5}$ M para el anión monobásico; estos valores de K_M indicaban la *alta afinidad* del ortofosfato por el sitio superficial. *La energía libre* del proceso de captura fue de 9 K cal/mol, lo que descarta la posibilidad de un simple fenómeno de difusión (difusión, obviamente, facilitada o michaeliana) que justifique el enorme caudal de ortofosfato capturado tras superar dicha barrera energética.

Por otro lado, la captura de ortofosfato a 10°C de temperatura, aparecía en valores extremadamente bajos, apuntando la posibilidad de un *cambio físico en la superficie celular* (o en el citoplasma), que *inactiva* el proceso de concentración previo a la formación de los canales endocitóticos.

Los estudios sobre la influencia del pH en la entrada de ortofosfato (Conner et al. 1961), indican la mayor afinidad por la forma monobásica del ortofosfato referida por Pruet, pero a un pH en el que dicho monoanión no presenta su máxima sobreabundancia respecto a las otras formas iónicas del ortofosfato. Ello sugiere una doble vertiente en la actuación del ión hidrógeno, tanto sobre el ortofosfato como, posiblemente, sobre el receptor.

En medios no nutrientes, cuando la concentración exterior de ortofosfato es baja, *Tetrahymena* incorpora la totalidad del anión presente (exceso de células). Sin embargo, al reemplazar el medio por otro libre de ortofosfato, no se observa su liberación (transporte unidireccional referido por Slater y Tremor, 1962).

Blum (1965) observó que cuando se sometía *Euglena gracilis* a un proceso experimental análogo, se producía la excreción de ortofosfato cuando la concentración exterior de éste, en el medio de resuspensión, era suficientemente baja.

En medios nutrientes, *Euglena gracilis* es capaz de acumular ortofos-

fato rápidamente. Con simultaneidad, aparece *inducida la actividad de fosfatasa ácida* (originalmente descrita por Price); Sommer y Blum (1965), demostraron que la enzima inducida se encontraba *localizada en ciertas regiones específicas de la película* de Euglena, por lo que, más tarde, Blum (1966) sugirió la conexión del fenómeno de transporte con la inducción de la enzima.

La Km del sistema transportador de ortofosfato en Euglena es $1,6 \times 10^{-5}$ M, valor próximo al encontrado en Tetrahymena. El proceso, se afecta por variaciones en la temperatura, y por la presencia de Na^+ , K^+ y Li^+ así como por el 2,4, dinitrofenol.

I.3.7. ENDOCITOSIS Y METABOLISMO ENERGETICO

Schumaker (1958) confirmó la formación de un complejo inductor-membrana, por autorradiografía al microscopio electrónico de amebas expuestas a un medio extracelular que contenía ^{131}I -ribonucleasa y ^{131}I -citocromo c. Los estudios cinéticos del proceso mostraban que la reacción inicial era un fenómeno físico, de naturaleza electrostática e independiente de la temperatura, así como de la presencia o ausencia de ciertos *inhibidores metabólicos*. De Terra y Rustad (1958), Chapman-Andresen (1962) y Brandt y Pappas (1962), demostraron que los estadios del proceso endocitótico posteriores a la formación del complejo citado, quedaban bloqueados mediante un enfriamiento rápido o por la acción de dichos inhibidores, por lo que postularon la *dependencia de la ingestión citótica con el estado metabólico y fisiológico del organismo receptor*.

Los trabajos previos de Puchkov (1955) habían revelado que la fagocitosis en leucocitos se reducía significativamente ante la presencia de inhibidores específicos de la vía glicolítica, tales como el iodoacetato y el fluoruro, en tanto que el cianuro, inhibidor de la respiración, no presentaba efecto alguno en la ingestión de material particulado extracelular. Por el contrario de Terra y Rustad (1959) y Schumaker (1958) establecieron la dependencia de la pinocitosis en relación a la respiración aerobia.

Chapman-Andresen (1957) comprobó en Chaos-Chaos los datos de estos autores y encontró efectos negativos en diversos agentes inhibidores *tanto de la glicolisis como de la respiración*; (ácido iodoacético y fluoruro sódico para la glicolisis y *ácida sódica, 2,4-dinitrofenol*,

cianuro potásico, y antimicina A para la respiración). Chapman-Andresen atribuye la acción del cianuro potásico a un efecto de bloqueo producido por dicha sustancia en las fases del proceso posteriores a la fijación en la membrana plasmática, puesto que se reduce el número de canales pinocitóticos y no la cantidad de marcaje adherido a la envoltura celular.

La situación es similar en *Acanthamoeba*, de forma que la fagocitosis se reduce ante la presencia de inhibidores de la fosforilación oxidativa, y permanece inafectada por inhibidores de la glicolisis. (Weisman y Korn, 1967; Korn y Weisman, 1967). Por otra parte, Robins y Taylor (1968), trabajando con células de linfoma cultivadas "in vitro" concluyen que los inhibidores de la fosforilación oxidativa y, por tanto, de los procesos de transporte activo, no afectan apreciablemente la captura de DNA exógeno. Posiblemente el uso de células tumorales, con profundas modificaciones en los mecanismos de respiración mitocondrial, dificulta la comparación con los esquemas habituales y sea la causa de las discordancias experimentales aludidas.

Cohn (1960) propone de nuevo que la respiración constituye la principal fuente de *energía metabólica* para la pinocitosis llevada a cabo por macrófagos de ratón. De acuerdo con este autor, será el estado fisiológico y la disponibilidad de sustancias metabolizables, los factores fundamentales que condicionan *la movilización de ATP*, que antecede a las fases tardías de los fenómenos citóticos.

La biosíntesis de fosfolípidos, según Karnowsky (1962), sucede de modo acentuado a la ingestión de partículas extracelulares estableciéndose un "turn-over" rápido de los fosfolípidos que integran la porción de membrana ingerida. La subsiguiente biosíntesis de reparación, toma energía de los procesos metabólicos que normalmente la producen: Ciclo de Krebs y β oxidación en aerobiosis y glicolisis en anaerobiosis.

Ya ha quedado reflejada en esta introducción la importancia de la regulación del equilibrio iónico en relación con la carga superficial de *Tetrahymena*, y por tanto con los fenómenos primarios del proceso endocítico. En este apartado, interesa resaltar los trabajos de Andrus y Giese (1963); estos autores pusieron de manifiesto que agentes inhibidores de la fosforilación oxidativa (y significativamente, modificadores de las propiedades de membrana) tales como la anoxia, el ácido iodoacético, la ácida sódica y el 2,4 dinitrofenol, provocaban una pérdida del

30-50% de potasio interno, sin observarse variación efectiva en los niveles de sodio; así pues, mientras el mecanismo concentrador de potasio resultaba perjudicado, el proceso de salida de sodio permanecía inalterado. Con estos datos, pudieron concluir la independencia de ambos fenómenos de transporte iónico y sugirieron la *naturaleza activa* de la captura de potasio por estas células.

En consecuencia no puede relacionarse, en sentido estricto, la energía liberada por una determinada ruta metabólica con la consumida por la endocitosis, sino que va a ser el *estado fisiológico global* quien determine la movilización de los recursos necesarios para llevar a cabo todos los procesos bioquímicos que concurren en los fenómenos de citosis, diferentes en cada material biológico. No obstante, la mayor abundancia de datos, concuerdan en atribuir a la *respiración mitocondrial* la aportación de energía, tal vez por ser el mecanismo más ágil que tiene la célula para producirla. Evidentemente, en los estados anaerobios de crecimiento la energía metabólica será aportada por las demás rutas ya mencionadas.

I.3.8. ECTOENZIMAS COMO RECEPTORES ESPECIFICOS DE MEMBRANA

Se denominan así aquellas enzimas características de la superficie externa de la célula que muestran su actividad sobre sustratos extracelulares; ello implica que la integración de las ectoenzimas en la membrana plasmática permita que la actividad biológica de aquellas se manifieste *hacia el medio externo*.

Habitualmente se han empleado enzimas características como *marcadores de membrana* (Benedetti et al., 1968).

En cuanto al *significado fisiológico* de las ectoenzimas hemos de apuntar la posibilidad de su *internalización progresiva durante la endocitosis*. Numerosos autores, (Korn y Weisman, 1967; Tsan y Berlin, 1971; Werb y Cohn, 1971; Werb y Cohn, 1972), han confirmado esta hipótesis. La disminución de la actividad ectoenzimática es *progresiva en el transcurso de la endocitosis y simultánea a la internalización* de la superficie celular como parte del endosoma y posteriormente del endolisoma (lisosoma primario de De Duve).

La mayoría de las ectoenzimas marcadoras de membrana están relacionadas con el *metabolismo hidrolítico de biopolímeros* (ácidos nucleicos y polisacáridos) y de azúcares complicados.

La membrana plasmática de hígado de rata posee cuatro enzimas hidrolíticas que actúan de modo coordinado en la degradación del RNA (Yannarell y Aronson, 1973). Estas cuatro actividades son: fosfodiesterasa I (Ec. 3.1.4.1), 3'-nucleotidasa (Ec 3.1.3.6), 5'-nucleotidasa (Ec 3.1.3.5) y una endonucleasa no clasificada aún. La fosfodiesterasa I es una exonucleasa que sólo libera 5'-mononucleótidos del RNA y que requiere Zn^{2+} y un grupo 3'-hidroxilo libre para expresar su actividad; las 3'- y 5'-nucleotidasas liberan fosfato inorgánico de los extremos 3' y 5' de sus correspondientes sustratos específicos.

La degradación producida por este conjunto ectoenzimático es comparable a la producida por los lisosomas normales. Su acción catalítica coordinada comienza con un ataque inespecífico de la endonucleasa que deja en libertad oligonucleótidos con extremos 3'- y 5'- fosfato. A continuación la 3'-nucleotidasa libera el correspondiente fosfato inorgánico de forma que los oligonucleótidos con el grupo 3'-hidroxilo libre pueden ser utilizados por la fosfodiesterasa I para dar el 5'-mononucleótido. Por último la hidrólisis de los grupos 5' fosfato por la 5'-nucleotidasa rinde fosfato inorgánico y el nucleosido.

El significado biológico de un sistema tan complejo, incorporado a la superficie celular, es difícil de definir exclusivamente con arreglo al hecho antes mencionado de su internalización. Evidentemente, su papel en la digestión del material endocitado puede ser importante; pero habitualmente los productos de hidrólisis son rechazados de nuevo hacia el medio, lo que conlleva a proponer dos alternativas adicionales:

a) En primer lugar, un sistema de dichas características constituiría un mecanismo de defensa frente a información macromolecular exógena, cuya capacidad transformante puede manifestarse -como es bien sabido- en alteraciones patológicas graves. (Este punto ya ha sido comentado ampliamente en la presente Tesis).

b) Desde el punto de vista de la nutrición celular la hidrólisis del biopolímero rendiría, tal vez, productos más fácilmente asimilables o cuyo transporte al interior de la célula estuviera mejor determinado por la existencia de sistemas transportadores específicos.

En ambos casos, el problema nos relaciona de nuevo con la existencia de receptores superficiales específicos de biopolímeros. Cohn (1973), ha revisado el tema en macrófagos, células caracterizadas por su marca-

da actividad endocitótica y su capacidad para confinar material exógeno en vacuolas derivadas de la membrana plasmática. (Posteriormente, estas vacuolas se funden con los lisosomas primarios y secundarios iniciando el proceso de digestión celular).

El fenómeno en su conjunto está obviamente determinado por la función de la membrana plasmática. La fase primaria consiste en la interacción con *receptores externos* cuya naturaleza y topografía aún no están claras.

En general, existe una clara diferencia entre la captura de *moléculas neutras y cargadas eléctricamente*. Mientras las primeras se incorporan por pinocitosis manifestando una *dependencia lineal* con su concentración en el medio externo, las segundas *catiónicas y aniónicas* exhiben una *gran capacidad de unión* con la membrana plasmática de macrófagos, antes de su interiorización. Tales moléculas (DEAE-dextrano, polilisisina, sulfato de dextrano, etc) se incorporan con una rapidez que excede en cien veces la manifestada por los productos no cargados. La cinética de incorporación es muy diferente también y se observa una saturación de los receptores superficiales.

Las moléculas cargadas interaccionan probablemente a través de enlaces iónicos y habitualmente requieren la presencia de cationes divalentes y otros iones.

Estos hechos sugieren la existencia de *puntos de anclaje aniónicos y catiónicos en la superficie celular*, aunque en general, la carga neta de la célula sea de naturaleza ácida.

La unión de moléculas cargadas a la membrana del macrófago puede -o no- inducir su pinocitosis. El propio Cohn (1971) ha demostrado que *sólo las moléculas aniónicas tienen la propiedad de estimular la formación de vesículas pinocitóticas* y que su efectividad es una *función del tamaño molecular*.

Nuestros datos están muy en la línea de lo que hasta aquí hemos descrito, ya que se ha puesto de manifiesto la *existencia de un receptor en la superficie de Tetrahymena pyriformis con actividad DNA-ásica (endonucleasa) relacionada de algún modo con el RNA, que estimula la acción de aquella*. Posteriormente, el DNA unido a la superficie celular, iniciará su camino en los dos sentidos posibles, hacia el medio o hacia el interior de la célula huésped.

El hecho, también observado por nosotros, de la *influencia del medio*

iónico externo y de la temperatura, indica que habremos de afrontar la discusión ulterior del problema considerando la existencia, en la envol tura de Tetrahymena, de una actividad ectoenzimática asociada al sitio receptor del biopolímero DNA.

II. MATERIALES Y METODOS

II.1. REACTIVOS

En la elaboración de los trabajos experimentales de la presente tesis, se utilizaron los siguientes reactivos y compuestos especiales.

- $^3\text{H}_2\text{O}$ (16.000 dpm/ μl), amablemente cedida por el Departamento de Radiobiología de la Junta de Energía Nuclear.
- DNA de timo de ternera, obtenido por el Departamento de Radiobiología de la Junta de Energía Nuclear.
- Reactivo de Folin-Ciocalteu, (E. Merck).
- Pronasa, (Calbiochem, A.G.).
- Proteasa Pancreática IV, (Sigma Chemical Company).
- Proteosa-Peptona nº3, (Difco, Laboratories Incorporation).
- Triptona, Difco (Bacto - Triptona).
- DEAE - Celulosa (DE-80), (Whatman - W. R. Balston Ltd).
- Lauril - Sulfato sódico (Sigma Chemical Company).
- 2,5 difenil oxazol, (PPO) (Sigma).
- 1,4-bis-2-(5-fenil oxazolil) benceno (POPOP)(Sigma).
- Naftaleno (F.E.R.O.S.A.).
- Acido etilén-diamino-tetra acético (F.E.R.O.S.A.)
- Dioxano (Carlo Erba).
- Etilenglicol (E. Merck).
- RNA de levadura, (Sigma Chemical Company).

- Poliglutámico, PM 48000 (308 residuos) (Sigma).

- Nonidet P40, (BDH, Chemicals Ltd).

· El resto de los compuestos no reseñados en este apartado y utilizados en nuestra metodología, fueron de grado analítico.

II.2. OBTENCION DEL ^3H -DNA DE ESCHERICHIA COLI

Se usó la cepa tau-bar de E.Coli, mutante requiriente en timina (5-Metil uracilo), permitiendo su rápida asimilación en el DNA celular la obtención del polímero con alto grado de actividad específica. La timina usada en el cultivo está marcada radiactivamente mediante la sustitución de los tres hidrógenos del metilo de la posición cinco del anillo pirimidínico por tres átomos de Tritio.

II.2.1. CRECIMIENTO DE ESCHERICHIA COLI

Se utilizó un litro de medio de cultivo de composición:

	<u>Solución A</u>
Tris	12,00 g
KCl	2,00 g
NH_4Cl	2,00 g
MgCl_2	0,50 g (pH a 7,4 con ClH 1 N)
Na_2HPO_4	0,35 g
Na_2SO_4	0,35 g

	<u>Solución B</u>
^3H -Timina (2 Ci/mmol)	0,50 mg
Uracilo	10,00 mg
Arginina	20,00 mg
Prolina	20,00 mg
Metionina	20,00 mg
Triptófano	20,00 mg

	<u>Solución C</u>
Glucosa al 0,5% (final)	

Las tres soluciones A, B y C se preparan y esterilizan separadamente (15 min., 110°), mezclándose a un volumen final de 1 litro.

Los cultivos crecieron a 37° con aireación por agitación mecánica, obteniéndose un rendimiento de 3 g de células (peso húmedo) por litro de cultivo.

II.2.2. AISLAMIENTO Y PURIFICACION DEL ³H-DNA

El método que a continuación se expone, está basado en el trabajo original de Marmur (1965), modificado por C.A. Dávila (comunicación personal).

Las células se sedimentaron por centrifugación a 4°C, 10.000 xg, durante 30 minutos. 1 g de células (peso húmedo) se suspendió en 20 ml de solución de NaCl 0,15 M, EDTA, 0,1 M, pH 8, centrifugándose en idénticas condiciones y resuspendiéndose las células sedimentadas en 12 ml de la misma solución.

El lisado de las células se llevó a cabo en dos etapas:

- Adición de 5 mg de *lisozima* a la suspensión de células, incubándose con agitación durante 30 min, a 37°, a fin de obtener los esferoplastos correspondientes.
- Lisis de los esferoplastos, añadiendo 1 ml de lauril-sulfato sódico 25%, en etanol 50%, calentando a 60°C durante 10 minutos. La concentración final del detergente es del 2%.

El lisado obtenido se lleva a temperatura ambiente, adicionándose luego perclorato sódico 5 M hasta una concentración final 1 M. El homogeneizado resultante se *desproteíniza* añadiendo un volumen igual de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) manteniéndose con agitación durante 30 minutos. Tras centrifugar a 10.000 rpm, 15 minutos, para separar la fase orgánica, se recoge la fase superior (acuosa) de la que se precipita el DNA con 2 vol. de etanol absoluto en frío.

El precipitado fibroso obtenido se *hila* por rotación suave sobre una varilla de vidrio, secándose al aire el hilado obtenido. La preparación de DNA se disuelve en 5 ml de NaCl 15 mM, citrato sódico 1,5 mM (I), adicionándose posteriormente ClNa, 1,5 M, citrato sódico 0,1 M, en proporción 1:9, con lo que resulta una solución final que es 0,15 M en NaCl y 0,01 M en citrato sódico (II).

Se repite en idéntica manera el proceso de desproteínización-precipi-

pitación con etanol e hilado del DNA, disolviéndose éste en 3 ml de I, llevándose a solución II por adición de ClNa, 1,5 M y citrato sódico 0,1 M en proporción de 1:9.

Se añade a continuación 0,05 mg/ml de RNA-asa, incubándose a 37°C, 30 min, a fin de hidrolizar el RNA que pudiera aún contaminar la preparación.

Finalmente, se repite una vez más el proceso de desproteización, precipitación con etanol e hilado. El DNA así obtenido se disuelve en 3 ml de I, añadiéndose bajo agitación 0,33 ml de acetato sódico 3 M en EDTA 1mM, pH 7. El DNA se precipita de la solución resultante con medio volumen de alcohol isopropílico. *El rendimiento* obtenido es de 1 a 2 mg de DNA por g de células empleado.

El precipitado se resuspende en solución II, conservándose a 0°C.

La concentración resultante del DNA se determinó por absorción ultravioleta a 260 nm, usándose un $\epsilon(P)$ de 6.740 (UNICAM, SP 700).

La actividad específica (determinada por conteo en centelleo líquido -II.7- con 1×10^5 c.p.m./vial) obtenida oscila entre $1-3 \times 10^6$ dpm/ μ g.

El estudio de la distribución de pesos moleculares del ^3H -DNA se realizó según se describe en II.5, usándose $2 \mu\text{g}$ ^3H -DNA en cada columna cromatográfica.

II.2.3. PREPARACION DE UN COMPLEJO DNA-HISTONA

Histona total de timo de ternera preparada según el procedimiento descrito por Johns (1967), se disolvió en 20 ml de ClNa 2M hasta una concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$; asimismo, el ^3H -DNA de Escherichia coli, se llevó hasta una concentración 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$, por dilución 1:20 con ClNa 2 M de 1 ml de la solución original (407 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Ambas soluciones se mezclan y el resultado (Histona y ^3H -DNA en concentración 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) se dializa durante 18 horas frente a 1,7 litros de ClNa 1 M a 0-4°C con agitación; durante este período se liberaron un total de $2,9 \times 10^5$ cpm; puesto que la eficiencia del conteo fue del 5% y la actividad específica del ^3H -DNA $2,47 \times 10^6$ dpm/ μg , puede estimarse una liberación de oligonucleótidos y nucleótidos (fracción NR+II de la cromatografía en DEAE celulosa) del 0,25% respecto al ^3H -DNA total que permanece en el interior de la bolsa de diálisis. A continuación, se siguieron dos días

lisis, la primera 6 horas frente a 2 l de ClNa 0,28 M y la segunda 48^h frente a 2 l de ClNa 0,035 M, ambas a la misma temperatura de 0-4°C.

II.3. CULTIVO DE PROTOZOOS

II.3.1. CULTIVO DE TETRAHYMENA PYRIFORMIS

a) Medio peptonado

Tetrahymena pyriformis, cepa W, se obtuvo de American Type Culture Collection (ATCC), manteniéndose en nuestros laboratorios en condiciones axénicas a 25°C. El medio empleado en su crecimiento consta de:

- proteosa-peptona	5,00 g
- triptona	5,00 g
- K ₂ HPO ₄ ·3H ₂ O	0,26 g
- H ₂ O destilada	1,00 l

El pH se ajusta a 7,2-7,4 con NaOH 1N

b) Medio definido

La composición del medio definido usado para el crecimiento de Tetrahymena pyriformis, es la siguiente:

K ₃ .citrato.H ₂ O	0,10	g
KH ₂ PO ₄	0,01	"
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,02	"
MgCO ₃	0,10	"
CaCO ₃	0,03	"
Fe(NH ₄) ₂ ·6H ₂ O	2,00	mg
MnSO ₄ ·H ₂ O	1,00	"
ZnSO ₄ ·H ₂ O	1,00	"
CnSO ₄ (anhidro)	1,30	"
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ ·4H ₂ O	0,50	"
CoSO ₄ ·7H ₂ O	0,01	"
NH ₄ VO ₃	0,01	"
L-Arginina HCl	0,04	g
L-Glutámico HCl	0,25	"
L-Histidina HCl.H ₂ O	0,25	"

L-Isoleucina	0,03	g
L-Leucina	0,05	"
L-Lisina HCl	0,03	"
L-Metionina	0,025	"
L-Fenilalanina	0,01	"
L-Treonina	0,03	"
L-Triptófano	0,012	"
L-Tirosina	0,005	"
L-Valina	0,015	"
Na ₂ Guanilato.H ₂ O	12,00	mg
Uracilo	6,00	"
Ca-Pantotenato	3,00	"
Acido nicotínico	2,00	"
Tiamina HCl	0,50	"
Na riboflavina PO ₄ .2H ₂ O	0,30	"
Piridoxamina.2HCl	0,10	"
Piridoxal HCl	0,10	"
Acido fólico	0,05	"
Acido D,L-Tiúctico	10,00	µg
Biotina	1,00	µg

Este medio fue propuesto en 1968 por Cox et al. Su esterilización se llevó a cabo por filtración a través de membranas "Millipore" de 100 nm de poro medio.

Las células, sembradas con asa de platino, mostraron un crecimiento análogo al desarrollado en el medio peptonado. El crecimiento fue positivo en todos los tubos sembrados, por dos veces consecutivas.

II.3.2. CULTIVO DE EUGLENA GRACILIS

Euglena gracilis, cepa z, se obtuvo igualmente de ATCC (American Type Culture Collection), manteniendo el cultivo en condiciones axónicas a 25°C, en la oscuridad.

En este caso se utilizó el medio de crecimiento.

- Glucosa 10,00 g
- Triptona 1,00 g
- H₂O 1,00 l

El pH se ajusta a 3,5 con ClH 1 .

II.4. EXPERIENCIAS DE INCORPORACION

II.4.1. EXPERIENCIAS DE INCORPORACION DIRECTA

Los cultivos crecidos con agitación magnética en Erlenmeyer de 250 ml, hasta alcanzar la fase logarítmica -el tiempo 2-4 días de crecimiento_ asegura un tamaño celular uniforme, por ser constante la velocidad específica de crecimiento en esta fase (Van Uden, 1970),- se recogen por centrifugación suave a 330 x g, 10 minutos, en una centrífuga "Wifug" (Labor). Se suspenden durante 10 minutos en el mismo medio en que se van a realizar las incubaciones y se vuelven a recoger en las mismas condiciones, resuspendiéndose definitivamente en el medio de incubación, y ajustándose el número de células entre 0,5 y 1×10^6 células/ml. Tras la resuspensión, las células entran en una fase latente de transición, en el caso de que el medio de incubación sea el de crecimiento del cultivo.

30 ml de este cultivo se incubarán bajo agitación magnética y a temperatura constante con ^3H -DNA de características conocidas (distribución de tamaños moleculares, concentración, actividad específica), estudiándose la captura en función de las siguientes variables experimentales:

- a) *Concentraciones* de ^3H -DNA, con un tiempo fijo de incubación.
- b) *Cinética en diferentes medios de incubación*: medios no nutrientes -soluciones de LiCl, NaCl, KCl (y NH_4Cl , sólo en *Euglena gracilis*) 35 mM a pH = 7-, soluciones de NaCl de diferentes fuerzas iónicas (sólo en *Euglena gracilis*), medios de crecimiento (el de *Euglena gracilis* a pH 7) y un medio definido para *Tetrahymena pyriformis* en presencia de efectores metabólicos (ATP, GTP). Asimismo se estudió la incorporación de un complejo DNA-Histonas de timo de ternera.
- c) *Cinética a diferentes temperaturas* (*Euglena gracilis*: NaCl 35 mM, *Tetrahymena pyriformis*: medio de cultivo completo).
- d) *Tamaño molecular* del ^3H -DNA empleado.

A diferentes tiempos de incubación, se extraen partes alícuotas de 0,5 ml o de 1 ml, por triplicado, y se filtran a través de membranas

Miliipore AAWP 0 2500, 25 mm Ø, poro medio 0,8 µ). Las células retenidas sobre el filtro se lavan dos veces con 5 ml del propio medio de incubación frío (0-4°C). El tercer lavado sólo arrastra el 0,6% de la radiactividad retenida por las células sobre el filtro.

En virtud de este tratamiento de lavados, se define el DNA ligado a las células, en el medio de incubación que se trate, como aquel que permanece en el filtro después del segundo lavado.

Los filtros se colocan en viales apropiados y las células se lisan por el procedimiento que se describe en II.5. La radiactividad se valora por centelleo líquido en un espectrómetro Nuclear Chicago "Unilux II".

Las modificaciones ocasionales a este procedimiento, se detallan en el Apéndice de esta Tesis.

II.4.2. CORRECCIONES A LOS DATOS EN LAS EXPERIENCIAS DIRECTAS

Para comparar los resultados de experimentos en los que se hayan utilizado diferentes relaciones µg ³H-DNA/10⁶ células, se ha considerado que la captura depende de la probabilidad de choque entre las células y el DNA, suponiéndose que el movimiento de las células y de las moléculas de DNA se produce al azar, lo que dado el elevado número de ambas, debe constituir una buena aproximación.

Todas las incorporaciones se han referido a una relación µg ³H-DNA/10⁶ células, igual a 10 (este es el caso de los diferentes experimentos de incorporación que se han utilizado para el estudio de la influencia del PM en la captura).

II.4.3. EXPERIENCIAS CON PULSOS DE ³H-DNA DE UN MINUTO DE DURACION

En tubos independientes se preincubaban, por triplicado, 2 ml de las células recogidas y lavadas como en II.4.1., con los biopolímeros:

a) DNA de timo de ternera.

b) RNA de levadura de alto grado de polimerización.

Asimismo se experimentó con el polímero sintético:

c) Poliglutámico (PG) de PM = 48000 daltons (308 residuos).

(Los tres se encuentran en soluciones de concentración igual a 1mg/ml).

Al cabo del tiempo de preincubación, se da un pulso de un minuto de

duración con 0,2-0,8 μg de ^3H -DNA de características conocidas. Cumplido el tiempo de recepción del ^3H -DNA (que se fija en 1 minuto), se toman alícuotas de 0,5 ml de las incubaciones individuales (tres tubos para cada medida de la incorporación y se filtran por separado, siguiendo con los filtros el mismo procedimiento que en II.4.1.

Las variables experimentales estudiadas con este procedimiento en ambos protozoos, fueron:

- a) Tiempos de preincubación con DNA de timo de ternera a concentración constante.
- b) Tiempos de preincubación con DNA de levadura (de polimerización elevada), a concentración constante.
- c) Tiempos de preincubación con Poliglutámico, 308 residuos, (PM = 47000), a concentración constante.
- d) Concentraciones diferentes de DNA de timo de ternera en la preincubación, a tiempo fijo.
- e) Concentraciones diferentes de RNA de levadura en la preincubación, a tiempo fijo.
- f) Concentraciones diferentes de poliglutámico en la preincubación a tiempo fijo.

Igualmente que en II.4.1., los detalles de cada experimento particular, se relacionan en el *Apéndice*.

II.4.4. CORRECCIONES A LOS RESULTADOS DE LAS EXPERIENCIAS CON PULSOS DE 1' CON ^3H -DNA

a) Al igual que en los experimentos de incorporación directa, los resultados se corrigen para una misma relación $\mu\text{g } ^3\text{H-DNA}/10^6$ células. Ello se debe a que se opera con diferentes volúmenes de incubación por efecto de la dilución introducida al preincubar con diferentes concentraciones de los biopolímeros antes citados, que se encuentran siempre en soluciones de 1 mg/ml de concentración de las que se toman los μl convenientes, en cada caso, para alcanzar la concentración deseada en la preincubación. Este factor de dilución, se ha considerado a partir de 10 μl de exceso sobre el volumen de incubación de referencia (2 ml, salvo excepciones. Véase el *Apéndice*).

b) Del mismo modo, por efecto de la dilución se ha de corregir el número de células, ya que el número de éstas filtradas disminuye con respecto al número de células/ml del cultivo de partida, toda vez que se toma el mismo volumen alícuota para filtrarlo y contarlo, y en las concentraciones superiores hay ya una dilución apreciable.

II.4.5. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE DATOS

Para el estudio estadístico de los resultados experimentales se ha supuesto que las medidas verifican una distribución estadística de probabilidad de Student, definida por la función $S_n(t)$, tabulada por Cramer (1960). La función $S_n(t)$ nos da la probabilidad de encontrar una cierta desviación t a la media y es la adecuada cuando, como en nuestro caso, sólo se dispone de un número reducido de medidas.

En cada situación experimental, se hacen tres medidas de la radiactividad incorporada por la célula. El *valor verdadero*, se estima por la media aritmética:

$$m = \frac{\sum_{i=1}^3 m_i}{3}$$

que se representa siempre como ordenada, acompañada de una barra acotada a los valores de $\pm E_\sigma$, siendo E_σ el *error externo absoluto* particular del punto que se trate, definido por la expresión

$$E = \frac{\sigma}{\sqrt{N}}$$

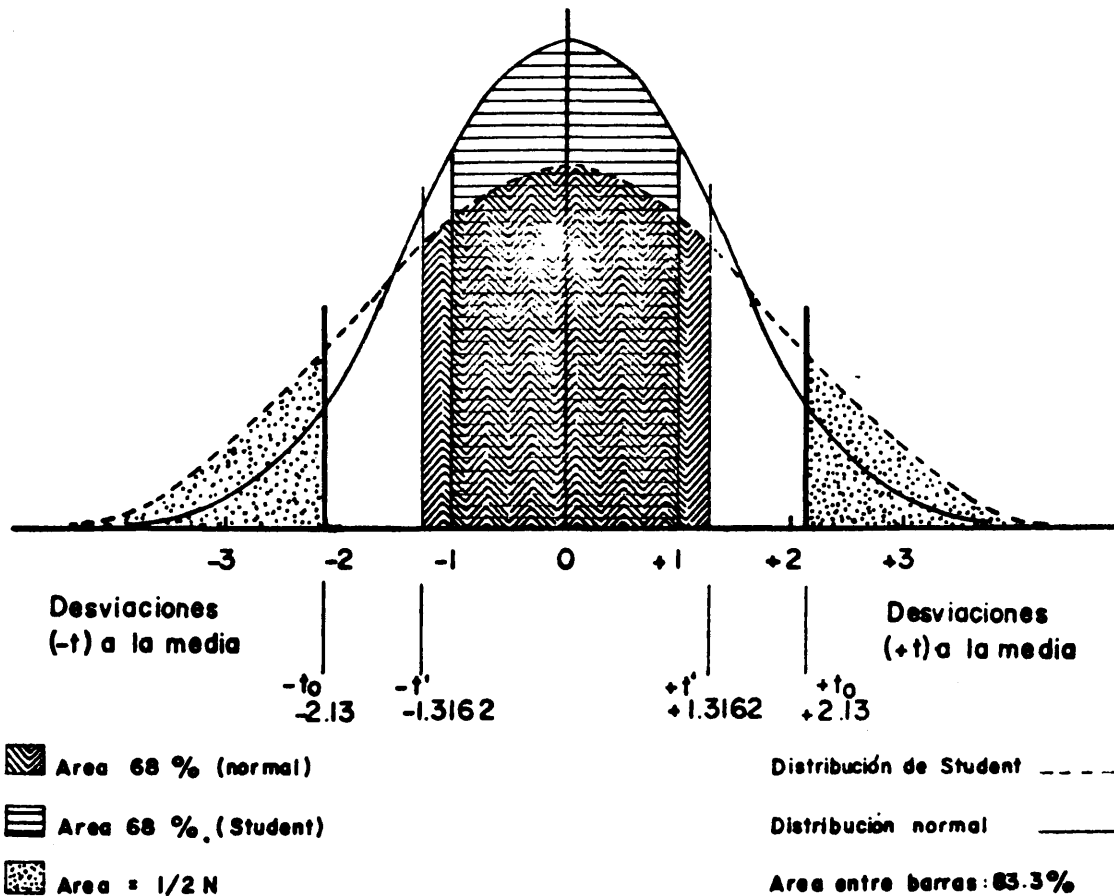
en donde N es el número de medidas, que como ya se ha dicho es igual a 3, y σ es la *desviación típica* de la distribución definida como:

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^3 (m_i - m)^2}{N-1}} \times t'$$

donde t' es el parámetro de Student para dos grados de libertad y el 68% de confianza, obtenido de la tabla de Cramer por interpolación parabólica, resultando un valor de 1,3162.

II.4.5.1. Criterio de Chauvenet

El criterio de Chauvenet puede enunciarse de acuerdo con Worthing y Gettner en los términos siguientes: "Ninguna medida puede ser desecharse de una muestra estadística de N medidas ($M_1, M_2, M_3, \dots, M_N$), si su desviación t a la media es tal que la probabilidad $S_n(t)$ de encontrar una desviación mayor sea menor de $1/2 N$ ".



Así pues, de acuerdo con Chauvenet, desecharemos aquellos puntos cu ya desviación t a la media sea superior a una cierta t_0 tal que:

$$1 - P(t < t_0) = 1 - \int_{-t_0}^{t_0} S_n(t) dt = \frac{1}{2N} \quad (A)$$

el número de grados de libertad de la distribución, en nuestro caso, es igual a 2. De la segunda igualdad de la ecuación (A).

$$\int_{-t_0}^{t_0} S_n(t) dt = \frac{2N - 1}{2N}$$

Para $n = 2$:

$$\int_{-t_0}^{t_0} S_2(t) dt = \frac{5}{6} = 0,833$$

Por lo tanto, la probabilidad de encontrar un valor de $t > t_0$, será $1 - 0,833 = 0,167$ (16,7%). El valor de t_0 que satisface esta condición, se deduce por interpolación parabólica en la tabla de Cramer para un 16,7% de probabilidad de error, resultando igual a 2,13.

Hemos de calcular también el valor de t' tal que

$$\int_{-t'}^{t'} S_n(t) dt = 0,68$$

es decir, *el que nos da confianza típica*. Como ya se dijo el valor de este parámetro de Student es, para dos grados de libertad 1,3162.

Con este valor podemos definir el *coeficiente de Chauvenet*, como $C = t_0/t' = 1,62$, que nos permitirá dudar de la validez de aquellas ternas cuya desviación típica porcentual sea mayor o igual a 1,62 veces la desviación típica porcentual estimada: como estimación de la desviación típica porcentual de cada experimento, se ha tomado la media aritmética de todas las desviaciones típicas porcentuales de los puntos (ternas) del experimento concreto que se está analizando.

$$\bar{\sigma}_P = \frac{1}{T} \sum_{i=1}^T \frac{1}{m} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^3 (m_i - m)^2}{N - 1}} \times 100$$

En todas las ternas de un experimento dado en que se produzca la situación de que su σ particular sea mayor que $1,62 \bar{\sigma}_P$, desecharemos aquella medida que más se desvíe de la media, hecho lo cual se calculará una nueva media con las dos medidas restantes, así como su nueva des-viación típica y su nuevo error externo absoluto, para su representa-ción gráfica junto con la nueva media.

II.5. PROCEDIMIENTO PARA EL LISADO DE LAS CELULAS

II.5.1. LISADO DE TETRAHYMENA PYRIFORMIS

La lisis total de las células es necesaria tanto en los estudios de incorporación de ^3H -DNA, como en los de la distribución de tamaños moleculares del ^3H -DNA incorporado. En el primer caso, para hacer homogéneo el medio de conteo en el vial de centelleo líquido y en el segundo, para liberar el ^3H -DNA de los compartimentos celulares que haya alcanzado y hacerlo asequible para el DEAE-celulosa cambiador.

Para los estudios de incorporación, los filtros se introducen en un vial y se les añade 1 ml de una solución de lauril-sulfato sódico 0,2% EDTA 0,1 M, ClNa 0,14 M en etanol 25%. En los casos en que fueran a realizarse estudios de la dispersión del tamaño molecular, a esta solución se le añadieron 100 μl de una solución 1 mg/ml de DNA de timo de ternera frío. Como control del ^3H -DNA de partida se lisaron células en las mismas condiciones sin incubación previa con ^3H -DNA, añadiéndose éste para su cromatografía en cantidad variable (0,2 mg-1,5 g por vial), después de efectuarse la lisis en idénticas condiciones a las descritas anteriormente.

II.5.2. LISADO DE EUGLENA GRACILIS

El método seguido es una modificación del descrito por Parenti et al. (1969).

Como es sabido, *Euglena gracilis*, está provista de una película proteica, interna a la membrana plasmática, que protege a la célula del exterior haciendo las veces de esqueleto celular. Esta peculiaridad hace que dicho organismo no lise por la sola acción de detergentes iónicos, como el lauril sulfato sódico, incluso estando éste a saturación y a la temperatura ambiente.

De este modo, se utiliza un método de lisis basado en una digestión de las células, 20 minutos a 37°C , con enzimas proteolíticas en ClNa 0,35 M (pronasa o proteasa pancreática 2 mg/ml) que destruyen la película, en presencia de un detergente no iónico que disuelve la membrana celular pero no la nuclear (Nonidet P40) 2%, v/v. No obstante, por ser el medio fuertemente hipotónico, los núcleos lisan también aunque sólo en parte.

A continuación se añade 1 ml de lauril sulfato sódico al 0,2% en ClNa 0,14 M - EDTA 0,1 M en etanol 25% obteniéndose un homogeneizado celular en el que se han destruido ya todos los orgánulos capaces de albergar DNA.

El tiempo de lisis se fijó en 2 minutos a partir de la adición del lauril sulfato sódico.

Cuando se persigue el estudio del estado molecular del DNA asociado a las células, se procede de igual manera pero utilizándose la *pronasa autodigerida* durante 50 minutos a 65°C, 2-3 horas a 39°C y 18 horas a la temperatura ambiente, añadiéndose 150 µg de DNA de timo de ternera antes de realizar la incubación con enzimas proteolíticas. Se realizó un control análogo al empleado en *Tetrahymena pyriformis*: antes de la proteolisis, se añade 1 µg de ³H-DNA, se incuba 20 minutos a 37°C y se añaden las células no radiactivas adheridas al filtro y la solución de lisado cromatografiándose por duplicado.

II.6. CONTROL DEL TAMAÑO MOLECULAR DEL DNA INCORPORADO

Se usó el método descrito por Dávila (1965), de cromatografía discontinua centrifugada sobre pulpa de DEAE-celulosa.

0,5 g (peso seco) de DEAE-celulosa equilibrada con "eluyente II", se empaqueta en columnas de cromatografía especialmente diseñadas, compuestas de dos cuerpos separables; la base del cuerpo superior está perforada de manera que permita fácilmente el paso de los eluyentes cromatográficos, pero reteniendo la celulosa cambiadora que se apoya sobre ella.

En el cuerpo inferior (atornillable al superior) se recogen los eluyentes tras pasar éstos de forma discontinua y sucesiva a través de aquélla. Este paso se fuerza por centrifugación suave (200 rpm) durante 2 minutos.

0,5 ml de lisado se añaden a una columna equilibrada con 5 c.c. de "eluyente II" (el lisado total -1 ml- se reparte así en dos columnas), añadiéndose posteriormente 4,5 c.c. de "eluyente II". Tras el centrifugado y recogida de la fracción correspondiente, la columna se lava con 10 c.c. de eluyente II de nuevo, computándose estas dos primeras como "Fracción no retenida" (NR). Secuencialmente se añaden y recogen los siguientes eluyentes (10 ml/fracción), que arrastran sucesivamente no-

lécúlas de mayor tamaño. El peso molecular de cada fracción fue estimado por Dávila, Charles y Ledoux (1965) mediante la determinación de las viscosidades de cada eluido. Mingot y Dávila (1974) han revisado los valores de los pesos moleculares de las fracciones mediante ultracentrifugación y viscosimetría.

La composición de cada eluyente y el tamaño molecular de la fracción de DNA por ellos liberadas de la columna, se detalla en la siguiente tabla:

Eluyente	Composición	Tamaño molecular
II	PO_4H^- 0,01M, NaCl 0,14M (pH 7)	Nucleótidos, oligonucleótidos
III	PO_4H^- 0,01M, NaCl 0,50M (pH 7)	Oligonucleótidos hasta 1×10^6
IV	PO_4H^- 0,01M, NaCl 1 M (pH 7)	1×10^6 daltons
V	2 M NaCl, NH_4OH 0,2 M	3×10^6 daltons
VI	2 M NaCl, NH_4OH 0,4 M	10^7 daltons
VII	2 M NaCl, NH_4OH 1 M	2×10^7 daltons
VIII	NaOH 1 M	5×10^7 daltons

El conteo de la radiactividad de cada fracción se llevó a cabo por centelleo líquido, añadiéndose alícuotas de 2 c.c. a 15 c.c. del líquido de conteo descrito (II.7).

Los resultados de las cromatografías se expresan en tanto por ciento de las desintegraciones por minuto de las fracciones polimerizadas (III-VIII). La determinación de la eficiencia del conteo de cada fracción (que posibilita el cálculo de las dpm a partir del número de cuentas por minuto registrado en el contador) se efectuó por el método de estandar interno descrito en II.8. Los valores hallados suponen la media de dos columnas.

Se estudió por igual método la distribución de tamaños moleculares del ^3H -DNA no captado por la célula (lavado solución salina), o liberado por la acción de lavados adicionales de las células sobre el filtro con ácido iodoacético 0,08 M. Alícuotas de 1 y 2 c.c. respectivamente se usaron para cargar en idéntica manera las columnas de DEAE-celulosa.

El peso molecular promedio en peso del DNA, se estima sumando los productos de la fracción molar de cada tamaño molecular y dividiendo el resultado por el peso molecular determinado para esa fracción

$$\overline{PM}_p = \sum xi/Mi, \text{ determinado por Mingot y Dávila (1974)}$$

El número de moléculas que cada fracción (de 1 gramo de $^3\text{H-DNA}$) tiene, se calcula por la fórmula

$$\left[\frac{\text{N}^\circ \text{ moléculas}}{\text{g DNA}} \right]_i = \frac{xi}{Mi} \cdot N_A$$

xi = fracción molar

Mi = Peso molecular de la fracción i -eluida

N_A = Número de Avogadro

(Véase experimentos de influencia del PM en la captura de $^3\text{H-DNA}$).

II.7. CESION DE PROTEINAS EN MEDIO NO NUTRIENTE (NaCl 0,035M)

2 litros de sendos cultivos de *Euglena gracilis* y *Tetrahymena pyriformis*, en fase logarítmica se recogieron por centrifugación a 330 xg, 10 minutos, se lavaron dos veces y se resuspendieron en medio no nutritivo, ajustándose el número de células a 4×10^6 por c.c. El cultivo se mantiene con agitación mecánica (Incubator - Shaker, N.B.) a 25° xg, filtrándose el sobrenadante (Millipore 0.8) para eliminar toda posible célula.

La cantidad de proteínas se determinó según el método de Lowry et al. (1951). A 1 c.c. de muestra se añaden 5 c.c. de una solución recientemente preparada y compuesta de 50 partes de Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0,1N y 1 de CuSO_4 al 1% en tartrato sódico-potásico al 0,5%. Tras agitar bien, la reacción se deja transcurrir a temperatura ambiente durante 30 minutos, al cabo de los cuales se añaden, agitando inmediatamente 0,5 c.c. de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido (1 a 3) en H_2O d. Se deja en reposo 40 minutos, determinándose la absorbancia a 500 nm.

La concentración proteica se determina por interpolación de los valores obtenidos en gráfica patrón construida en idénticas condiciones de reacción, con cantidades (de 0,1 a 1 mg/ml) de albúmina bovina.

II.8. METODOS ISOTOPICOS

La determinación de la radiactividad presente en las muestras ensayadas se realizó en un espectrómetro de centelleo líquido Unilux II, Nuclear Chicago, provisto de dos canales de contaje. El cálculo de las eficiencias de contaje se realizó por el método de estandar interno, usándose en cada caso agua tritiada de actividad conocida como fuente radiactiva.

Se emplearon viales provistos de tapones de plásticos con arandela de cierre, conteniendo cada vial 15 c.c. de líquido de contaje. La composición de éste es la siguiente:

PPO	7,00 g
POPOP	0,25 g
Naftaleno	60,00 g
Dioxano	600,00 c.c.
Etanol abs	150,00 c.c.
Etilenglicol	250,00 c.c.

filtrándose el líquido a través de papel de filtro.

II.8.1. CONTAJE DE ^3H

II.8.1.1. Determinación del espectro de energías

Se añadieron 2 c.c. de H_2O destilada conteniendo 25 μl de $^3\text{H}_2\text{O}$ (360.000 dpm) a un vial de contaje con 15 c.c. de líquido de centelleo. El espectro de energía se determinó en dos condiciones de atenuación (A0 sin atenuación y B0), midiéndose intervalos de discriminación 0.2 unidades durante 40 segundos. El empleo de atenuación (B0) traslada la región del máximo contaje a zonas de baja energía, penetrando en regiones de alto ruido de fondo del aparato. Esta situación se resuelve suprimiendo la atenuación (A0) y trasladando así la región del máximo contaje a zonas de energía más alta. Para el cómputo del contaje se eligió el límite inferior de 0.5, suponiendo las cpm despreciadas por debajo de este límite el 1% de las totales. El límite superior del espectro se selecciona en 8,5 por encima del cual no existen impulsos del isótopo sobre el ruido de fondo.

El espectro se dividió en dos zonas; 0,5-3,5 y 3,5-8,5 registrándose en el Canal A del aparato las cuentas totales el espectro (0,5-8,5) y en el Canal B las del intervalo 0,5-3,5. El cociente B/A es función del "quenching" proporcionado por cada disolvente y expresa una magnitud proporcional a la eficiencia del contaje. El control, para cada "quenching" usado, de la relación B/A permite detectar desviación de la eficiencia del contaje por cualquier error experimental cometido. En todos los casos en que habrían de reducirse los valores en cpm a picogramos de ^3H -DNA por célula, se introdujeron patrones para el cálculo exacto de la eficiencia, variando ésta entre el 2% y el 10%.

II.8.1.2. Cálculo de la eficiencia de contaje

A viales con 15 c.c. de líquido de contaje se añadieron 2 c.c. de cada uno de los disolventes empleados en nuestras experiencias (eluyentes de cromatografía recogidos después de atravesar una columna patrón, soluciones de lavado del filtro con células, soluciones de lisado con células y filtro, etc) y 25 μl (450.000 dpm) de $^3\text{H}_2\text{O}$. En la siguiente tabla se expresan las eficiencias de cada disolvente, así como la relación B/A y el factor de conversión cpm \rightleftharpoons dpm.

TABLA DE EFICIENCIAS

Disolventes	Eficiencia	B/A	Factor cpm \rightleftharpoons dpm
Eluyente II	0.071	0.764	14,08
Eluyente III	0.064	0.777	15,62
Eluyente IV	0.059	0.788	16.94
Eluyente V	0.053	0.797	18.86
Eluyente VI	0.051	0.805	19.60
Eluyente VII	0.049	0.801	20.40
Eluyente VIII	0.047	0.800	21,27
NaCl, 70 mM	0.050	0.799	20,27
T. Pyriformis, Sol. lisado	5-9%	(patrones)	
Euglena gracilis, idem	2-10%	(patrones)	

II.9. METODOS AUTORRADIOGRAFICOS

II.9.1. INCORPORACION DE ^3H -DNA

500 ml de un cultivo de *Tetrahymena pyriformis* en fase logarítmica, se centrifugaron a 330 xg 10 minutos, resuspendiéndose las células en medio de cultivo nuevo hasta 10^6 células/ml (18 ml de volumen total), en dos matraces independientes de 25 ml, en donde se mantuvieron con agitación magnética. Las incubaciones con ^3H -DNA se hicieron en dos situaciones experimentales distintas:

- a) En presencia de DNA de timo de ternera, 1 minuto, en concentración final 0,1 mg/ml (Adición de 2 ml de una solución 1 mg/ml en NaCl 0,28 M).
- b) En ausencia de DNA de timo de ternera. En su lugar se añadieron 2 ml de NaCl 0,28 M.

En ambos casos, al minuto de las adiciones citadas, se dio un pulso con ^3H -DNA de 1 minuto de duración, transcurrido el cual las incubaciones se fijaron inmediatamente en frío (baño de hielo - ClNa a 0-1°C) con una mezcla de metanol - acético (3:1), durante media hora.

II.9.2. PREPARACION Y REVELADO DE LAS AUTORRADIOGRAFIAS

Las células así fijadas, se centrifugaron a la misma temperatura en una centrífuga SORVALL C-2, rotor SS-34. El sobrenadante se desechó y se procedió con las células a su deshidratación, por la acción se cuencial de:

Etanol 40% (1 vez)
Etanol 70% (2 veces)
Etanol 90%
Etanol 96%
Etanol absoluto (2 veces)

El tiempo de permanencia en cada disolución alcohólica fue de media hora. A continuación, las células se trataron durante igual tiempo con

alcohol absoluto-benceno (1:1) y, posteriormente, con benceno, incluyéndose en parafina a 57°C durante 2 horas 30 minutos. Las células se sedimentaron por centrifugación a igual temperatura, y los bloques se cortaron con un microtomo Reichert-Wien, ajustándose el grosor del corte a 6 micras.

Los cortes se extendieron sobre láminas portaobjetos recubiertos de albúmina glicerizada, desparafinándose con tolueno, y se lavaron con ácido perclórico 5% en frío durante media hora y con agua durante una hora. A continuación, los portaobjetos se recubrieron por inmersión de una capa de emulsión fotográfica "Ilford L4" (a 20°C), procediendo la impresión en la oscuridad durante un tiempo de exposición de 12 días.

Se usó revelador Kodak D-19 (rápido de grano fino) durante 8 minutos deteniéndose el revelado con detenedor Kodak SB5A (15 segundos). Se empleó fijador Kodak ácido (15 minutos), lavándose a continuación con agua 1/2-1 hora. De cada una de las situaciones experimentales descritas, se separaron cuatro preparaciones para su observación microscópica directa y el resto se sometió a un procedimiento previo de tinción que se detalla en la sección siguiente.

II.9.3. TINCIÓN Y FOTOGRAFIA

Se empleó el método de Feulgen, permaneciendo los portaobjetos tras el revelado autorradiográfico en HCl 1N a temperatura ambiente durante un minuto y a 56°C durante ocho minutos, lavándose abundantemente con agua destilada antes de teñirse con fuschina (incolores) durante 30 minutos.

La solución de fuschina se preparó previamente de la siguiente manera:

Se disolvieron 2 g de fuschina en 200 c.c. de agua destilada caliente, añadiéndose a continuación 20 c.c. de HCl 1N, dejándose hervir durante 3-4 minutos antes de enfriar hasta temperatura ambiente. Se añadió entonces 1 g de metabisulfito sódico anhidro, dejándose reposar 24 horas en frasco transparente. La solución de fuschina se decoloró dos veces con 1 y 0,5 g, respectivamente de carbón activo, filtrándose por papel de filtro y almacenándose hasta su uso a 4°C en frasco tapado.

Tras la tinción con fuschina, los portaobjetos se lavaron con:

- H₂O destilada (2 veces).

- Solución de metabisulfito sódico (1 g en 100 c.c. de H₂O de 1 c.c. HCl conc.).

- H₂O destilada.

Las células se contrastaron con verde luz (un minuto), lavaron con etanol 96% (2 veces) y etanol absoluto, aclarándose con tolueno antes de montar en bálsamo del Canadá.

La observación y fotografía de las preparaciones se efectuó a 100 x usándose un microscopio "Nikon" AFM-10, provisto de control automático del tiempo de exposición. Se empleó película Kodak de 25 ASA.

Asimismo, se fotografiaron las preparaciones sin tefir para controlar la presencia de posibles alteraciones durante el proceso de tinción.

III. a. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN TETRAHYMENA PYRIFORMIS, CEPA W

III.a.1. INCORPORACION DIRECTA DEL ^3H -DNA PRESENTE EN EL MEDIO DE INCUBACION POR CELULAS DE TETRAHYMENA PYRIFORMIS

Se han observado *variaciones en la cuantía* de la incorporación de DNA exógeno, en dependencia de diferentes condiciones experimentales a las que se sometieron los cultivos.

Dichas situaciones fueron:

A) Respecto del estado del cultivo; experimentos cinéticos.

1. *Diferentes medios de incubación.* Medio nutriente (idéntico al del crecimiento) y medios no nutrientes (soluciones catiónicas 0,035 M).
2. *Diferentes temperaturas,* en medio nutriente.
3. *Efectores metabólicos* en un medio definido. (ATP y GTP).

B) Respecto del estado del DNA exógeno.

1. *Diferentes grados de polimerización* (experimentos cinéticos).
2. ^3H -DNA formando un complejo con *Histona* total de timo de ternera.
3. *Diferentes concentraciones* de ^3H -DNA (experimento a tiempo de incubación constante).

III.a.1.1. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE ^3H -DNA EN EL MEDIO DE INCUBACION NO NUTRIENTE

Se observa un *aumento lineal* (Fig. 1), de la incorporación, para concentraciones de ^3H -DNA presente en el medio comprendidas en el interva-

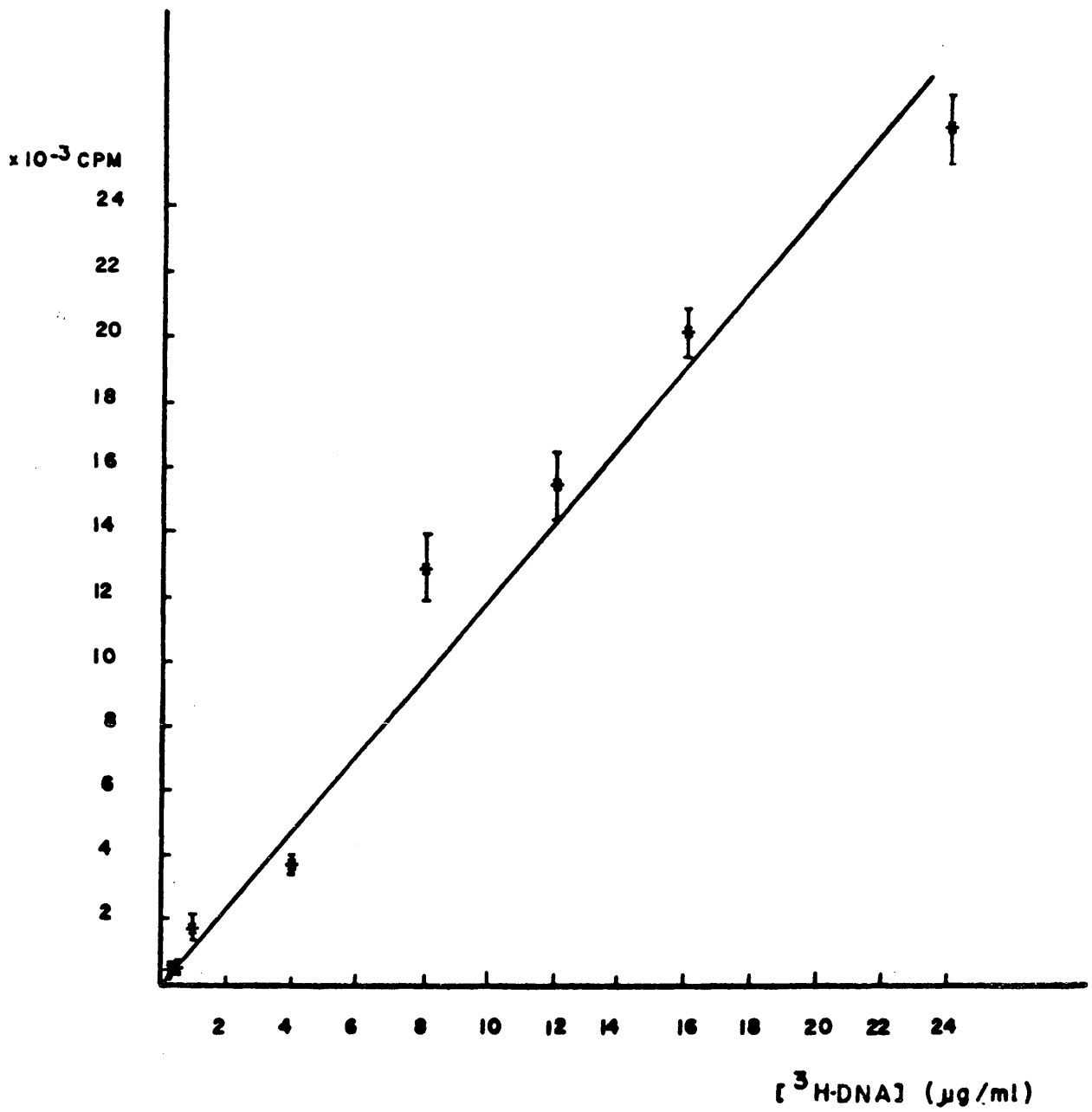


FIGURA 1.- Influencia de la concentración de ³H-DNA en su captura directa del medio por células de Tetrahymena. Tiempo de incubación: 10 minutos. Medio no nutritivo.

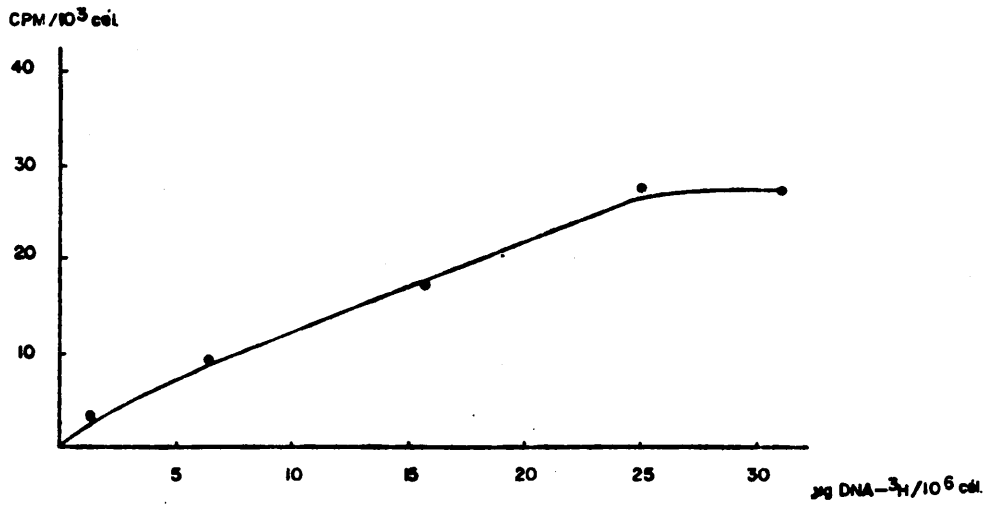


FIGURA 2.- Influencia de la concentración de ³H-DNA en su captura directa del medio por células de Tetrahymena. Tiempo de incubación: 15 minutos (saturación). Medio no nutriente.

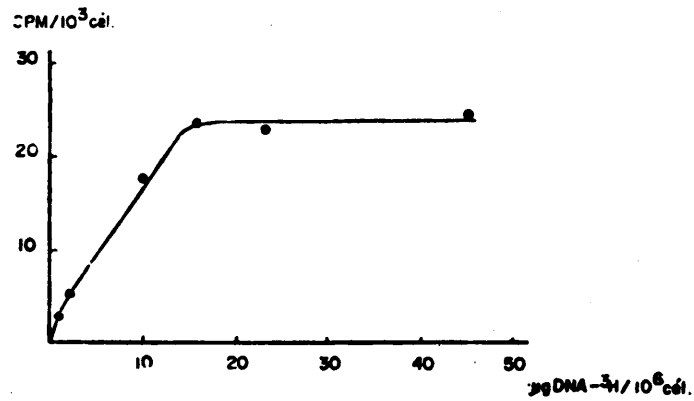


FIGURA 3.- Influencia de la concentración de ³H-DNA en su captura directa del medio. Medio nutriente.

lo de 0,24 $\mu\text{g/ml}$ a 24 $\mu\text{g/ml}$, utilizándose una concentración de células de aproximadamente $9,5 \times 10^5$ y un tiempo de incubación de 15 minutos. Estas células fueron recogidas en un estadio temprano de su curva normal de crecimiento, momento en que presentan una *distribución estadística de tamaños* mayores que en cualquier otro punto de aquella. No hay pues contradicción aparente con los datos referidos por Díaz de Espada (1972, pág. 59), obtenidos con otro lote de biopolímero y diferente número de células por ml, de un cultivo distinto (Fig. 2). La incorporación de DNA a Tetrahymena, debe estar relacionada -al menos en su primera etapa- con el *tamaño medio de las células*, de modo que pueda establecerse una proporcionalidad entre la superficie total del cultivo y su capacidad para asociar $^3\text{H-DNA}$.

Los datos precedentes referidos, indicaban una saturación del proceso de ingestión del $^3\text{H-DBA}$, que se estabilizaba a concentraciones de 25 $\mu\text{g } ^3\text{H-DNA}/10^6$ células, si el tiempo de incubación era de 15 minutos (Fig. 2).

Un efecto similar (Díaz de Espada, 1972, pág. 61) se detectó en el medio de crecimiento completo, si bien aparecieron diferencias cuantitativas. (Fig. 3).

III.a.1.2. CINÉTICA DE CAPTURA DE $^3\text{H-DNA}$ EN MEDIOS NO NUTRIENTES

Son notables las *diferencias en las cinéticas de captura* de DNA exógeno exhibidas por *T. pyriformis* en medios de incubación constituidos por soluciones de LiCl , NaCl y KCl 0,035 M (Fig. 4).

La *regulación iónica en Tetrahymena* fue estudiada ampliamente, mediante técnicas de intercambio isotópico, por Dunham y Child (1961), demostrándose que *T. pyriformis*, cepa W, crecida en proteosa-peptona 2% (como la utilizada por nosotros) mantiene una alta concentración protoplásmica de ión potasio y baja de ión sodio. Los datos de estos autores revelan una concentración de potasio en el interior, al menos seis veces mayor que la encontrada en el medio externo, siendo sólo de un tercio la misma relación para el ión sodio. En un medio más diluido, la relación K^+ interior/ K^+ exterior alcanza cotas superiores a 100.

Cuando gradualmente se incrementa la concentración exterior de potasio, hasta un nivel de 11 mM, se observa que la concentración de potasio en el interior aumenta de forma acentuada. Entre 11 mM y 140 mM, el

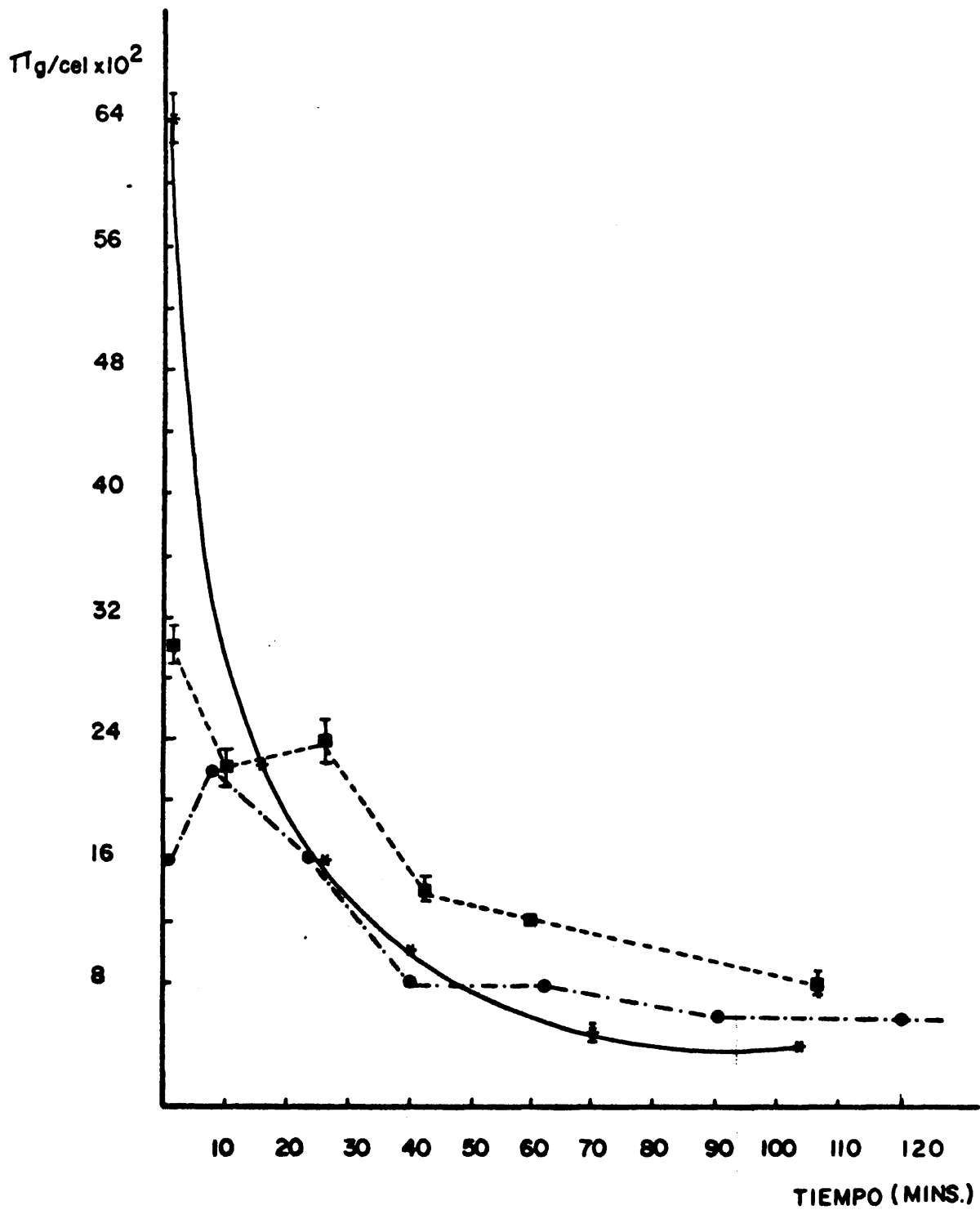


FIGURA 4.- Cinéticas de incorporación directa del medio -no nutriente- de ³H-DNA, por células de Tetrahymena. —*— NaCl; --■-- LiCl; ---●--- KCl; (las tres sales a concentración 35 mM).

mismo incremento se manifiesta con carácter lineal, alcanzándose rápidamente el estado de equilibrio K^+ interior $\rightleftharpoons K^+$ exterior. El aumento de potasio interior, no va asociado con la correspondiente pérdida de sodio, sugiriéndose que ambos iones siguen *modelos independientes, en cuanto a su transporte*, a través de la superficie de Tetrahymena.

La respuesta de *T. pyriformis*, cepa W, a cambios en la concentración de ión sodio, es también diferente de la exhibida respecto al potasio: desde niveles externos 5 mM, hasta 20 mM, el Na^+ en el interior se mantiene constante, demostrando la existencia de un mecanismo de extrusión para el sodio. Por encima de 20 mM en el medio la concentración interior de sodio aumenta linealmente, siendo mayor el lapso de tiempo necesario para alcanzarse el estado de equilibrio que en el caso del ión potasio.

Posteriormente, Andrus y Giese (1963) tras comprobar los datos de Dunham y Child, pusieron de manifiesto que agentes inhibidores del metabolismo o *modificaciones de las propiedades de membrana* (anoxia, ácido iodoacético, azida sódica y 2,4-dinitrofenol), provocaban una pérdida del 30-35% de potasio interior, sin variación efectiva en los niveles de sodio; así pues, mientras el mecanismo concentrador de potasio resultaba perjudicado, el proceso de salida de sodio quedaba sin modificar por estos agentes, concluyéndose la independencia de ambos fenómenos de transporte.

A la vista de los datos de Dunham y Child (1961) y Andrus y Giese (1963) no son de extrañar las *grandes diferencias cinéticas* encontradas por nosotros, para la captura (*recepción y ganancia neta*) de 3H -DNA (Fig. 4). El sometimiento experimental de *Tetrahymena* a medios en los que sólo uno de los cationes está presente, debe producir cambios profundos en la fisiología del protozoo, manifestándose una cinética de incorporación de DNA radicalmente diferente, tal vez por modificarse ciertos sistemas incorporados a la superficie celular, ligados, directa o indirectamente, a los sistemas de transporte reguladores del equilibrio iónico.

Podemos destacar que, mientras el potasio provoca pocas variaciones en los niveles capturados, en presencia de iones sodio exclusivamente, aparece la cinética reseñada por Díaz de Espada (1972, pág. 52), encontrada cuando la incubación se realiza en un medio de crecimiento completo (proteosa peptona, bacto triptona y sales minerales) en el que ambos iones deben estar en niveles sobre abundantes (Fig. 5).

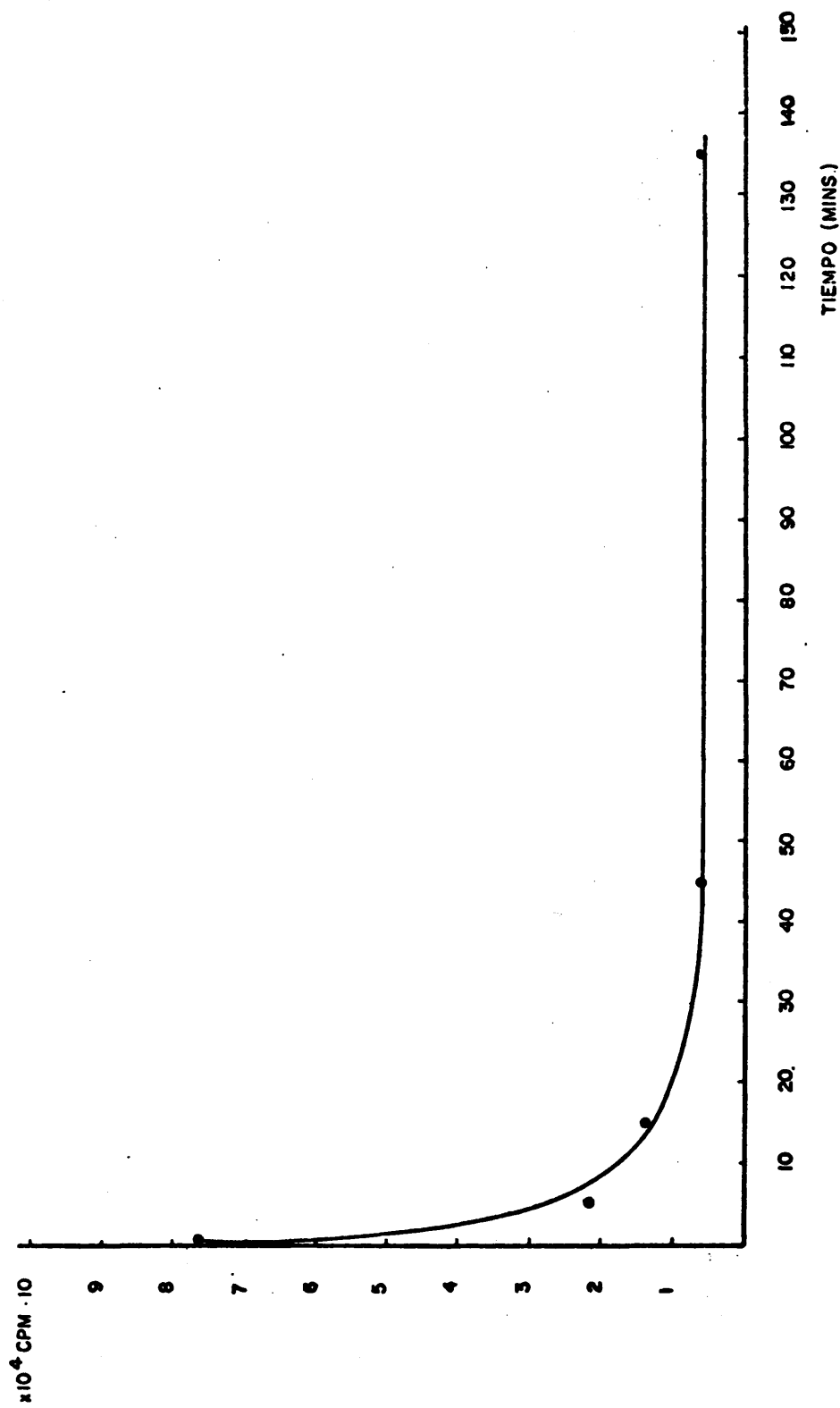


FIGURA 5.- Cinética de incorporación directa del medio -nutriente- de ³H-DNA, por células de *Trichomonas vaginalis*.

El fenómeno de descenso en la incorporación con el tiempo no ocurre en células de otras procedencias (Dubnau y Cirigliano, 1972; Robins y Taylor, 1968; Regan y Volkin, 1973), donde se describen cinéticas de captura lineales y ascendentes.

En ausencia de iones sodio (incubaciones en KCl y LiCl, no se detecta el fenómeno de captura rápida-cesión gradual, definido, en dos fases sucesivas, por un alto nivel de ^3H -DNA unido a Tetrahymena en tiempos de incubación muy cortos (1' 15"-1'30") seguido de un lento proceso de liberación, posiblemente en los dos sentidos endocitótico y hacia el medio exterior.

Este fenómeno, sin embargo, aparece siempre que pueda sospecharse la presencia del ión sodio en el medio externo; dada la escasa magnitud del tiempo de incubación a la que estas diferencias se observan, cabe atribuir esta acción del ión sodio a efectos producidos en la superficie celular, de modo que una concentración exterior de sodio, en el intervalo milimolar, puede hacer a aquella más electropositiva por efecto de su interiorización. En esta situación, el ^3H -DNA sería fuertemente atraído y retenido (tiempos cortos). Pero a causa de la presencia del ^3H -DNA como polianión en la superficie celular, se establecería una situación diferente en el equilibrio osmótico, con salida masiva de iones positivos (a la que se superpondría la provocada por el normal mecanismo de extrusión de Dunham y Child); esta reestructuración de las concentraciones iónicas del interior y exterior de la célula, determinaría la cesión abrupta del ^3H -DNA adherido, observada entre tiempos de 2 y 15-20 minutos. En apoyo de esta idea se encuentran los datos obtenidos por Díaz de Espada (1972, pág. 53) reveladores de un aumento exponencial de la radiactividad encontrada en el medio a tiempos superiores a 2 minutos (Fig. 6). Un mecanismo de este tipo, puede ser suficiente para explicar, al menos, las notorias diferencias de las cinéticas de captura encontradas para los distintos cationes.

En presencia de potasio, se observa un aumento lento y suave de los niveles de ^3H -DNA incorporados entre los 10 primeros minutos; a partir de este tiempo el descenso de la cantidad de ^3H -DNA retenido por Tetrahymena no es, en modo alguno, pronunciado y continúa hasta alcanzar los mismos niveles que en medios NaCl y LiCl, a tiempos más largos. Así pues, la presencia del DNA en la superficie, no provoca la salida de iones positivos cuando en el medio sólo hay K^+ (o Li^+), posiblemente a causa de

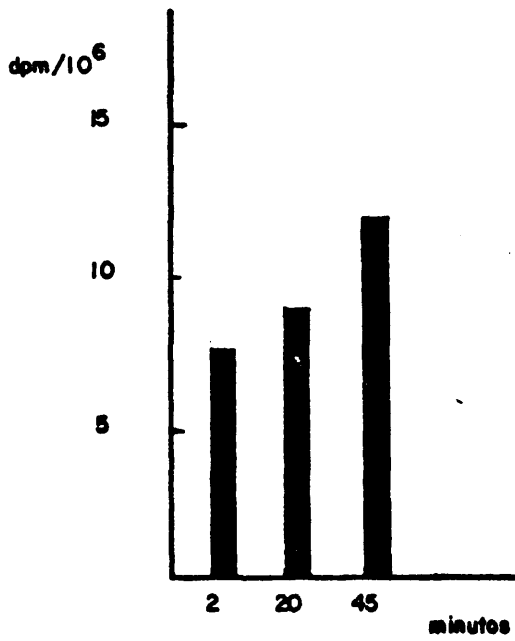


FIGURA 6.- Aumento progresivo de la radiactividad, liberada hacia el medio de incubación, por células de *Tetrahymena pyriformis*. Medio nutriente.

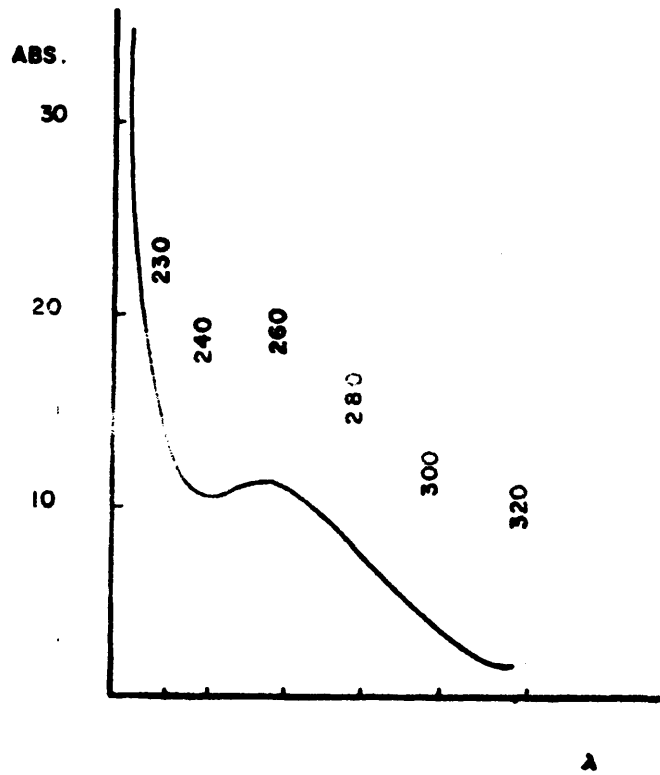


FIGURA 7.- Espectro de absorción U.V. del complejo ³H-DNA-Histonas utilizado.

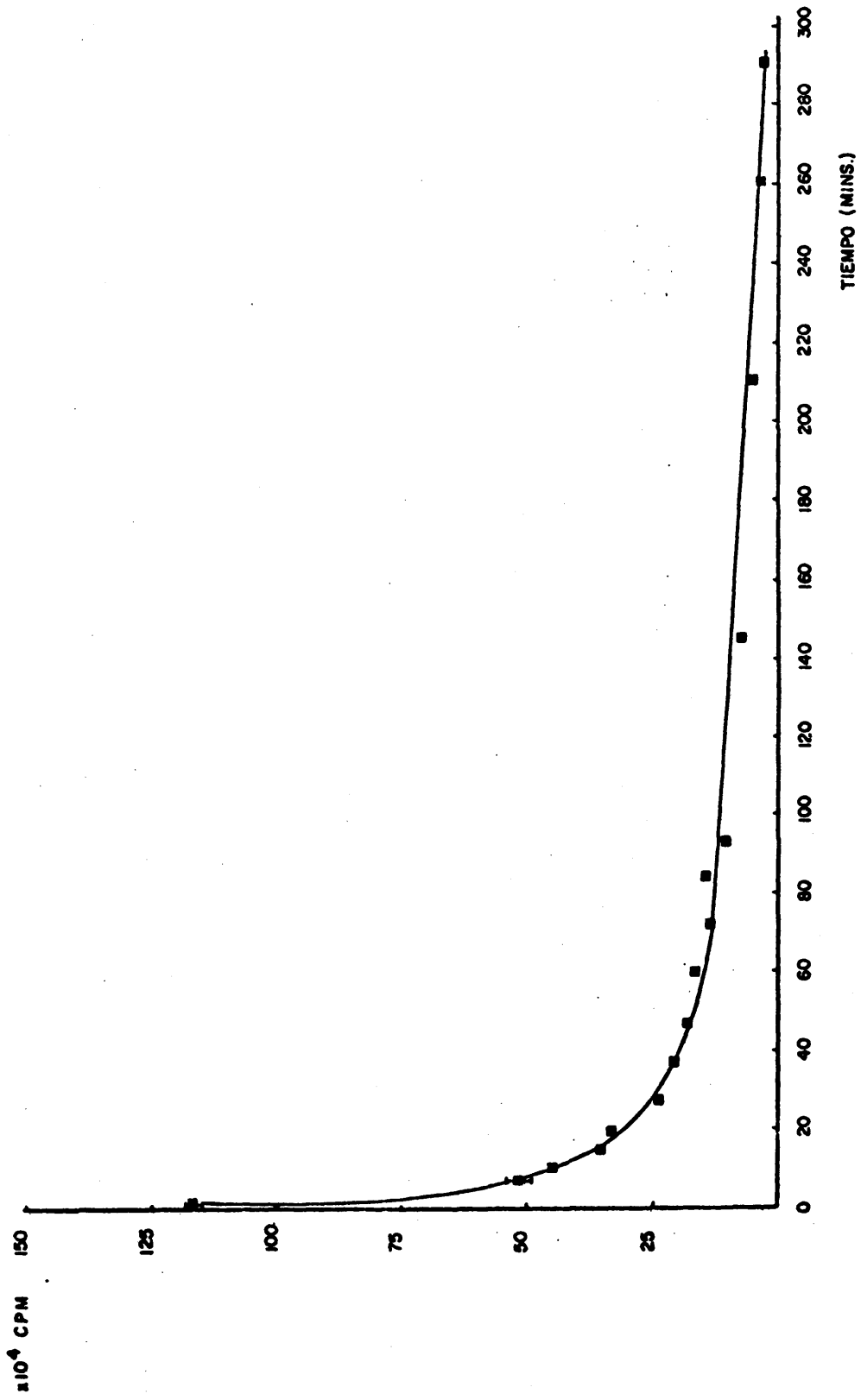


FIGURA 8.- Cinética de incorporación directa del medio -Na Cl 35 mM- de un complejo ^3H -DNA-Histona, por células de Tetrahymena.

los diferentes procesos de transporte al interior de Tetrahymena que siguen estos iones en relación al Na^+ .

III.a.1.2.1. Incorporación de un complejo DNA - Histonas en medio no nutriente, ClNa 35 mM

En la Figura 7 se presenta el espectro de absorción M.U. del complejo obtenido conforme se describió en la sección II de esta Tesis. Tanto la baja relación máximo/mínimo, como la situación de ambos puntos singulares, abogan en favor de la bondad del complejo.

La Figura 8 muestra que la incorporación de este complejo es *idéntica en su evolución temporal* a la obtenida en cualquier experiencia realizada con iones sodio presentes en el medio, produciéndose el fenómeno de captura rápida-cesión gradual ya descrito.

III.a.1.3. INFLUENCIA DEL PESO MOLECULAR DEL ^3H -DNA EXÓGENO EN SU CAPTURA; MEDIO NO NUTRIENTE ClNa , 35 mM

Los resultados cinéticos son los mismos que los aparecidos siempre que el ión sodio está presente en el medio (Fig. 9).

El *peso molecular promedio en peso*, se estima mediante cromatografía en DEAE-celulosa (Mingot y Dávila, 1974). Como queda escrito, sólo atribuimos a los valores del $\overline{\text{PM}}_p$ hallados la categoría de "estimación".

Ante la posible existencia de *unidades funcionales receptoras* del DNA en la superficie celular, hemos de interpretar este hecho experimental utilizando unidades molares y no másicas. El DNA polimerizado, arrojó un peso molecular estimado de unos 6×10^6 daltons, en tanto que el de menor tamaño sólo alcanzaba 10^6 . Si la unión DNA receptor, se realizara en la forma "mol" a "mol", la cantidad de μg de DNA asociado a Tetrahymena debería ser aproximadamente seis veces mayor que la de DNA no polimerizado a tiempo experimental mínimo (1 minuto). Sin embargo, sólo alcanza un valor cercano al doble. Ello puede deberse a *dos razones fundamentalmente*; en primer lugar una molécula grande, podría *bloquear un número de receptores mayor* que una molécula pequeña. En segundo lugar, *la accesibilidad* a los puntos de recepción de una molécula grande debe ser lógicamente menor aunque su afinidad -la suponemos de naturaleza electrostática- sea mayor por ser mayor su carga. Esta última propiedad tendría como consecuencia un rendimiento de incorporación mayor en el

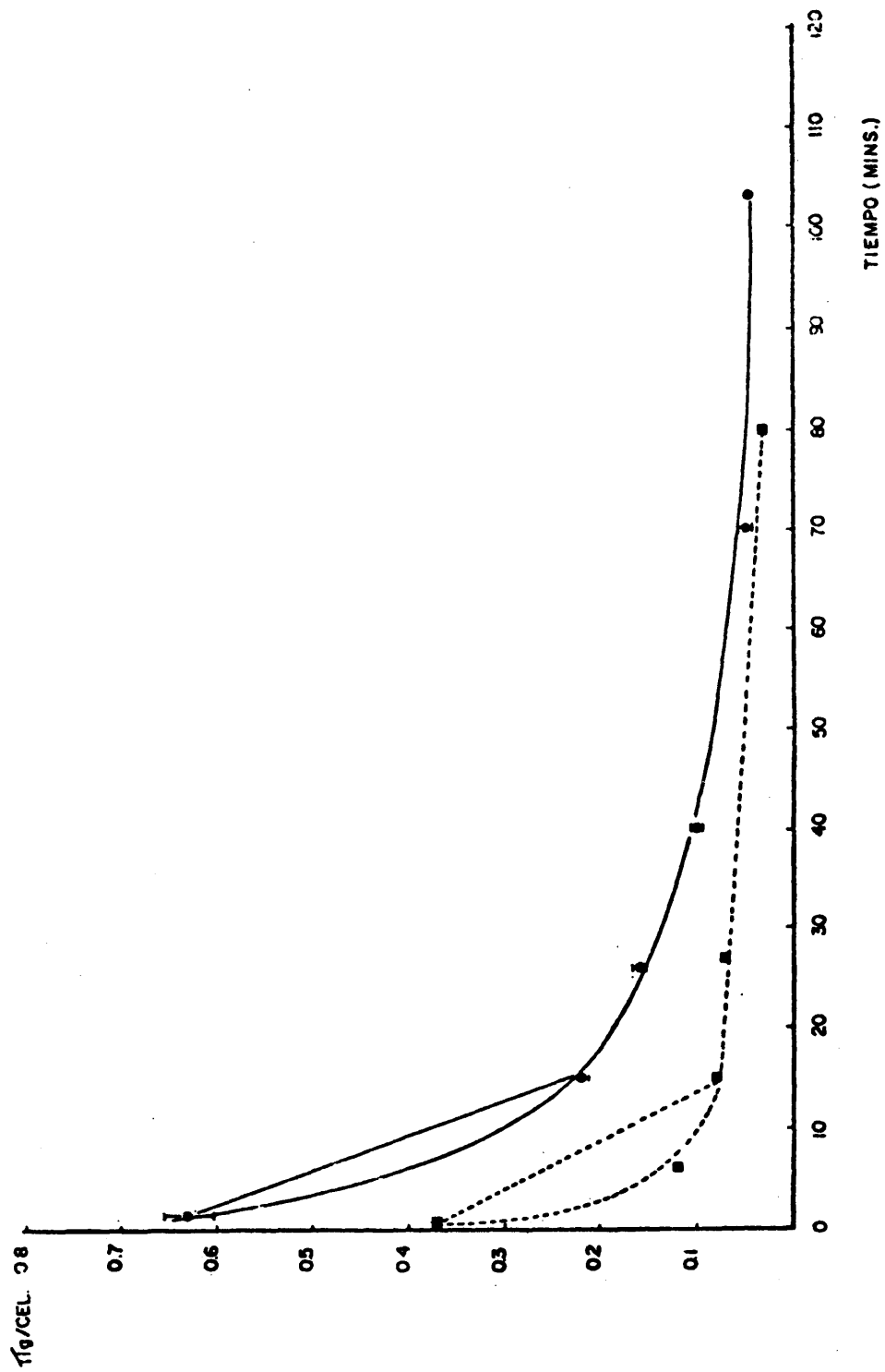


FIGURA 9.- Influencia del \overline{PM}_p del 3H -DNA en su incorporación directa por células de Tetrahymena pyriformis. Medio no nutriente, NaCl 35 mM.

●- $\overline{PM}_p = 6 \times 10^6$ daltons.
 ■- $\overline{PM}_p = 10^6$ daltons.

caso del DNA polimerizado, como efectivamente sucede, aunque la relación molar asociada sea desfavorable respecto a la que presenta el DNA de menor tamaño molecular. Téngase en cuenta que al tratarse de una colectividad heterogénea de moléculas, el dato significativo respecto a las características de las moléculas asociadas, lo va constituir el máximo número de moléculas de determinado tamaño molecular, fracción que, *estadísticamente*, podrá asociarse mayor número de veces a pesar de que sus competidoras también puedan hacerlo. Ello explica que el número medio de moléculas unidas a Tetrahymena en tiempos de 1 minuto (estimado a partir de los datos) sea realmente mayor en el DNA de menor tamaño (aproximadamente en relación 4:1).

Pero además, puede observarse en la figura 9, que la cesión de DNA al medio, medida por la *pendiente de la recta que une los tiempos entre 1 minuto y 15 minutos*, es menor en el caso del DNA no polimerizado. Por cromatografía en DEAE-celulosa, hemos observado que tanto el ³H-DNA liberado al medio como el retenido por Tetrahymena, aparecen degradados a tiempos correspondientes a ese intervalo (III.1.4.).

Entonces, el DNA polimerizado se "libera" hacia el medio con mayor rapidez, hasta incluso alcanzar a tiempos medios (70 minutos) el nivel, en $\mu\text{g/célula}$, del DNA menor. Este dato, debe tenerse presente pues constituye un primer indicio de que la liberación del DNA se produce con una degradación simultánea. Evidentemente, la posibilidad de degradación de una molécula grande, es mayor que la de una molécula pequeña (y la cantidad de ³H-DNA liberada deberá ser mayor cuando se degrade una molécula grande), explicándose así el más acusado descenso de la radiactividad retenida por Tetrahymena cuando el ³H-DNA era de mayor tamaño.

Hemos de añadir que los datos de la incorporación de DNA no polimerizado, no pudieron ser elaborados con arreglo al tratamiento estadístico, ya que proceden de valores únicos obtenidos en incubaciones normales.

La tabla siguiente expresa la dispersión de los tamaños moleculares de los ³H-DNA empleados.

FRACCION	(%)1	(%)2	PM (daltons)	%(Moléculas)1	%(Moléculas)2
NR + II	7,5	1,2	-	-	-
III	48,7	10,9	10^6	53,9	22,1
IV	40,6	26,4	10^6	44,9	53,6
V	2,9	27,0	3×10^6	1,1	18,3*
VI	0,3	25,9	10^7	0,1	5,1
VII	0,0	7,7	2×10^7	-	0,7
VIII	0,0	0,9	5×10^7	-	0,04
PM (peso)	10^6 daltons	6×10^6 daltons			

Puede apreciarse la diferencia en moléculas de peso molecular menor o igual (III y IV) que 10^6 daltons, dato que podría dar cuenta del comportamiento aludido.

III.a.1.4. INCORPORACION DIRECTA DE ^3H -DNA EN MEDIO DE CULTIVO COMPLETO

La cinética de incorporación de DNA por células de Tetrahymena en su medio de cultivo completo, presenta las características que se muestran en la figura 10 (idem Fig. 5) (Díaz de Espada, 1972, pág. 52).

Este efecto, observado también cuando la incubación se realizaba en presencia de iones sodio, puede ser consecuencia de fenómenos capaces de alterar la carga electrostática de la superficie de Tetrahymena, problema que ya se ha tratado en la sección IV.1.2 de esta Tesis, en relación con las variaciones inducidas en el contenido iónico de las células por la presencia en su exterior de macromoléculas, capaces de *distorsionar el particular equilibrio de regulación iónica* que debe producirse en este medio nutriente.

III.a.1.5. ESTADO MOLECULAR DEL ^3H -DNA INCORPORADO Y LIBERADO AL MEDIO, VARIABILIDAD CON EL TIEMPO.

III.a.1.5.1. Incubación a tiempos cortos

El ^3H -DNA capturado y retenido por Tetrahymena en tiempos inferiores a 1 hora, presenta las dispersiones de tamaños moleculares que se expre

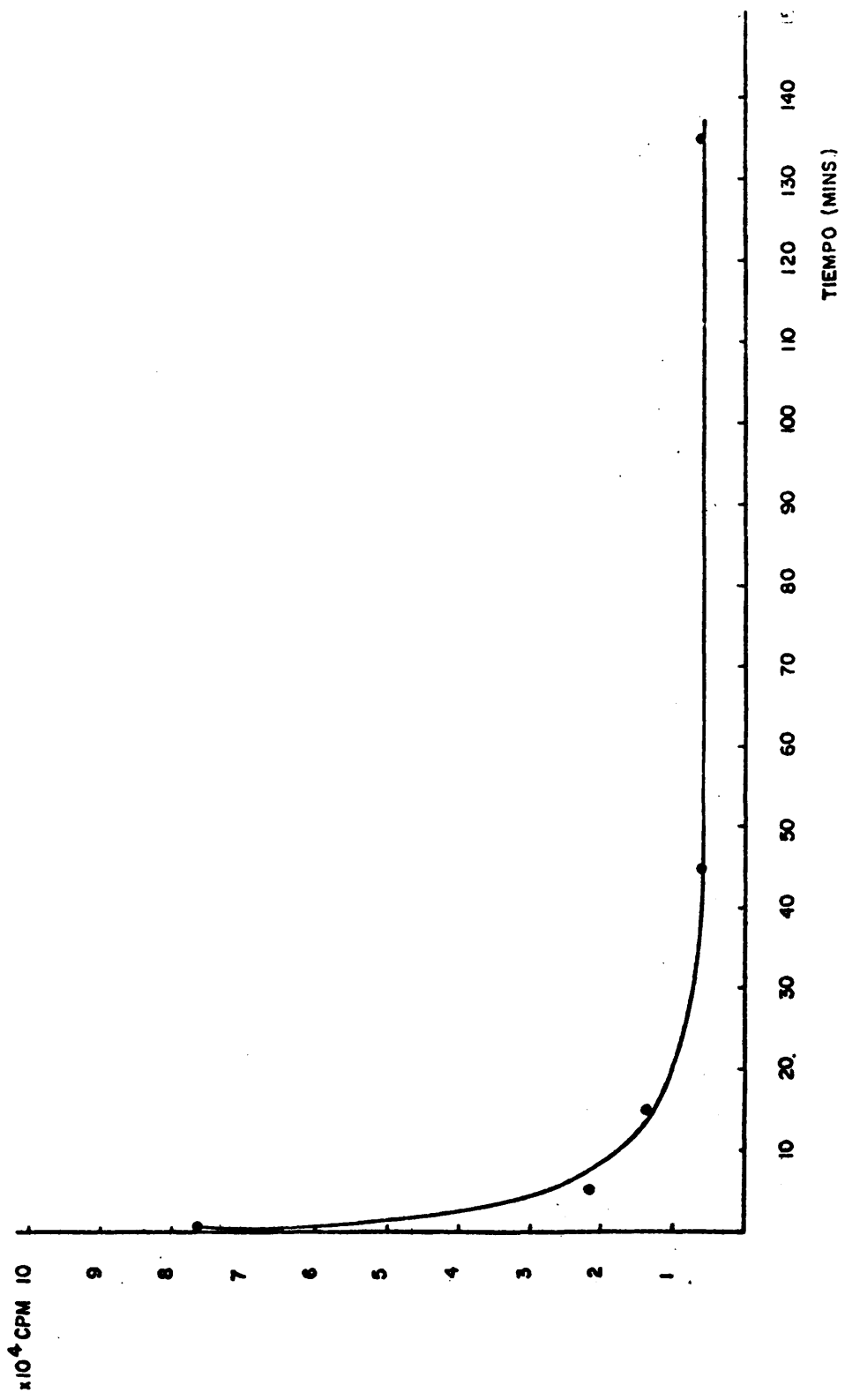


FIGURA 10.- Cinética de incorporación directa del medio -nutriente- de ³H-DNA, por células de *Trachymena*.

san en la Figura 11, donde se comparan con el espectro de tamaños del ^3H -DNA utilizado en la incubación.

El DNA exógeno ingerido, es degradado de forma rápida y creciente con el tiempo a fracción IV preferentemente (10^6 daltons) y oligonucleótidos y nucleótidos (NR, II y III). La actividad DNA-ásica endonucleolítica es mucho más acusada a tiempos muy cortos (2 minutos) que la exonucleolítica, comportamiento similar al descrito por Dubnau y Cirigliano en *B. Subtilis* (1972, 1972a). Como máximo, en este intervalo de tiempo, se alcanza un monto de fracciones NR+II del 10% en una hora. Ello puede significar una combinación de la actividad endonucleásica externa con la actuación de las exonucleasas del endosoma, que acceden al DNA una vez traspasada la superficie celular, liberándose al medio la radiactividad ("no retenida" en la columna de DEAE-celulosa) por exocitosis o permaneciendo integrada en el "pool" celular de deoxirribonucleótidos.

Por lo que respecta al ^3H -DNA presente en el medio de incubación, también se detectan modificaciones en su tamaño a tiempos de incubación cortos.

El ^3H -DNA se recoge del medio extracelular filtrando la incubación -con lo que se le priva de las células- y lavando éstas sobre el filtro con 2 x 5 ml de ClNa 0,035 M, y ácido iodo-acético 0,08 M a pH 7. Las figuras 12 y 13 recogen los diagramas de dispersión de tamaños moleculares del ^3H -DNA filtrado y lavado con ClNa 35 mM y del ^3H -DNA arrastrado por el ácido iodoacético, a 2 y 45 minutos, en ambos casos.

Se concluye, que el DNA que haya estado un tiempo tan corto como 2' en presencia de células de *Tetrahymena* sufre una abrupta degradación a fracción IV. El significado de este hecho en la captura del ^3H -DNA será discutido ampliamente en las secciones siguientes. Por el momento, hemos de resaltar también el aumento en el medio de fracciones no polimerizadas (exonucleolisis), al dilatar el periodo de incubación.

III.a.1.6. INCORPORACION DE ^3H -DNA EN UN MEDIO DE CULTIVO DEFINIDO. EFECTOS DE ATP Y GTP

Las células se recogieron por centrifugación de un cultivo joven, (330 g, 5 minutos) y tras un lavado de 30 minutos en medio no nutriente se resuspendieron en el medio mínimo descrito por Cox et al. (1968) hasta una concentración de 6×10^5 células/ml. Después de 5 horas, se

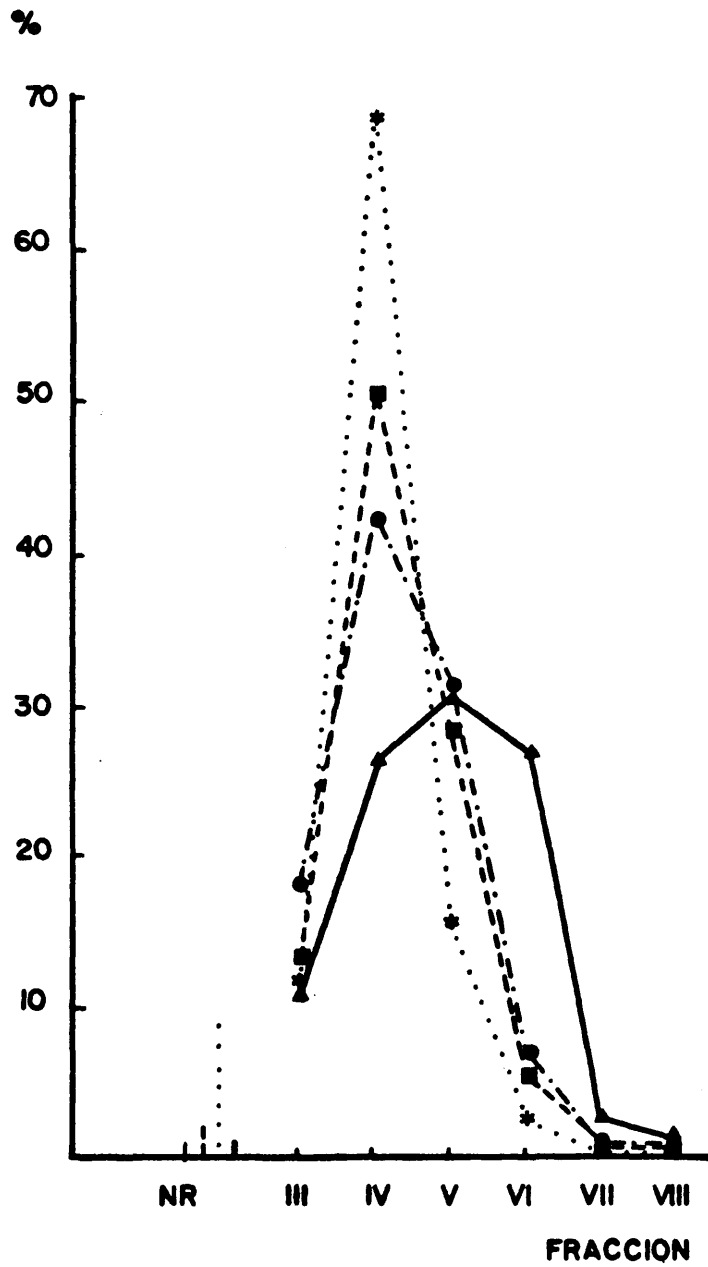


FIGURA 11.- Dispersión de tamaños moleculares del ^3H -DNA retenido por *Tetrahymena* en tiempos "cortos".
*..... 60 minutos; ---■--- 15 minutos; ---●--- 2 minutos; —▲— ^3H -DNA control.

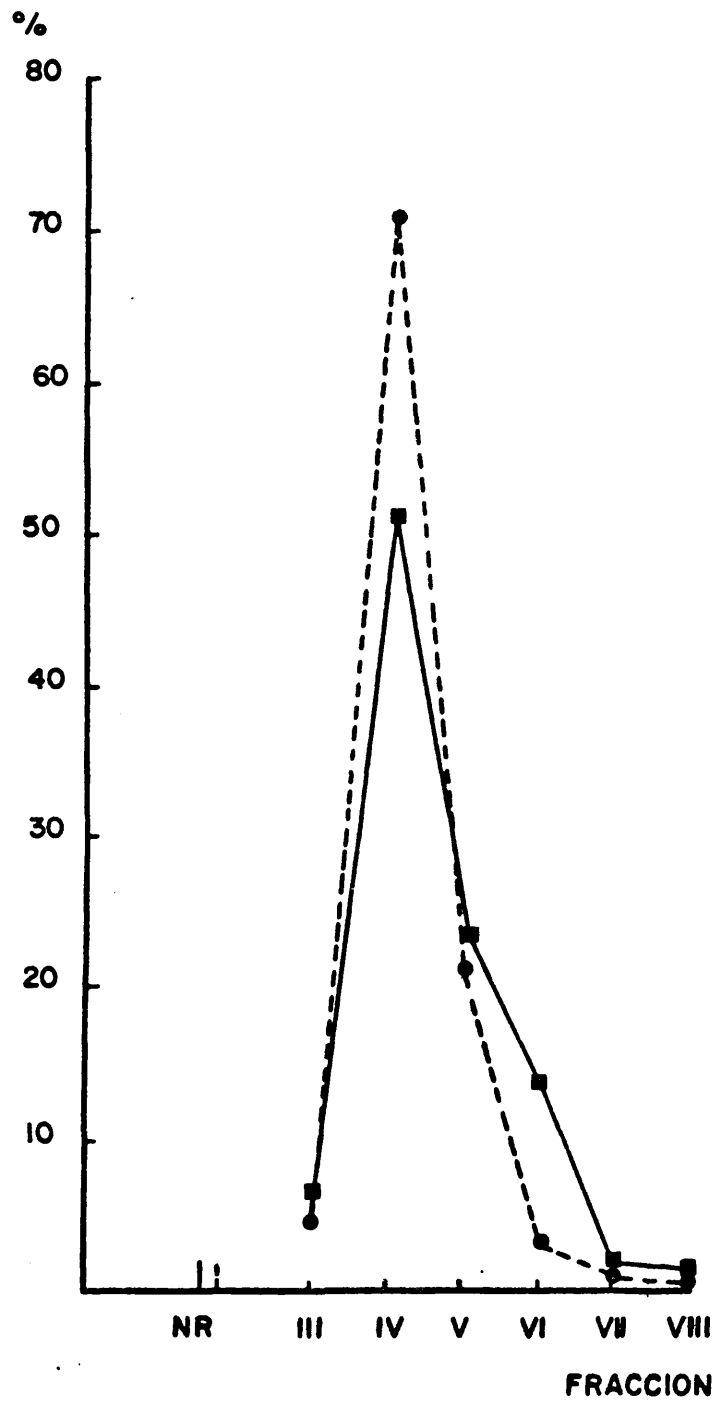


FIGURA 12.- Dispersión de tamaños moleculares del ^3H -DNA arrastrado por 2x5 ml de NaCl 35 mM (---●---) y por 2x5 ml de ácido iodoacético 0,08 M pH 7 (—■—), a 2 minutos de incubación.

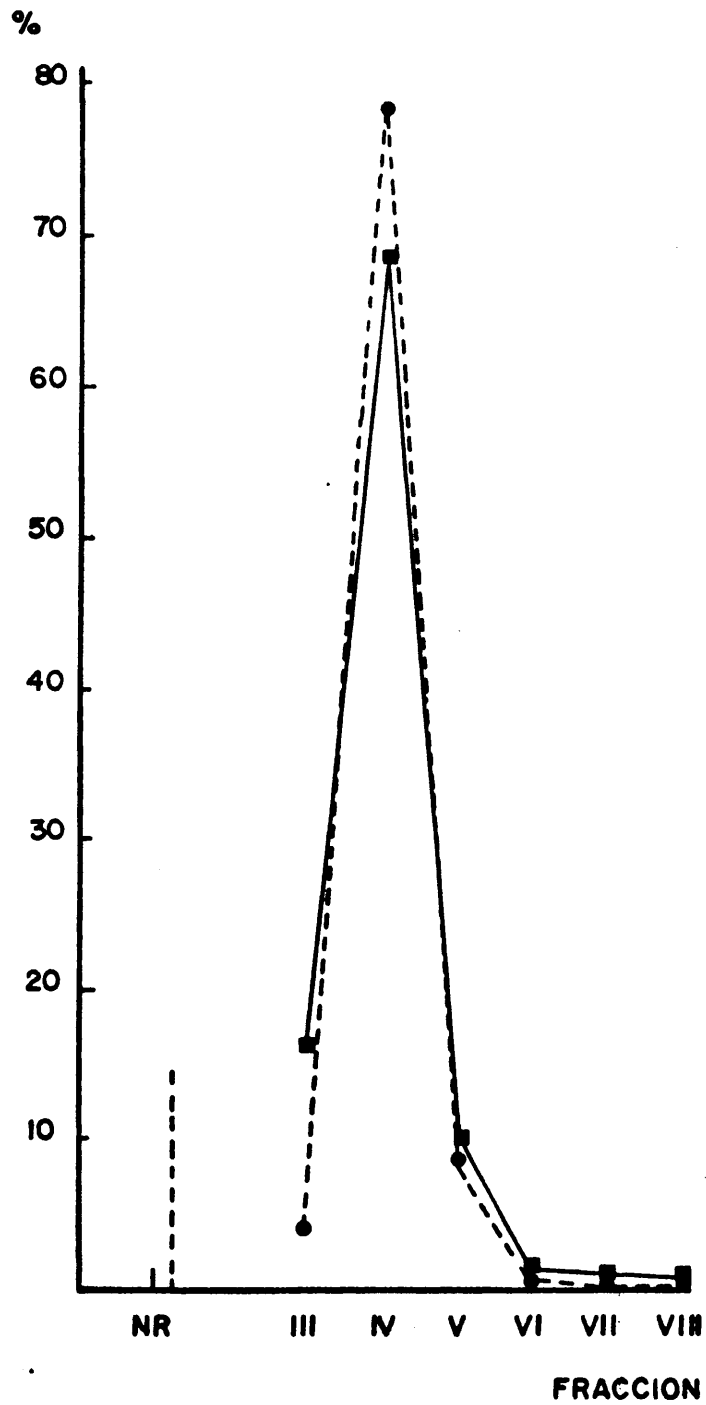


FIGURA 13.- Dispersión de tamaños moleculares del ^3H -DNA arrastrado por 2x5 ml de NaCl 35 M (---●---) y por 2x5 ml de ácido iodoacético 0,08 M, pH 7 (—■—) a 45 minutos de in cubación.

añadieron a tres lotes de 13 ml de dicho cultivo, 5 ml de ATP 5 mM, 5 ml de GTP 5 mM y 5 ml de H₂O destilada respectivamente, utilizándose este último cultivo como incubación de control.

Los resultados que se expresan gráficamente en las figuras 14 y 15, revelan un *mayor poder activador del ATP* sobre la incorporación de ³H-DNA en este medio definido. Por otro lado es preciso señalar que *el ritmo de la activación es similar en ambos casos*, encontrándose efectos estimuladores coincidentes a los tiempos 11 minutos y 105 minutos. A continuación, se advierte que *ambos nucleótidos ejercen un efecto negativo -a diferentes tiempos- en la incorporación del DNA a Tetrahymena*. Ello cabe ser interpretado como un *fenómeno "de reacción"*, que tiene lugar después del posible incremento del fenómeno endocitótico. El periodo de tiempo durante el cual hay activación apreciable, es mayor para el ATP que para el GTP. El citado fenómeno de reacción, se interpreta aquí como una disminución en la capacidad de actuación de los mecanismos endocitóticos una vez cumplida su función estimulada. Tanto el periodo de tiempo que tarda en manifestarse la reacción (más largo en el ATP), como la intensidad de ésta (mayor en el GTP), indican una superior efectividad del ATP en la activación de los procesos relacionados, a nivel fisiológico, con la incorporación de ³H-DNA. Asimismo, el segundo máximo (Fig. 15), es más alto en presencia de ATP, lo que podría indicar una acción preferente y más fructífera del ATP en los *mecanismos de reparación y biosíntesis* de las estructuras celulares externas utilizadas en la endocitosis precedente.

III.a.1.7. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE INCUBACION, EN LA INCORPORACION DE ³H-DNA EXOGENO. (MEDIO NUTRIENTE)

Puede observarse en la figura 16 como los niveles de ³H-DNA capturados por Tetrahymena pyriformis, disminuyen bruscamente cuando la temperatura de incubación aumenta.

La interpretación, no es inmediata, dado que son muy numerosos los procesos afectados por la temperatura. En este punto de nuestra discusión, podemos recordar la sensibilidad a dicha variable de las biomembranas de Tetrahymena encontrada por Speth y Wunderlich (1973). Sin embargo, dado que el tiempo mínimo experimentado oscila entre 5 minutos (29° centígrados) y 10 minutos (experimento a 18° centígrados), no pue-

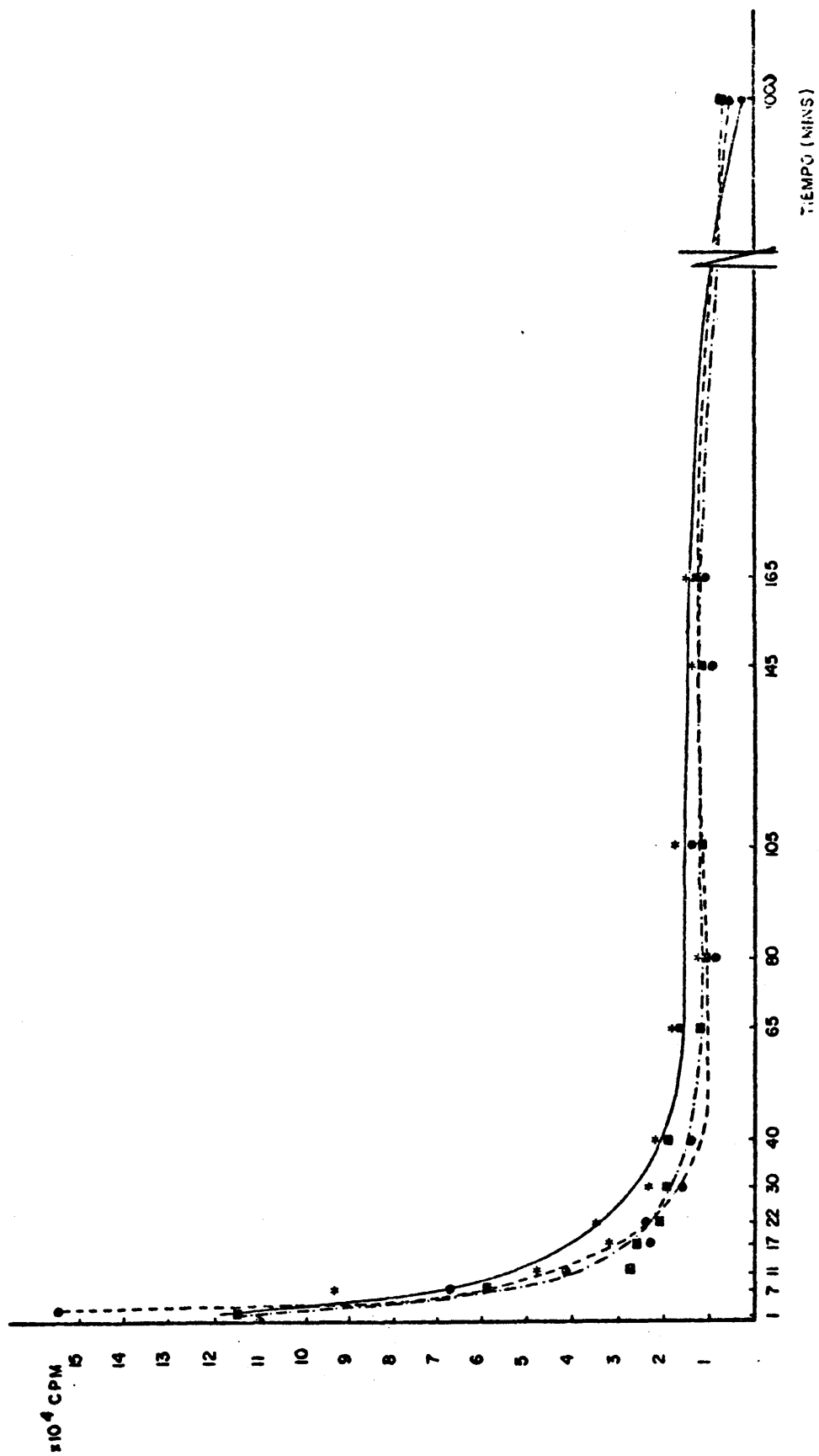


FIGURA 14.- Cinética de la captura directa del medio -definido- de ³H-DNA, por células de Tetrahymena. Efectores metabólicos.

- *— Presencia de ATP, 5 mM.
- - -●- - Presencia de GTP, 5 mM.
- . . .■- . . . Control, H₂O destilada.

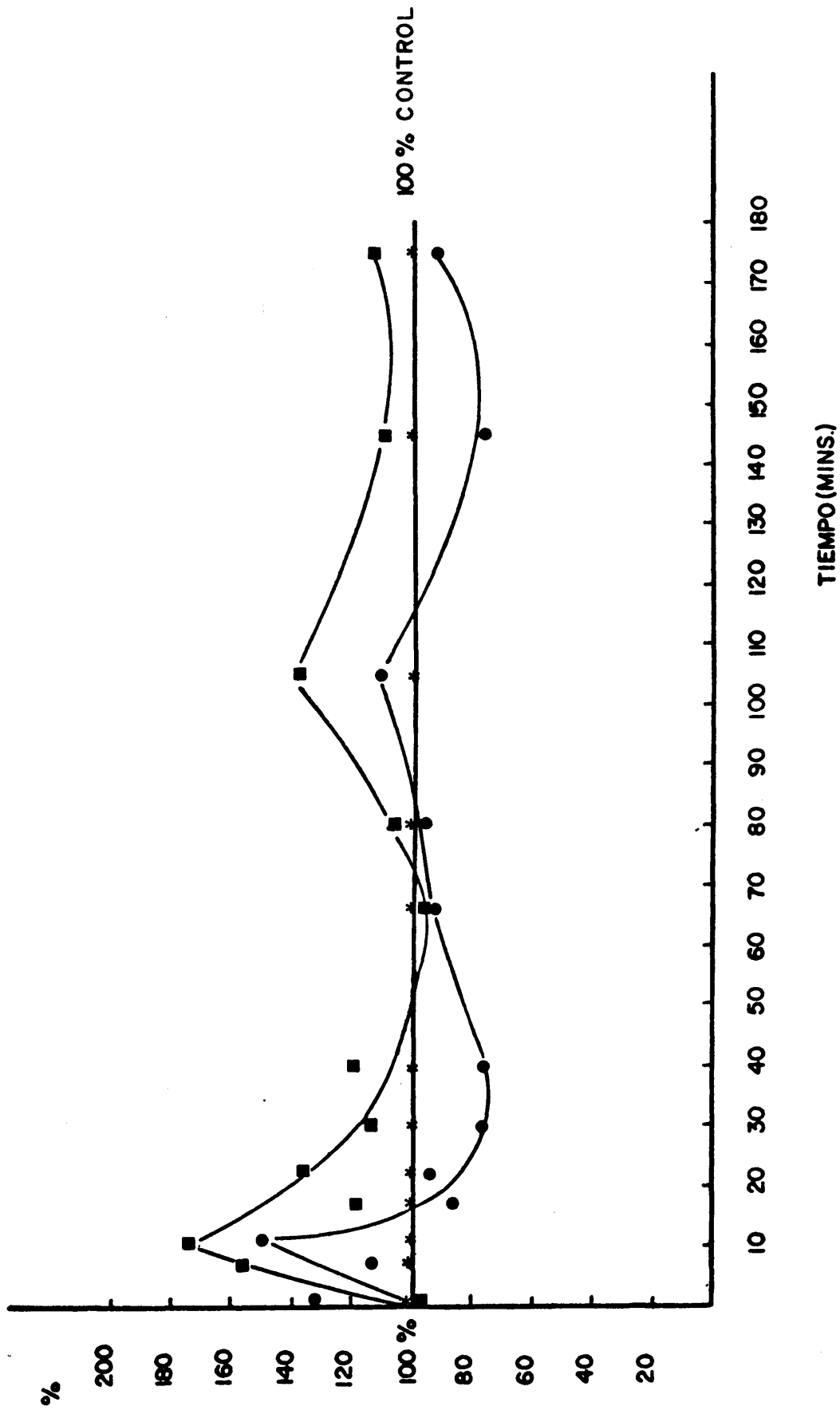


FIGURA 15.- Variación porcentual de la captura de ³H-DNA en presencia de ATP (-■-), GTP (-●-) respecto del control H₂O (-x-).

de atribuirse aquí el efecto de la temperatura a un fenómeno exclusivamente de membrana, puesto que en este tiempo de incubación el $^3\text{H-DNA}$ puede interaccionar con otras estructuras celulares.

Los datos de Andrus y Giese (1963) demuestran una *variación en los flujos independientes de sodio y potasio cuando Tetrahymena se somete a cambios de temperatura*. En un medio libre de sodio, se observa como, al enfriar el medio líquido en donde crecen las células, el potasio interior es cedido en un 30%; si la temperatura se reinstala en su nivel normal para el crecimiento (28-29°C) el potasio liberado vuelve a recuperarse hasta lograrse el estado de equilibrio inicial. Si el descenso de temperatura se verifica en *medios nutrientes (o no nutrientes) que contienen sodio*, persiste la pérdida de potasio interior aunque se origina una *ganancia de sodio*, aparentemente con un *transporte independiente de ambos iones*.

Así pues, el *estado fisiológico-iónico de Tetrahymena pyriformis* ve afectado su dinamismo funcional por variaciones ambientales de temperatura. El estado iónico, evidentemente, va a afectar la polaridad de la superficie celular de modo que, según nuestros datos, la recepción de polianiones como el DNA resultaría perjudicada al aumentar la temperatura. Ello correspondería a una *ganancia neta de sodio mayor que la liberación de potasio ocurrida al enfriar*, según los datos de Andrus y Giese (1963).

Indiscutiblemente, el proceso de fijación del $^3\text{H-DNA}$ a la envoltura del huésped, puede verse afectado también por modificaciones conformacionales ocurridas en el hipotético receptor como consecuencia de la *variación de temperatura* (Speth y Wunderlich, 1973). Por el momento, *debemos considerar al receptor de DNA*, en el sentido más amplio posible, como una *disposición de grupos atómicos, pertenecientes a las macromoléculas superficiales, cuya distribución estérica y energética favorezca la interacción estable con el $^3\text{H-DNA}$ exógeno*. Esta ordenación tridimensional, puede verse modificada por la temperatura. En tal caso, el proceso global de incorporación endocitótica vendría limitado *por la mayor dificultad de su primera etapa*. Los datos de Slater y Tremor (1962) y Pruett (1965) (ya referidos en la Introducción de esta Tesis), relativos a la *variación con la temperatura de la actividad del receptor superficial de ortofosfato en Tetrahymena*, refuerzan esta posibilidad para el receptor de DNA. Una discusión adicional sobre esta posibilidad, se halla

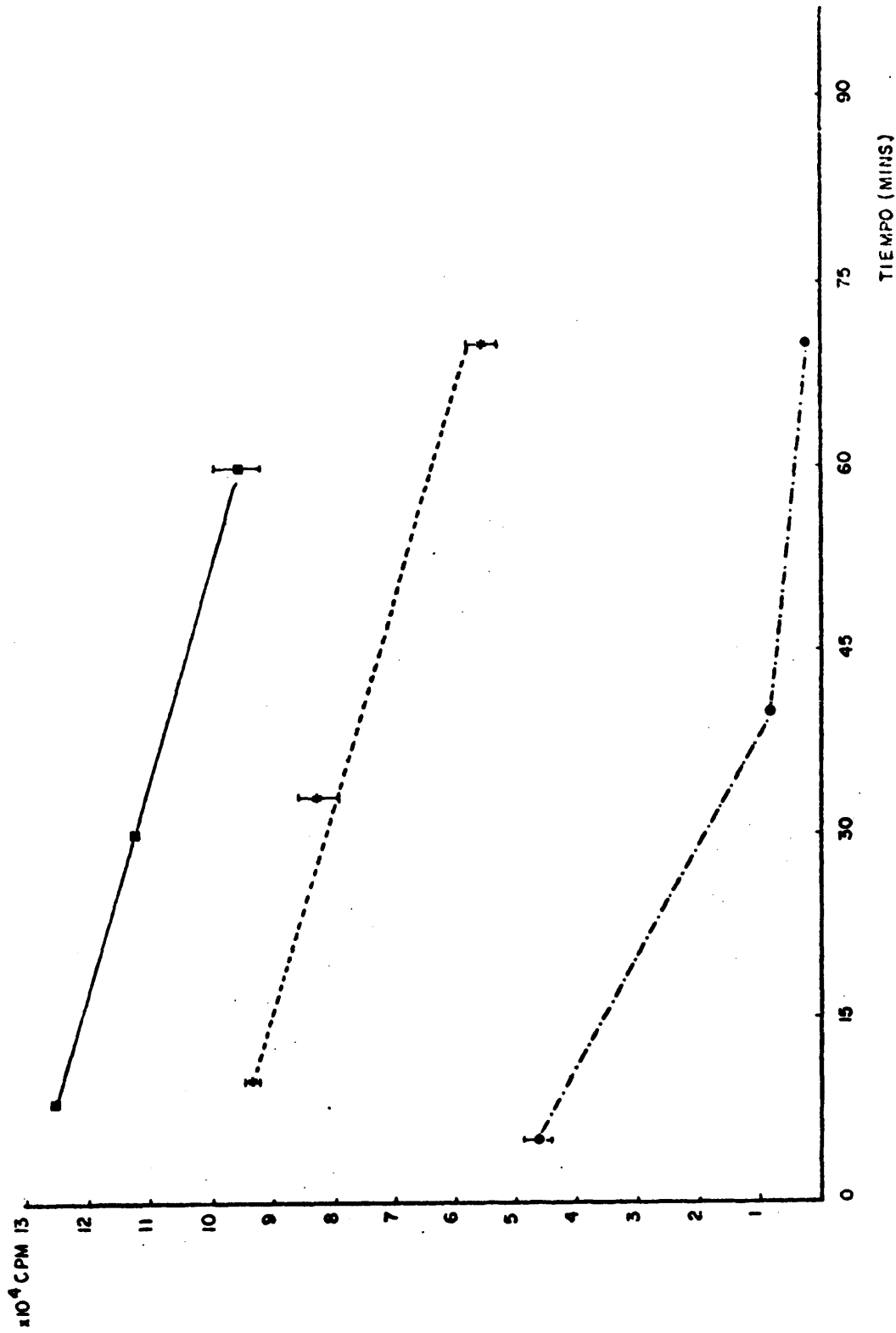


FIGURA 16.- Influencia de la temperatura de incubación en la incorporación directa del medio -nucleotriente de ^3H -DNA, por células de Tetrahymena.
 -■- 0-4°C; -*- 18°C; -●- 29°C.

r  en la secci3n III.2.3 de esta Tesis.

El análisis de los datos cinéticos obtenidos a las diferentes temperaturas de experimentaci3n, revela que *la cesi3n al medio del ³H-DNA*, ocurrida en el periodo de tiempo que abarca desde 10 a 35 minutos y medida por la pendiente de la curva cinética, es mayor a 29  centígrados que a 0-4  y 18  centígrados. Este dato, se *relacionar  con el estado molecular del ³H-DNA retenido por Tetrahymena*.

III.a.1.8. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA DEGRADACION DEL DNA INCORPORADO

Se realizaron cromatografías del DNA incorporado por Tetrahymena a diferentes temperaturas de incubaci3n, 0-4 C y 29 C, siendo comparables los tiempos de incubaci3n (70 minutos y 60 minutos respectivamente). Los resultados se exponen en la tabla siguiente, y se expresan gráficamente en la Figura 17.

FRACCION ELUIDA	0� 4�C 70 minutos	29�C 60 minutos	³ H - DNA CONTROL
NR +II	0	0	0
III	0,5	1,2	0
IV	73,2 (� 7,3%)	87,0 (� 8,7%)	23,0
V	22,4	12,0	24,9
VI	3,5	0	30,0
VII	0,3	0	16,9
VIII	0,1	0	5,2

Dado que a la cromatografía de DNA en DEAE-celulosa puede atribuirse un 10% de error en cada fracci3n, no son realmente significativas las diferencias encontradas entre las fracciones IV de ambas situaciones experimentales. Sin embargo, los datos globales apuntan una *mayor degradaci3n* de las fracciones más polimerizadas (V,VI y VII) cuando la incubaci3n se realiza a *mayor temperatura*. En apoyo de ello podemos añadir que el tiempo de incubaci3n a 0-4 C (menor degradaci3n) es mayor que el empleado en el experimento realizado a 29 C.

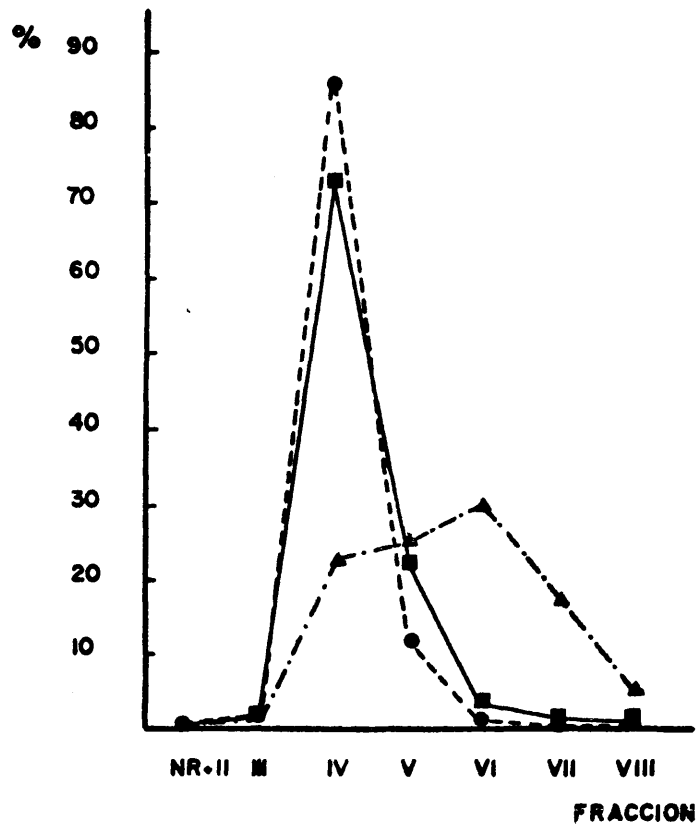


FIGURA 17.- Influencia de la Temperatura de incubación en la degradación del ^3H -DNA incorporado por células de Tetrahymena. Tiempos "medios".

-■- 0-4°C, 70 minutos; ---●--- 29°C, 60 minutos.

Debemos observar que a tiempos de 60-70 minutos, el proceso de liberación del DNA incorporado ya ha cesado, (experimentos de incorporación directa), permaneciendo estabilizado el nivel de ^3H -DNA ligado a Tetrahymena. En este tiempo, el ^3H -DNA ha tenido tiempo de alcanzar los orgánulos celulares implicados en procesos digestivos, por lo que no puede asociarse la mayor cesión hacia el medio del ^3H -DNA incorporado (habida a 29°C), *exclusivamente* con la mayor degradación ocurrida a dicha temperatura.

Anotemos, no obstante, el hecho de que *el DNA a 29°C se libera más rápidamente* que a $0-4^\circ\text{C}$ y que asimismo el DNA retenido por las células aparece con una mayor degradación a 29°C que a $0-4^\circ\text{C}$.

III.a.2. CINETICA DE LA ASOCIACION DNA-TETRAHYMENA. PULSOS DE 1 MINUTO CON ^3H -DNA

En las experiencias de incorporación directa realizadas en presencia de iones sodio (y medio de crecimiento completo), se puso de manifiesto un sorprendente proceso de incorporación rápida del ^3H -DNA exógeno a Tetrahymena, con una posterior cesión gradual del biopolímero capturado.

Sobre la hipótesis de que en un tiempo experimental relativamente corto (no mayor de 1 minuto), el DNA del medio de incubación sólo puede alcanzar a la envoltura celular iniciando a partir de entonces los procesos de citosis, se diseñó la técnica de estudio que se detalla en la sección II.4.3. del "Material y Métodos" de esta Tesis.

Mediante *autorradiografía* se ha puesto de manifiesto que en tiempos de incubación muy cortos (1') la totalidad del ^3H -DNA se encuentra asociado externamente a Tetrahymena. *Las situaciones experimentales* a que se sometieron las células fueron las siguientes:

- a) *Preincubación, 1 minuto*, con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de DNA de timo de ternera y pulso con ^3H -DNA de 1 minuto.
- b) Pulso con ^3H -DNA de 1 minuto, *sin preincubación con DNA frío*.

En ambos casos se realizaron fotografías de preparaciones *teñidas* (Feulgen) y *sin teñir*, evidenciándose una menor carga radiactiva en las primeras. En este tiempo experimental de 1 minuto, podemos considerar no significativa la cantidad de ^3H -DNA que pudiera haber penetrado a las células frente a la que se deposita en la superficie externa de las mismas.

A continuación se ofrecen algunas de las fotografías obtenidas.

III.a.2.1. DIFERENTES TIEMPOS DE PREINCUBACION CON DNA DE TIMO DE TERNERA

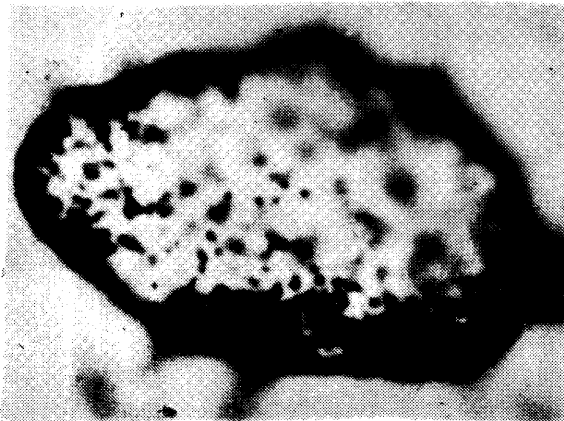
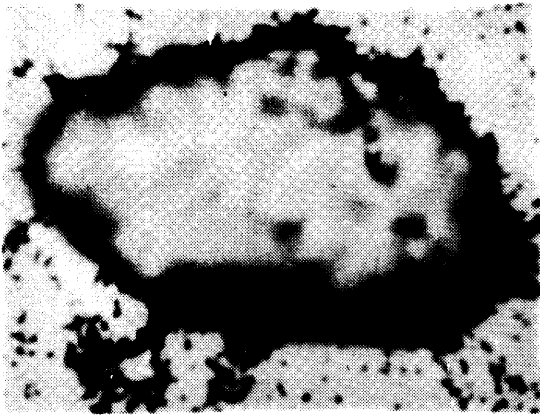
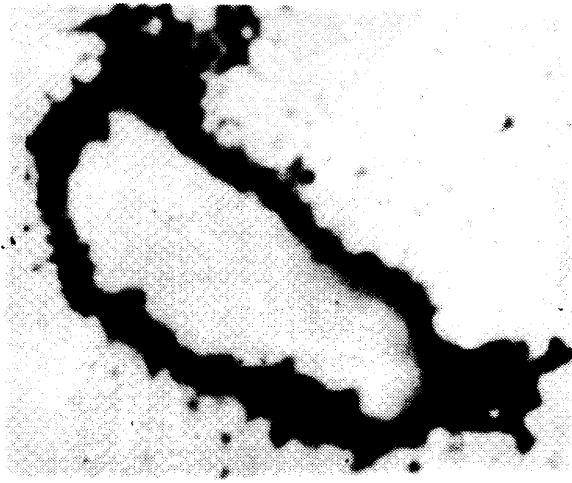
Puede observarse (Fig. 18) que la cantidad del ^3H -DNA de pulso incorporado a la superficie celular en diferentes momentos del proceso de intercambio DNA (medio) \rightleftharpoons DNA (celular), sigue una *cinética discontinua*; el experimento se realizó a *temperatura constante*.

A tiempos muy cortos, (tiempo experimental mínimo posible: menor de 30"), sin preincubación con DNA frío, el ^3H -DNA del medio no tiene tiempo suficiente para saturar en su totalidad a la superficie celular, llegando sólo una cierta fracción. Sin embargo, en 1 minuto total, (30 segundos con DNA frío y 30 segundos de pulso), se registra una mayor capacidad de Tetrahymena para recibir al ^3H -DNA añadido, a pesar de la competencia (y la ventaja) que debe presentar el DNA de timo de preincubación. Ello es una prueba de que *en esta etapa previa, el tiempo de exposición al ^3H -DNA es un factor decisivo*; la asociación ^3H -DNA-célula presenta una cierta inercia, consecuencia lógica del gran tamaño molecular de aquel. Dicha lentitud, se pone de manifiesto por este incremento de la captura observada al aumentar unos segundos el tiempo de pulso.

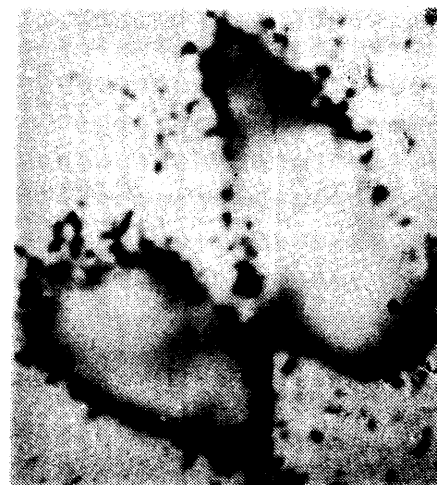
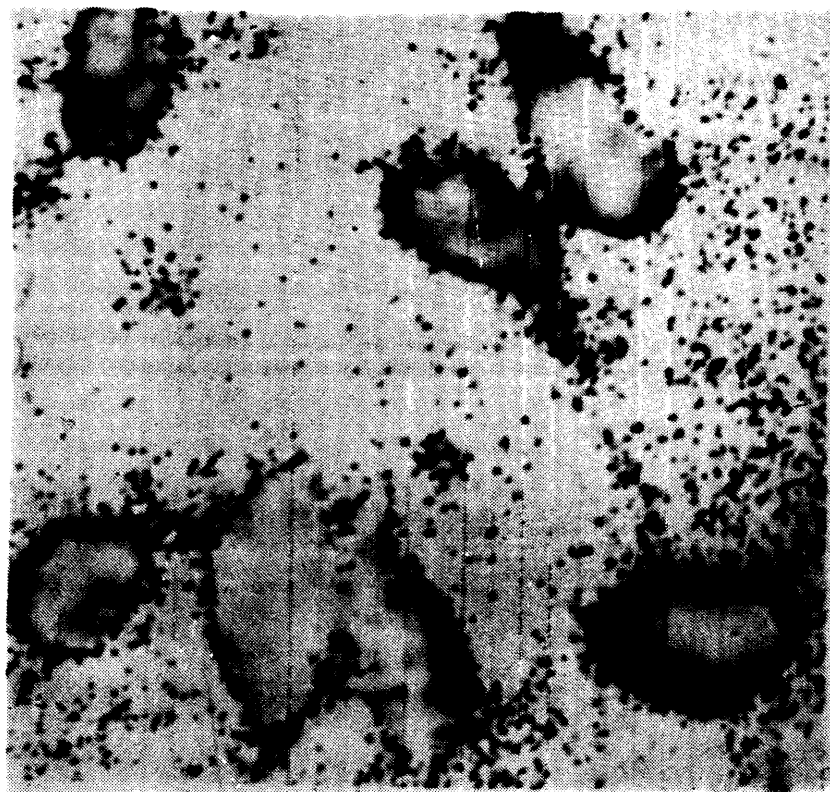
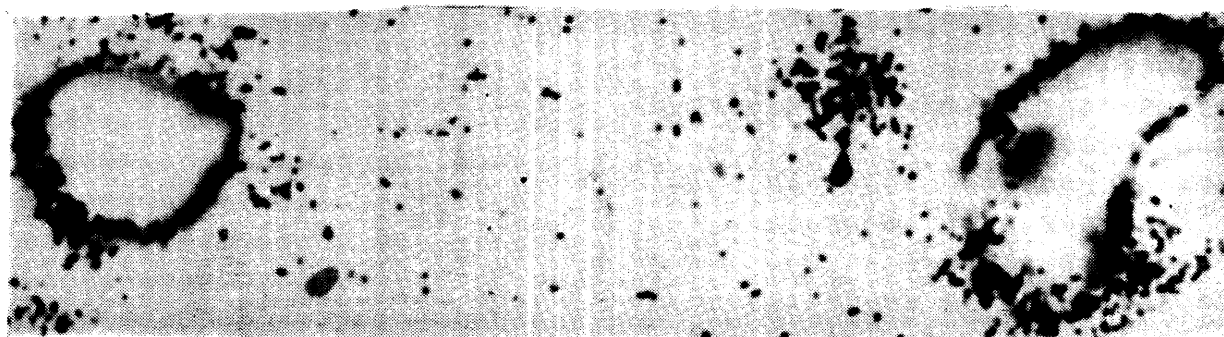
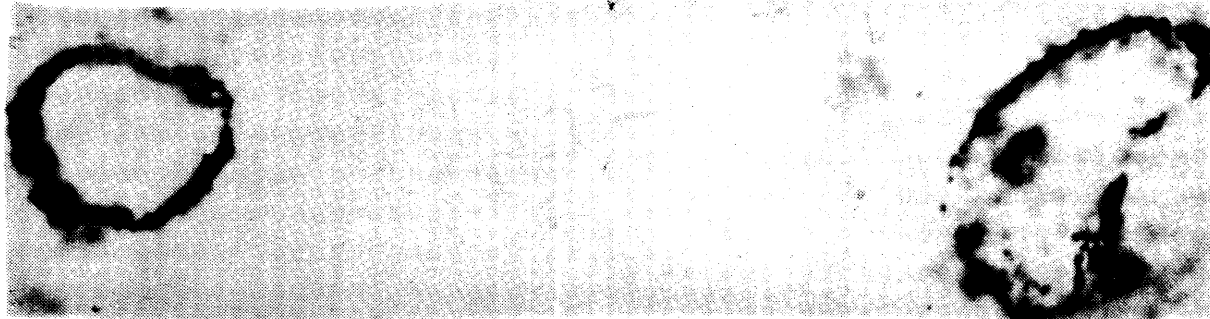
A partir de este momento y hasta un tiempo total de 4 minutos (3 minutos de preincubación con DNA frío de timo de ternera y 1 minuto de pulso), se advierte una disminución progresiva del ^3H -DNA recibido por la superficie celular *durante el minuto de duración del pulso*; ello indica, que el DNA de timo presente en el medio (incubación previa) *ha ido ocupando los puntos funcionales receptores hasta alcanzar un nivel máximo de fijación* en la superficie celular, de modo que el nuevo ^3H -DNA puesto en el medio, se recoge en menor cantidad que a tiempos de preincubación más cortos en los que, lógicamente, no se habría colmado la capacidad de Tetrahymena para acoger el DNA del medio.

Sin embargo, a partir de este momento (4 minutos), la cantidad de ^3H -DNA que Tetrahymena puede asociar en 1 minuto, *aumenta hasta hacerse prácticamente constante*, a tiempos de incubación previa, comprendidos entre 10 y 60 minutos. Ello indica claramente que el DNA asociado a la superficie *se libera* dejando huecos para la recepción del ^3H -DNA de pulso.

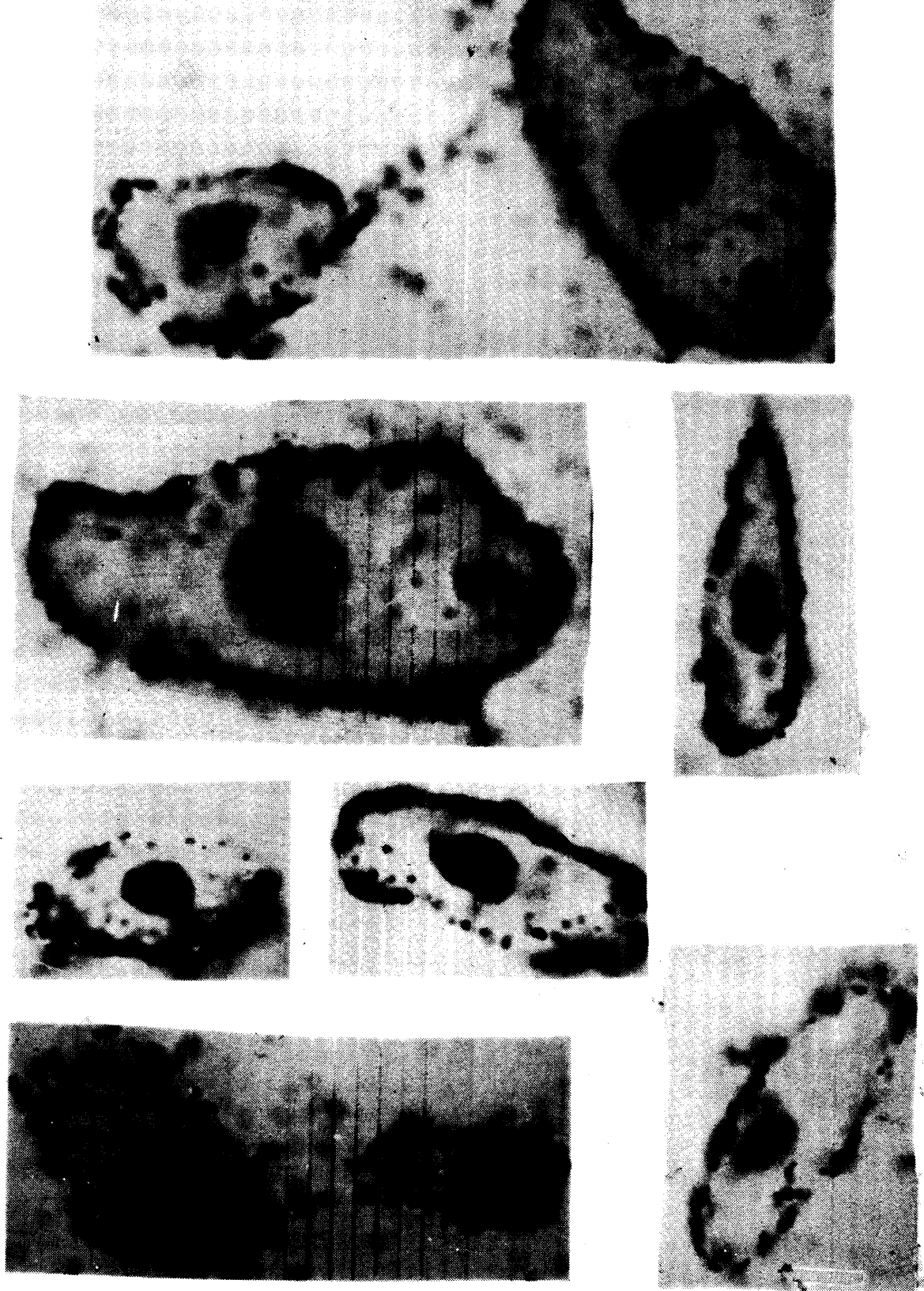
La descripción histórica de este fenómeno puede hacerse con arreglo a los siguientes puntos:



LAMINA I.- Células de Tetrahymena incubadas 1 minuto con ^3H -DNA bacteriano. Fijación inmediata. (Sin tratamiento de tinción).
Compárese el enfoque superficial y el profundo.



LAMINA II.- Células de Tetrahymena preincubadas 1 minuto con DNA frío e incubadas 1 minuto con ^3H -DNA. (Sin tratamiento de tinción). Compárese de nuevo el enfoque superficial y el profundo.



LAMINA III.- Células de Tetrahymena incubadas 1 minuto con ^3H -DNA y teñidas (Feulgen), arriba.

Abajo, las células fueron preincubadas 1 minuto con DNA frío.

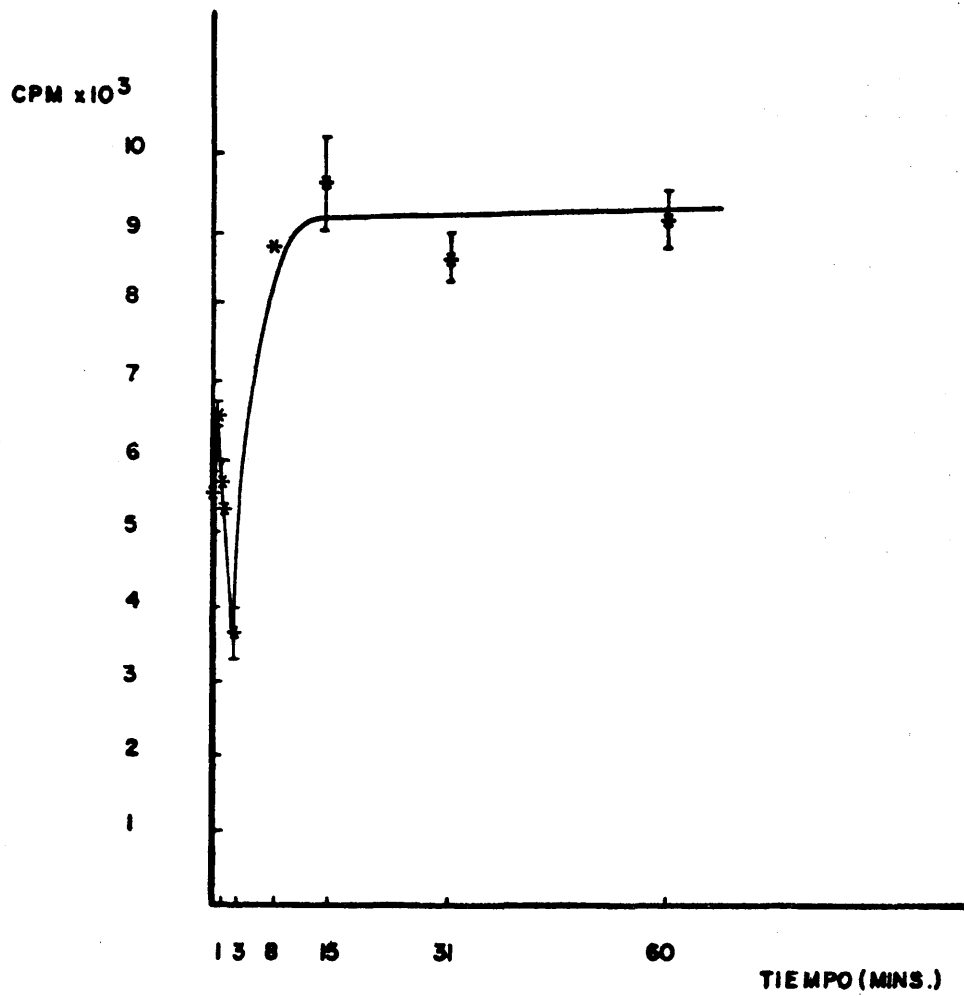


FIGURA 18.- Asociación del ³H-DNA con la superficie de Tetrahymena. Diferentes tiempos de preincubación con DNA de timo de ternera. Pulsos de 1 minuto. Medio nutriente.

1) El DNA del medio sigue una fase de *creciente asociación* con la superficie celular, que dura unos 3 ó 4 minutos.

2) Este proceso de asociación es *acumulativo*.

3) A partir de dicho tiempo, la envoltura de Tetrahymena *empieza a liberarse del DNA* recogido en la preincubación, de manera que el $^3\text{H-DNA}$ de medida se puede incorporar a la superficie celular en mayor cantidad: *la disponibilidad de puntos receptores aumenta*.

4) A tiempos superiores a 10 minutos, se establece un *equilibrio DNA (medio) \rightleftharpoons DNA (célula)*, de manera que el número de sitios -estadísticamente funcionales- se mantiene constante. Como se verá en la sección III.2.3, este equilibrio es modificable por la concentración exterior de DNA.

5) Este proceso descrito de liberación del DNA adherido a la membrana, *puede coexistir con un fenómeno puramente endocitótico*, pues sabemos que a tiempos largos (superiores a una hora), cuando ya han podido tener lugar los procesos endocitóticos, las células conservan una cierta cantidad de $^3\text{H-DNA}$.

III.a.2.2. ESTADO MOLECULAR DEL $^3\text{H-DNA}$ INCORPORADO

Se realizaron cromatografías del $^3\text{H-DNA}$ incorporado en las siguientes situaciones experimentales:

1) *Preincubación* de 2 ml de un cultivo $1,5 \times 10^6$ células/ml, con 200 μg DNA de timo, durante 1 minuto, y pulso de 1 minuto con $^3\text{H-DNA}$.

2) *Preincubación* con 50 $\mu\text{g/ml}$ de DNA de timo, de otro cultivo de 2×10^6 células/ml durante 15 minutos y pulso con $^3\text{H-DNA}$ de 1 minuto. (El grado de polimerización de este $^3\text{H-DNA}$, es inferior al utilizado en el primer experimento).

3) *Pulsos* de 1 minuto y 15 minutos, con $^3\text{H-DNA}$ sin preincubación con DNA frío.

4) *Preincubación* 15 minutos con 50 $\mu\text{g/ml}$ de DNA de timo, y pulso de 15 minutos con $^3\text{H-DNA}$.

5) *Incubación* con $^3\text{H-DNA}$, durante 30 minutos.

6) *Controles* de los $^3\text{H-DNA}$ empleados.

Los resultados aparecen resumidos en la siguiente tabla.

%	15' DNA timo 1' ³ H-DNA	1' ³ H-DNA	15' DNA timo 15' ³ H-DNA	15' ³ H-DNA	30' ³ H-DNA	Control ³ H-DNA
NR+II	0,5	0,5	0,6	0,7	4,8	0
III	3,4	4,3	10,4	14,5	15,3	0,3
IV	33,7*	36,7*	48,8*	49,6*	55,9*	17,8
V	31,5	30,4	18,2	15,3	14,2	18,2
VI	20,9	18,2	12,1	11,5	6,8	34,8*
VII	6,9	6,9	5,9	6,2	2,0	25,2
VIII	3,3	2,1	3,1	2,6	0,9	3,6
	99,9	100,1	100,1	99,9	99,9	100,0

%	1' DNA timo (200 g/ml) 1' ³ H-DNA	Control ³ H-DNA
NR+II	1,1	0,8
III	10,3	1,8
IV	49,3	35,2
V	22,4	39,0
VI	6,4	7,3
VII	7,1	9,2
VIII	3,2	6,7
	100,0	100,0

En las figuras 19 y 20 se observa que el *contacto durante un tiempo corto (1 minuto)*, entre células de Tetrahymena y el DNA, *provoca una degradación* que se intensifica a medida que aumenta el tiempo de interacción entre el ³H-DNA y Tetrahymena.

La preincubación con DNA de timo no parece tener influencia alguna en la degradación; su único efecto detectado fue la disminución de radiactividad que se incorporaba a las células.

A pesar de la preincubación realizada con altas concentraciones de

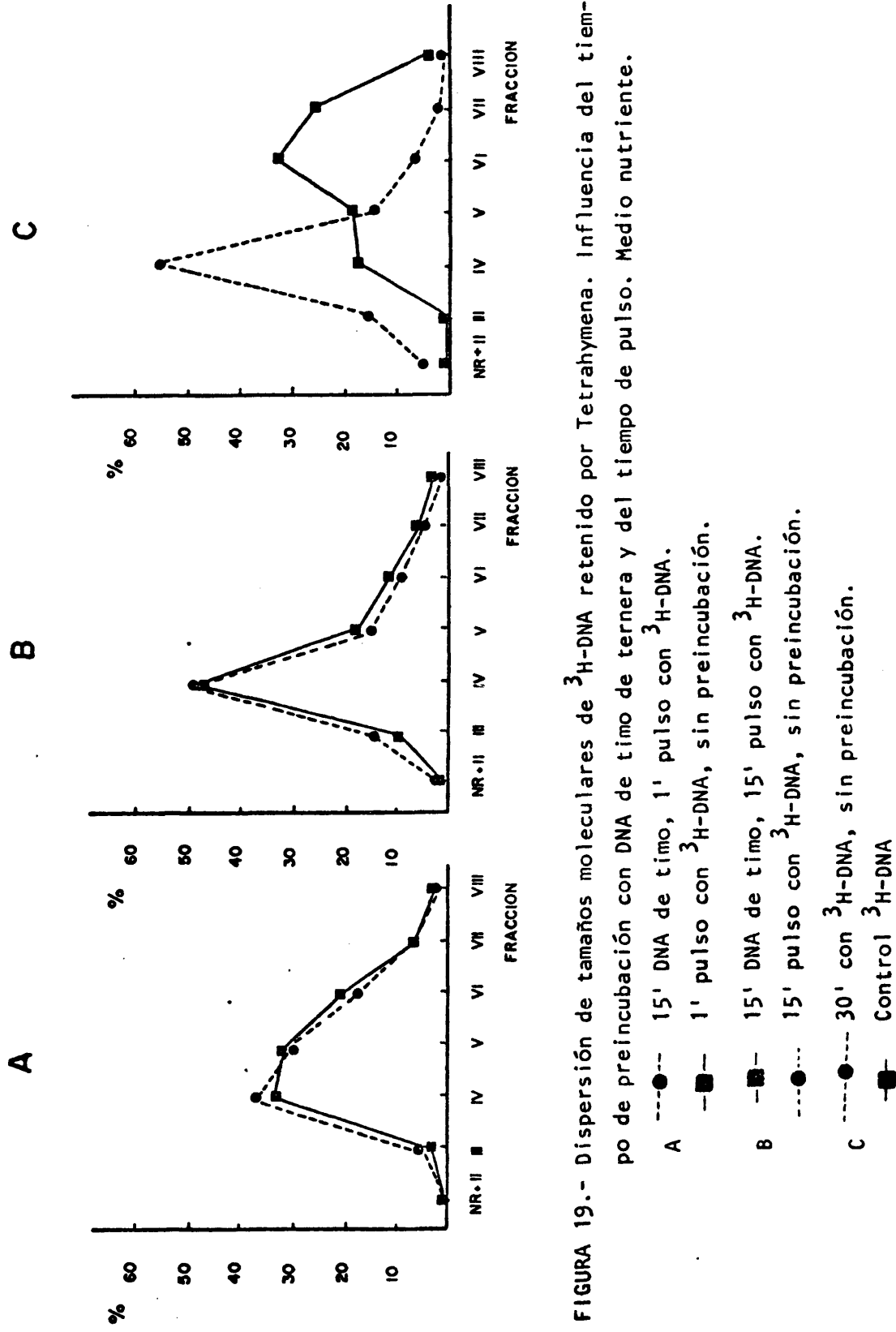


FIGURA 19.- Dispersión de tamaños moleculares de $^3\text{H-DNA}$ retenido por Tetrahymena. Influencia del tiempo de preincubación con DNA de tmo de ternera y del tiempo de pulso. Medio nutritivo.

- A ---●--- 15' DNA de tmo, 1' pulso con $^3\text{H-DNA}$.
- 1' pulso con $^3\text{H-DNA}$, sin preincubación.
- B ---●--- 15' DNA de tmo, 15' pulso con $^3\text{H-DNA}$.
- 15' pulso con $^3\text{H-DNA}$, sin preincubación.
- C ---●--- 30' con $^3\text{H-DNA}$, sin preincubación.
- Control $^3\text{H-DNA}$

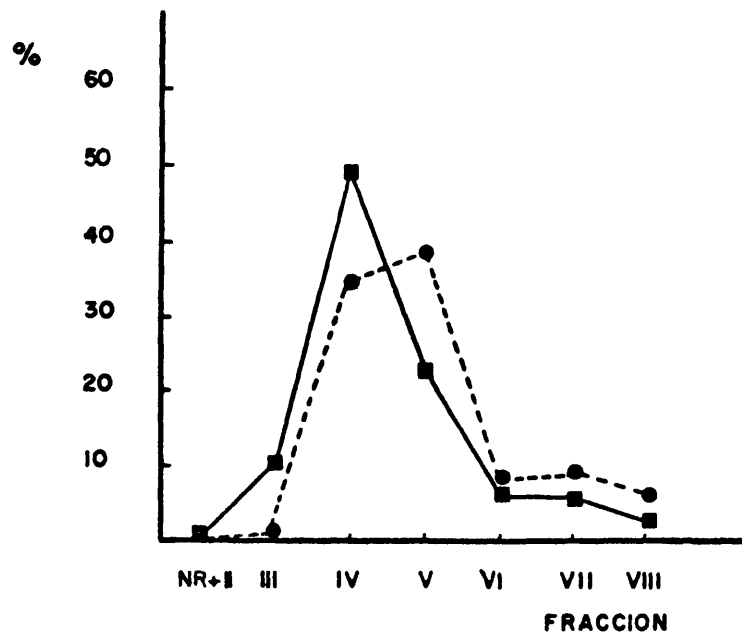


FIGURA 20.- Dispersión de tamaños moleculares del ^3H -DNA retenido por *Tetrahymena* en 1 minuto de pulso después de una preincubación con una alta concentración de DNA de timo de ternera (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Medio nutriente.

DNA de timo de ternera y a tiempos de máxima adhesión a la superficie de Tetrahymena, el ^3H -DNA que alcanza a las células -y que permanece retenido en ellas- aparece degradado en tiempos de contactos tan cortos como 1 minuto.

A dos minutos de incubación, sabemos que el ^3H -DNA que resta en el medio de incubación y el que se arrastra por lavados con ClNa y ácido iodoacético, presenta también una significativa degradación a un tiempo comparable de 2 minutos de incubación (Díaz de Espada, 1972, pág. 79). Dichos datos se han representado en las figuras 12 y 13. Todos estos hechos deben ser considerados junto a los que se exponen en III.a.2.6.

III.a.2.3. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA RECEPCION DE ^3H -DNA

Si se realiza un experimento similar al III.a.2.1, pero *variando la temperatura de preincubación*, se observa que *a medida que ésta aumenta, las posibilidades de recepción de ^3H -DNA en pulsos de un minuto (superficie celular), son menores en tiempos correspondientes a la "meseta" observada en el experimento a temperatura constante (Fig. 21). Este efecto negativo de la temperatura es creciente, de modo que a 28°C , la asociación DNA-superficie celular, está fuertemente impedida, no observándose variación con el tiempo.*

El experimento explica las variaciones observadas en las experiencias de incorporación directa, que pueden atribuirse ahora a la mayor *dificultad de asociación* del DNA con la envoltura de Tetrahymena. El *proceso global de incorporación* queda pues *limitado por bloquearse su primera etapa*, la fase de contacto DNA-Tetrahymena. No obstante, queda aún por explicar el dato de la mayor pendiente del proceso de liberación del ^3H -DNA observada a 29°C .

III.a.2.4. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE PREINCUBACION CON RNA DE LEVADURA EN LA CAPTURA DE ^3H -DNA

La preincubación con RNA de levadura como biopolímero aniónico, químicamente parecido al DNA, ofrece datos cinéticos similares conceptualmente a los obtenidos cuando la preincubación se realiza en presencia de DNA.

Se ha puesto de manifiesto (Fig. 22) que *la velocidad de ocupación por el RNA de los puntos capaces de recibir DNA en la superficie de Te-*

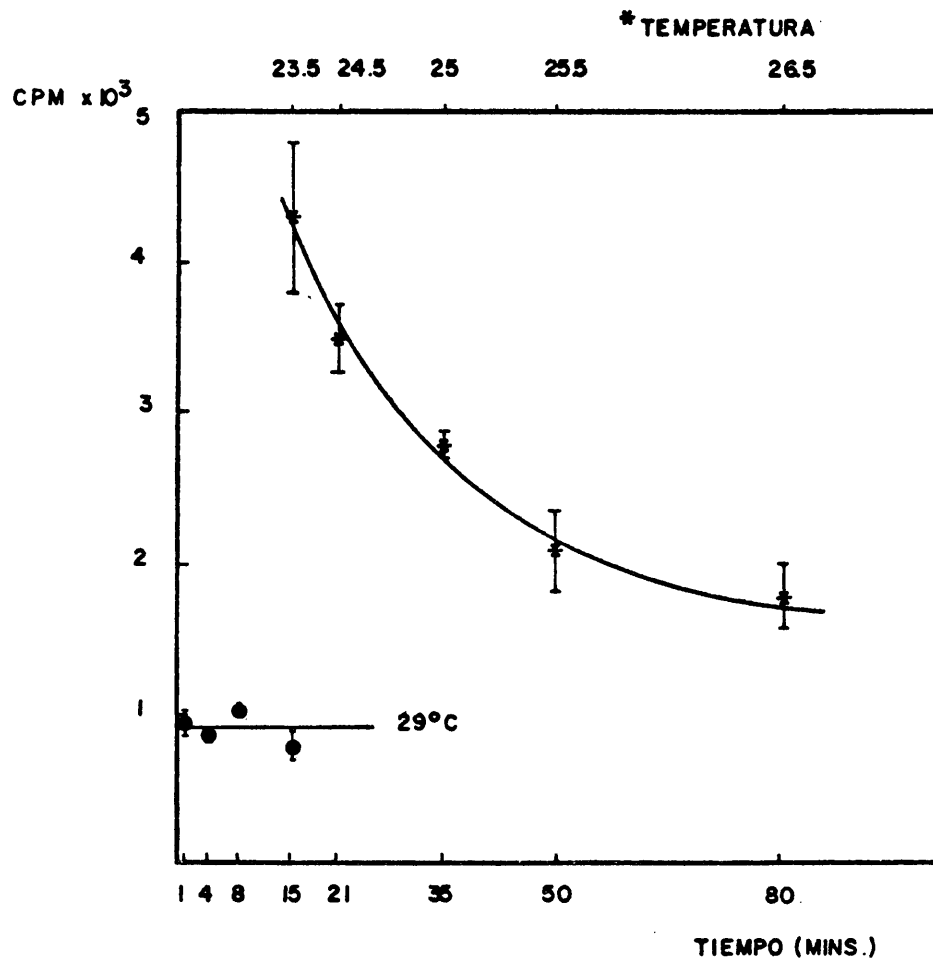


FIGURA 21.- Influencia de la temperatura de preincubación en la recepción, por la superficie de Tetrahymena, de un pulso con ³H-DNA de 1 minuto de duración. Medio nutriente.

—*— Temperatura variable (23-27°C).

● Temperatura constante, alta (29°C).

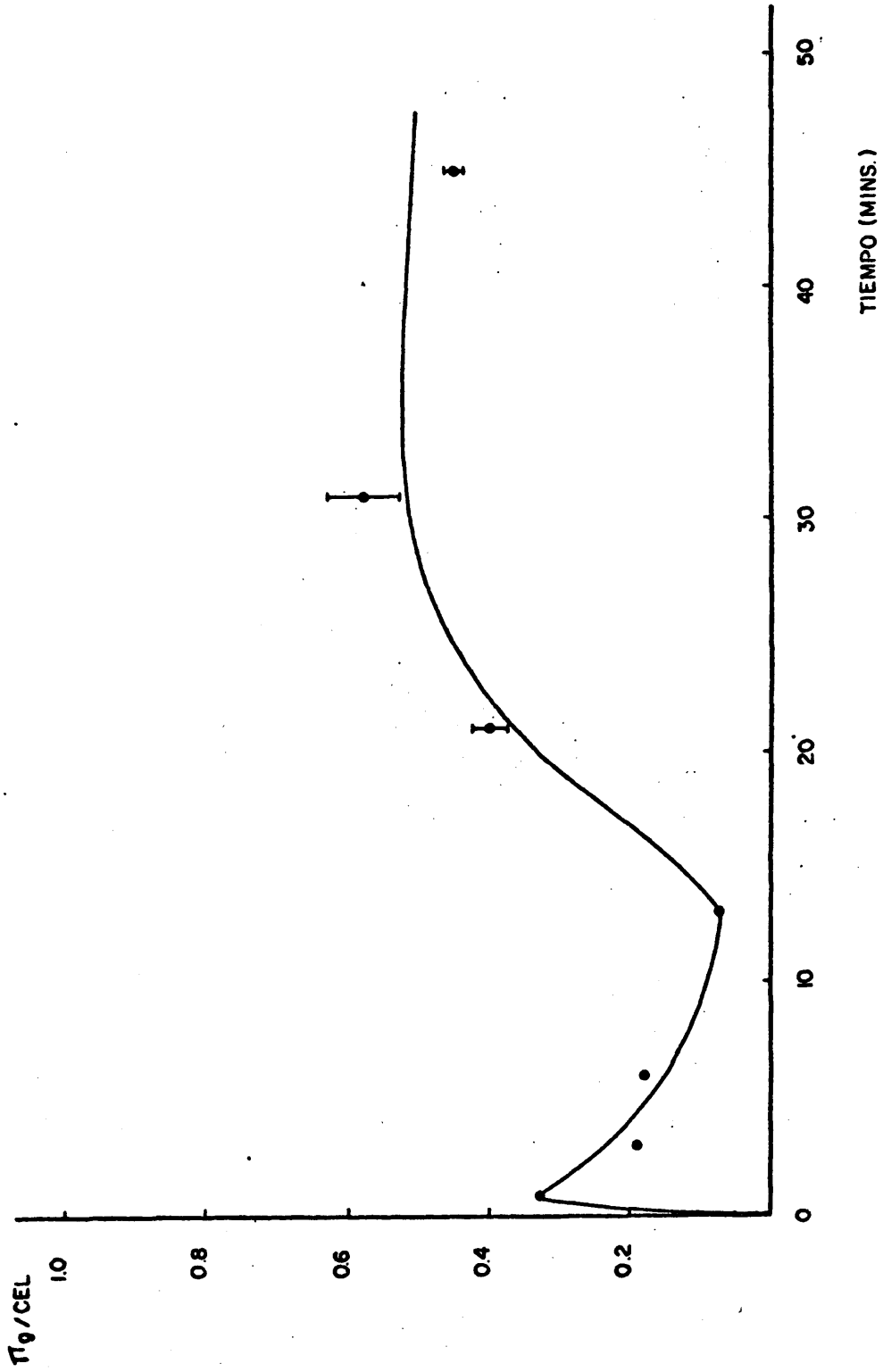


FIGURA 22.- Asociación del ^3H -DNA con la superficie de Tetrahymena. Diferentes tiempos de preincubación con RNA de levadura. Medio nutriente.

trahymena (medida por las diferencias en el DNA incorporado durante un minuto de pulso), *es menor* que la velocidad observada para el mismo proceso, cuando se preincubaba con DNA: mientras que en este último el máximo de ocupación (mínima receptividad del ^3H -DNA de pulso) tiene lugar a un tiempo de 3-4 minutos, el mismo fenómeno tarda en ocurrir 13-15 minutos, cuando el biopolímero presente es RNA.

Asimismo ocurre con el proceso de liberación de la membrana. En el DNA la capacidad receptiva de la superficie celular para un DNA nuevo, quedaba estabilizada después de un periodo de aproximadamente 6-8 minutos a partir del punto de máxima ocupación. El mismo paso toma más de 20 minutos cuando es el RNA el biopolímero adherido a la envoltura. No está probado que RNA y DNA se adhieran en los mismos puntos receptores. Sin embargo, la influencia del RNA en la ulterior recepción de DNA, es bien patente.

III.a.2.5. DIFERENTES TIEMPOS DE PREINCUBACION CON UN POLIANION SINTETICO (POLIGLUTAMICO)

La preincubación con otro posible competidor polianiónico para los receptores de DNA, dio los resultados siguientes (Fig. 23). No se ha observado ninguna peculiaridad cinética en el equilibrio Poliglutámico unido \rightleftharpoons poliglutámico liberado.

Los datos parecen indicar una *unión progresiva* del poliglutámico con Tetrahymena que ocasiona un paulatino descenso en la incorporación del ^3H -DNA a medida que el tiempo de preincubación aumenta.

En tiempos cortos (1 minuto de preincubación) la capacidad receptiva de ^3H -DNA es significativamente mayor que a tiempos inmediatamente superiores. Las posibilidades de captura a tiempos más largos que 3 minutos -y hasta los 70 minutos- van descendiendo gradualmente y de forma suave.

Por otro lado, *la afinidad que demuestra el poliglutámico* por la envoltura celular *es menor* que la exhibida por los dos polianiones naturales. A su vez, se advierte que el proceso de bloqueo prosigue lentamente sin observarse una liberación brusca de los sitios ocupados. Especulativamente, y en parte, podemos relacionar este proceso con una *endocitosis continua* desencadenada por el poliglutámico presente en el medio de preincubación, que provocaría la desaparición progresiva de los puntos funcionalmente cualificados como receptores de polianiones. Dada la

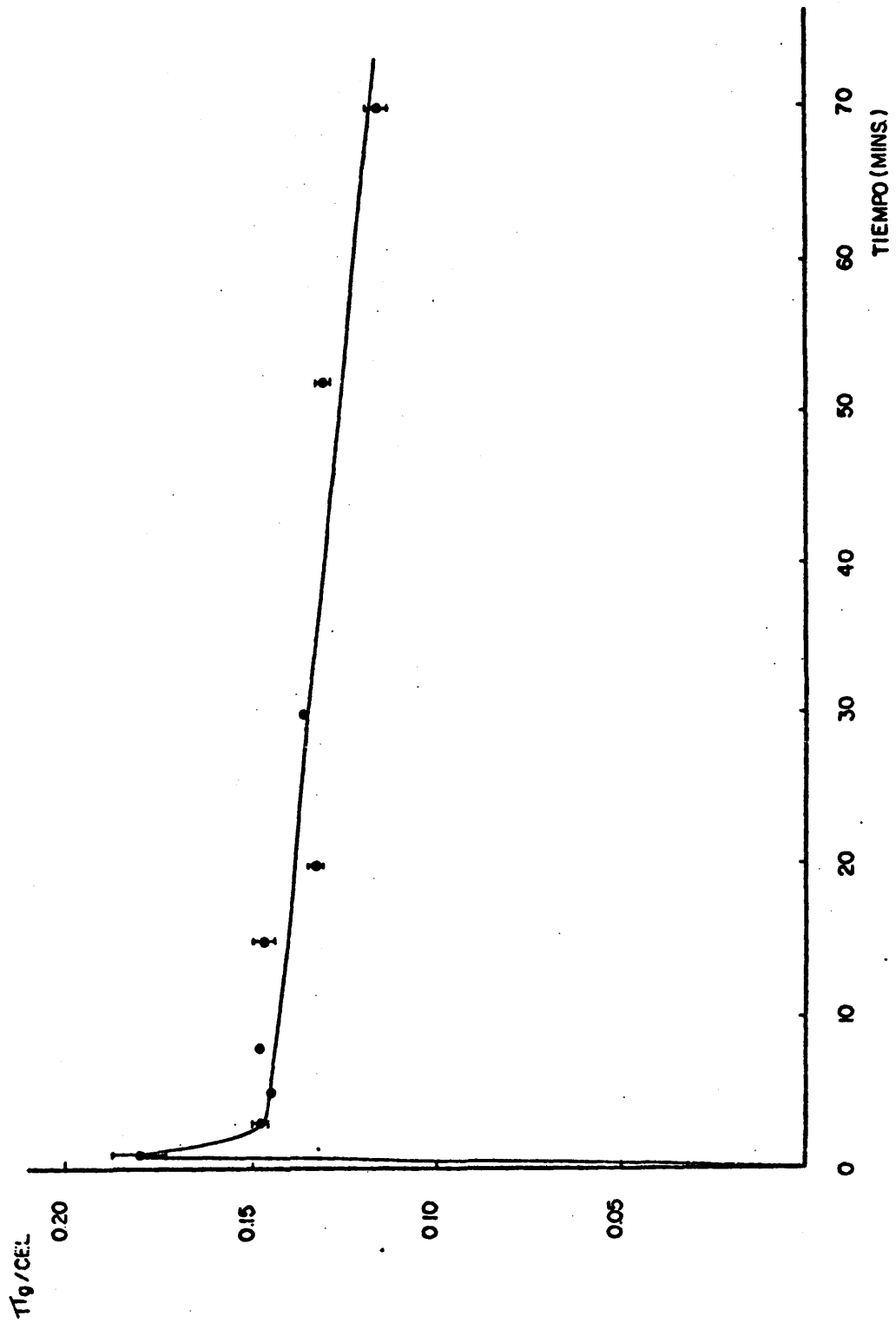


FIGURA 23.- Asociación del ^3H -DNA con la superficie de Tetrahymena. Diferentes tiempos de preincubación con el polianión sintético Poliglutámico (PG), PM = 48000 daltons, 308 resos. Medio nutriente.

diversidad fisiológica de los individuos del cultivo, el resultado estadístico sería una función levemente descendente con el tiempo, ya que cada célula iniciaría y terminaría su ciclo endocitótico en momentos diferentes. (Esta es una de las razones por las que hemos escogido el tiempo de 5 minutos de preincubación para la saturación secuencial con poliglutámico. (III.a.2.7).

III.a.2.6. ESTADO DEL ³H-DNA INCORPORADO

Se realizaron cromatografías del ³H-DNA asociado en un minuto de pulso a células preincubadas durante 10 minutos con concentraciones altas de RNA (200 µg/ml) y Poliglutámico (200 µg/ml). Los resultados encontrados se recogen en la tabla siguiente:

FRACCION	RNA (%)	PG (%)	CONTROL
NR + II	0,2	0	0,8
III	5,1	6,8	1,8
IV	71,5** (± 7)	51,0* (± 5)	35,2*
V	17,9	21,6	39,0*
VI	4,3	3,0	7,3
VII	0,4	4,4	9,2
VIII	0,5	5,2	6,7
	99,9	100,0	100,0

(La concentración de células fue en todos los casos de $1,5 \times 10^6$ /ml)

En ambos casos se observa que la degradación a fracción IV -detectada en la preincubación con DNA de timo- sigue existiendo. Resalta la fracción IV obtenida en la preincubación con RNA, mayor incluso que la aparecida en presencia de DNA. (Datos en III.a.2.2).

La figura 24 expresa gráficamente los resultados. La mayor degradación provodada por la preincubación con RNA, nos será útil en la interpretación de III.a.2.7.

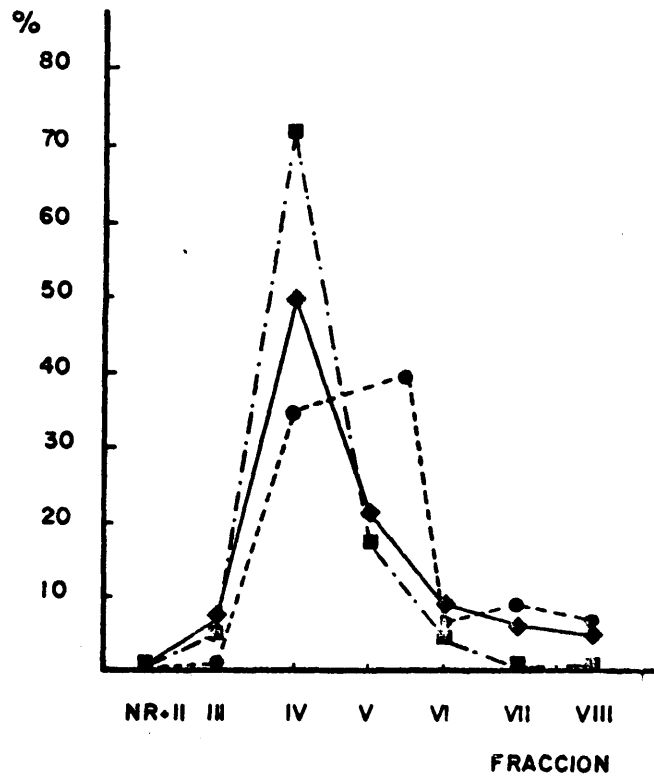


FIGURA 24.- Dispersión de tamaños moleculares del ³H-DNA retenido por *Tetrahymena pyriformis* durante un pulso de 1 minuto de duración en medio nutriente.

- Preincubación 10 minutos con RNA de levadura (200 µg/ml).
- ◇--- Preincubación 10 minutos con PG (200 µg/ml).
- Control ³H-DNA.

III.a.2.7. SATURACION SECUENCIAL CON DIFERENTES POLIANIONES

Se han preincubado células de Tetrahymena en presencia de *diferentes concentraciones* de los biopolímeros DNA de timo de ternera ($PM = 14 \times 10^6$ daltons), RNA de levadura (de alta polimerización) y el polianión sintético Poliglutámico (PG) (308 residuos, equivalente a un PM 48000 daltons).

En los experimentos particulares con cada una de esas macromoléculas, *el tiempo de preincubación se mantuvo constante*, eligiéndose esta variable con criterios basados en el comportamiento cinético, expresado más arriba, de dichos biopolímeros aniónicos. Una vez transcurrido éste, se da un pulso de 1 minuto con ^3H -DNA midiéndose la incorporación como se describe en la sección II de esta Tesis. Así, los tres casos estudiados:

a) *Preincubación con DNA de timo*; el tiempo experimental de contacto DNA \longleftrightarrow células fue de 20 minutos. En este intervalo de tiempo ya se ha alcanzado la fase en la que la capacidad receptiva de la superficie de Tetrahymena (pulso de 1 minuto) permanece constante.

b) *Preincubación con Poliglutámico*. El tiempo fue de 5 minutos por ser un tiempo más cómodo operativamente, a la vez que ofrecía las mismas características de estabilización en la captura (endocitosis continua en este caso).

c) *Preincubación con RNA de levadura*; se escogió un tiempo de 10 minutos. En este momento, la curva cinética muestra un mínimo en la recepción del ^3H -DNA de pulso. Dado que la estabilización de la capacidad receptiva es más problemática de definir que en el caso del DNA, hemos escogido el punto singular aludido. Por otro lado, el mayor efecto (inhibición, competencia, etc.) de la creciente concentración de RNA sobre la incorporación del ^3H -DNA podrá, lógicamente, observarse mejor, al tiempo en que ésta se encuentra más impedida por la presencia del RNA, que desde el medio de preincubación, haya podido alcanzar los puntos receptores de la superficie de Tetrahymena.

III.a.2.7.1. Análisis de los resultados

Durante la preincubación se establecerá un equilibrio de asociación cuyo balance de materia para el DNA, RNA y PG, será:

$$D = (1 - d)D + dD \quad ; \quad R = (1 - r)R + rR \quad ; \quad P = (1 - p)P + rP$$

D = Concentración de DNA de timo de ternera en la preincubación (variable experimental).

R = Concentración de RNA.

P = Concentración de Poliglutamato.

dD = Fracción molar de DNA de timo unida en la preincubación (rR y pP para RNA y Poliglutamato).

(1-d)D = Idem, que permanece en el medio de incubación.

Al añadir el ^3H -DNA de pulso, el estado de equilibrio de las concentraciones de DNA, previamente alcanzado en la preincubación, va a modificarse.

El nuevo balance de materia para el DNA total presente será:

$$D^* + dD + (1-d)D = d'D + (1-d')D + wD^* + (1-w)D^*$$

D^* = Concentración del ^3H -DNA de pulso.

wD^* = Fracción molar de ^3H -DNA unida después del pulso.

$(1-w)D^*$ = Idem que permanece en el medio.

$d'D$ = Fracción molar de DNA de timo unida después del pulso. Su modificación se debe a la entrada perturbadora de D^* .

$(1-d')D$ = Idem que permanece en el medio.

Para ambos procesos, podemos escribir las relaciones entre biopolímero unido/biopolímero libre, después de cumplido el pulso con ^3H -DNA.

$$r_1^D = \frac{dD}{(1-d)D}; \quad r_2^D = \frac{d'D + wD^*}{(1-d')D + (1-w)D^*} = \frac{d' + wD^*/D}{1-d' + (1-w)D^*/D}$$

Llamando Δ_D a la proporción D^*/D , Δ_R a $D^*/(\text{RNA})$ y Δ_P a $D^*/(\text{PG})$, tendremos respectivamente:

$$r_2^D = \frac{d' + w\Delta_D}{1-d' + (1-w)\Delta_D}; \quad r_2^R = \frac{r' + w\Delta_R}{1-r' + (1-w)\Delta_R}; \quad r_2^P = \frac{p' + w\Delta_P}{1-p' + (1-w)\Delta_P}$$

A partir del dato obtenido por contaje, puede deducirse el número de π g/célula de ^3H -DNA incorporados. Como la concentración de ^3H -DNA y por supuesto el número de células, son magnitudes conocidas, podrá calcularse también el número de π g/células de ^3H -DNA puestos en el pulso, y de

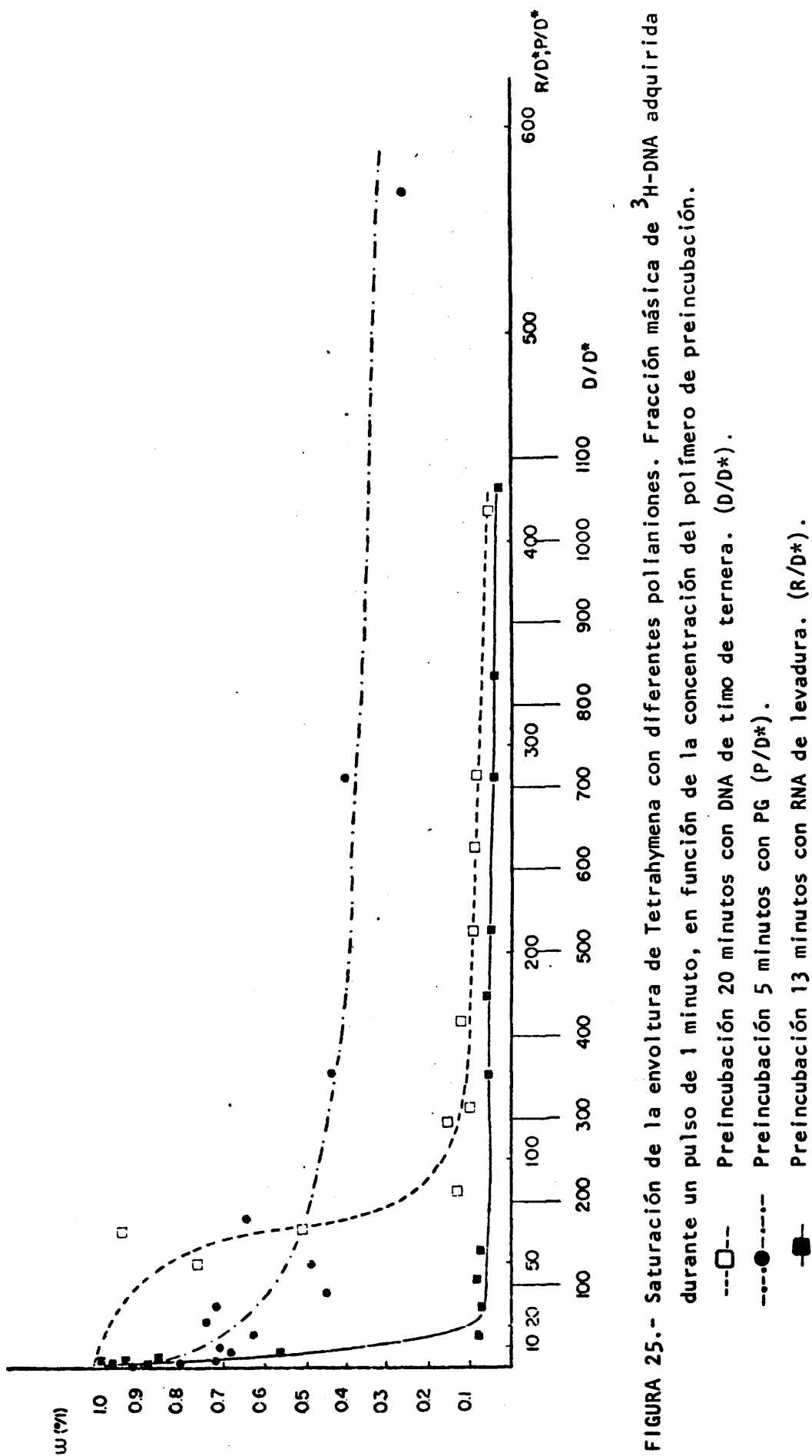


FIGURA 25.- Saturación de la envoltura de Tetrahymena con diferentes polianiones. Fracción másica de ^3H -DNA adquirida durante un pulso de 1 minuto, en función de la concentración del polímero de preincubación.

---□-- Preincubación 20 minutos con DNA de timo de ternera. (D/D^*).

---●--- Preincubación 5 minutos con PG (P/D*).

—■— Preincubación 13 minutos con RNA de levadura. (R/D^*).

aquí el $\frac{\pi}{1}$ de incorporación habida en cada situación experimental:

$$w = \frac{\pi \text{ g/célula (incorporados)}}{\pi \text{ g/célula (totales)}}$$

Cuando la cantidad de $^3\text{H-DNA}$ sea despreciable ante la de DNA de preincubación, w valdrá cero.

Las funciones d , r y P , d' , r' y P' y r_2^D , r_2^R y r_2^P , son a su vez todas ellas funciones de las respectivas variables experimentales Δ_D , Δ_R y Δ_P .

El valor máximo de w , será obviamente 1, cuando todo el $^3\text{H-DNA}$ de pulso se incorpore a Tetrahymena, lo que ocurrirá cuando exista un exceso de sitios capaces de recibir al $^3\text{H-DNA}$.

III.a.2.7.2. Resultados y discusión

En la figura 25 se han representado las *variaciones de w , con las variables D/D^* , R/D^* y P/D^** . En ella puede observarse como difieren las *respectivas capacidades inhibitoras de la recepción del $^3\text{H-DNA}$* , como consecuencia de la acción de concentraciones crecientes de DNA, RNA y PG presentes en la preincubación.

Las concentraciones crecientes de RNA, preincubadas 10 minutos (tiempo de máxima adhesión en la superficie, Fig. 19) presentan un *enorme efecto inhibitor a concentraciones bajas de RNA*. A partir de una R/D^* de 15 aproximadamente, ya se observa la estabilización en la capacidad receptiva, oscilando ésta entre $w = 0,07$ y $w = 0,025$, valor alcanzado a $R/D^* = 430$, (entre 0 y 15, desciende desde $w \approx 1,0$ hasta $w = 0,07$). Este efecto puede estar relacionado con la *gran degradación del $^3\text{H-DNA}$ observada en 1 minuto de pulso*, cuando se ha realizado una preincubación de 10' con altas concentraciones de RNA (III.a.2.6). En este sentido podría apuntarse la posibilidad de que *el RNA adherido a la envoltura de Tetrahymena aumentase la degradación* y como consecuencia, la mayor liberación del $^3\text{H-DNA}$ de pulso que compite con el RNA para su asociación con la superficie celular, conduciría a una menor asociación de aquel.

El comportamiento del poliglutámico en la preincubación es similar al exhibido por el RNA, si bien el intervalo en la relación P/D^* en el que presenta fuerte influencia es considerablemente más amplio (oscila entre 0 y 300, para un descenso de w desde el 0,95 hasta el 0,4) *indicando una menor potencia inhibitora que el RNA*. Hemos de recordar, que

esta experiencia está realizada a un tiempo de 5 minutos en el que, según la curva cinética, la capacidad de recepción para el ^3H -DNA ya permanecía (en adelante) estabilizada con el tiempo de preincubación.

La degradación del ^3H -DNA de pulso provocada en 1 minuto por Tetrahymena preincubada con poliglutamato, es la misma que la observada cuando la preincubación se realizó con DNA de tino (o la observada cuando no se realizó preincubación). No parece pues, tener un efecto estimulador del proceso degradativo; por otro lado, la inhibición de la capacidad de recepción del pulso es menor a relaciones P/D^* altas que la exhibida por RNA y DNA, ya que comienza a estabilizarse a valores de w comprendidos entre 0,4 y 0,5.

La inhibición provocada por el DNA de preincubación, es igualmente abrupta en su primera fase, que la observada en el RNA. Ambas son mayores que la originada por el poliglutamato. Sin embargo, el efecto del DNA se manifiesta a concentraciones de preincubación mucho mayores que el RNA y PG. Ello debe estar, obviamente, relacionado con la estequiometría del equilibrio de asociación. Evidentemente, si la unión polianión-célula de Tetrahymena, se verifica en la forma "mol a mol" (una agrupación receptora por cada molécula de polianión que se recibe), harán falta más unidades másicas del polianión de mayor tamaño para saturar los mismos sitios receptores.

Sabemos por la experiencia cinética (III.a.2.4) que el DNA de preincubación bloquea y desbloquea la superficie celular (se une y se libera) más rápidamente que el RNA de preincubación; ello abogaría por una mayor afinidad del DNA para la disposición molecular receptora de polianiones. Cabría entonces atribuir su rápida liberación a una degradación "in situ" de las moléculas de DNA recibidas. Del mismo modo, puede relacionarse el mayor efecto inhibitorio de la captura presentado por la preincubación con RNA, con el estímulo que éste provoca en la degradación del ^3H -DNA recibido durante el tiempo de pulso.

La naturaleza no biológica del poliglutamato, hace que los datos con él obtenidos no sean funcionalmente comparables con los procedentes de las experiencias de RNA y DNA. Los resultados sugieren una pobre inhibición del proceso de captura del DNA, aunque se evidencie una cierta capacidad de ocupación de los sitios receptores.

Por otro lado, hemos de señalar que todos estos datos -excepto la aguda degradación a fracción IV- quedan explicados en el modelo electros

tático planteado a partir de las experiencias de incorporación directa. Allí señalábamos la posibilidad de que tras la adhesión del polianión, el cambio en las propiedades eléctricas de la superficie del protozoo, con salida masiva de iones positivos, determinaría una menor capacidad de la célula para retener al polianión.

En este sentido, los datos cinéticos indicaban una mayor potencia (en cuanto a la producción del cambio electrostático se refiere) por parte del DNA que por parte del RNA y poliglutámico, sin duda consecuencia del mayor contenido eléctrico de las moléculas de DNA sobre las de RNA y las de PG, en este orden.

Si aceptamos este hecho como cierto en las proximidades del protozoo (carga del DNA/molécula > carga del RNA/molécula > carga del poliglutamico/molécula), quedarían *explicadas las diferentes evoluciones cinéticas de la capacidad receptiva* de $^3\text{H-DNA}$ que provocan los tres polianiones: el DNA se une antes, antes provoca la salida de iones positivos y, por consiguiente, su liberación será la más rápida. Por el contrario, el poliglutámico no provoca este efecto, o al menos de una forma tan acusada. De ahí, su escasa afinidad por la membrana y su pequeña velocidad de liberación una vez asociado. Su leve poder inhibitor de la captura a relaciones P/D* altas se debería a un desplazamiento -desde el receptor y hacia el medio- del PG adherido cuando entran en juego las moléculas de $^3\text{H-DNA}$ fuertemente cargadas. El caso del RNA, intermedio en carga, sería también intermedio en asociarse y liberarse. Y, en efecto, eso es lo que ocurre.

Sin embargo, en este modelo, no se da cuenta de la degradación que sufre el $^3\text{H-DNA}$. Por autorradiografía, hemos demostrado que a 1 minuto, el DNA se asocia con el exterior de las células en cantidades sorprendentemente altas. Es pues, evidente, que el DNA no penetra (*en 1 minuto*) hasta alcanzar en las células los orgánulos continentales de DNA *asas* -y si lo hace, no será en cantidades significativas-. En consecuencia, podemos atribuir *la degradación del $^3\text{H-DNA}$* a dos posibles causas, ambas *relacionadas con la superficie celular*:

a) *El receptor polianiónico es, en sí mismo, una DNA asa.*

b) *La degradación se debe a fenómenos mecánicos derivados de la vitalidad del protozoo: entre ellos, podríamos imaginar torbellinos provocados por el movimiento ciliar, contracciones de la superficie celular*

-modificada en su carga y conformación de macromoléculas externas- etc. Esta segunda alternativa no parece muy clara; entre otras cosas habríamos de suponer alguna razón desconocida, por la que el RNA estimulara el proceso de degradación del DNA a tiempos mínimos de contacto.

Hemos de recordar, que cada vez son más numerosas las citas bibliográficas relativas a la presencia de nucleasas -de todo tipo- en la superficie de células de orígenes diversos, por lo que no sería de extrañar la existencia de una endonucleasa en la envoltura de *Tetrahymena pyriformis*, cepa w, similar a la descrita por Dubnau y Cirigliano (1972) en *Bacillus subtilis*.

En este punto, *podría pues decirse que se ha detectado la presencia en la superficie de Tetrahymena de un receptor de polianiones, con una acción degradadora para el DNA* (no hay datos para apuntar el mismo hecho respecto al RNA), de modo que dicha acción, se incrementa con la presencia de RNA y no -apreciablemente- con la de poliglutámico. En favor de la existencia de dicha actividad enzimática relacionada con la liberación del ^3H -DNA, puede citarse el hecho ya mencionado de la modificación de ambos procesos -en sentido cooperativo positivo- al variar la temperatura de experimentación.

III.a.2.7.3. Preincubación simultánea con DNA de timo y RNA de levadura

Se determinó la capacidad de *Tetrahymena* para recibir ^3H -DNA durante 1 minuto de pulso, una vez que se había preincubado con diferentes cantidades de RNA y DNA.

Los resultados se reflejan en las figuras 26 y 27; puede apreciarse que la presencia de ambos biopolímeros ejerce una acción inhibidora incrementada respecto a la que ambos producen en ausencia del otro. Sin embargo, resalta *la enorme inhibición producida por el RNA* (representación de W frente a D/D*) y el *escaso efecto adicional de inhibición producido por el DNA* (representación de W frente a R/D*).

El fenómeno competitivo entre DNA y RNA por los sitios específicos superficiales se puso de manifiesto en otro experimento de preincubación con RNA, pero utilizando, durante el pulso de 1 minuto, dos ^3H -DNA de diferente grado de polimerización, El ^3H -DNA de tamaño superior, se incorporaba en mayor porcentaje a igualdad de concentración de RNA en la preincubación. Los resultados se expresan gráficamente en la figura 28.

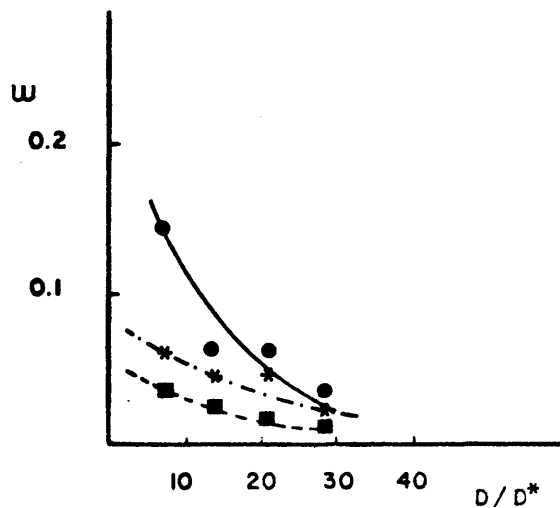


FIGURA 26.- Preincubación simultánea con RNA y DNA. Fracción másica adquirida durante un pulso de 1 minuto, en función de la concentración de DNA (D/D^*) en la preincubación. Medio nutriente.

● (RNA) = 25 $\mu\text{g/ml}$; * (RNA) = 30 $\mu\text{g/ml}$.
■ (RNA) = 50 $\mu\text{g/ml}$.

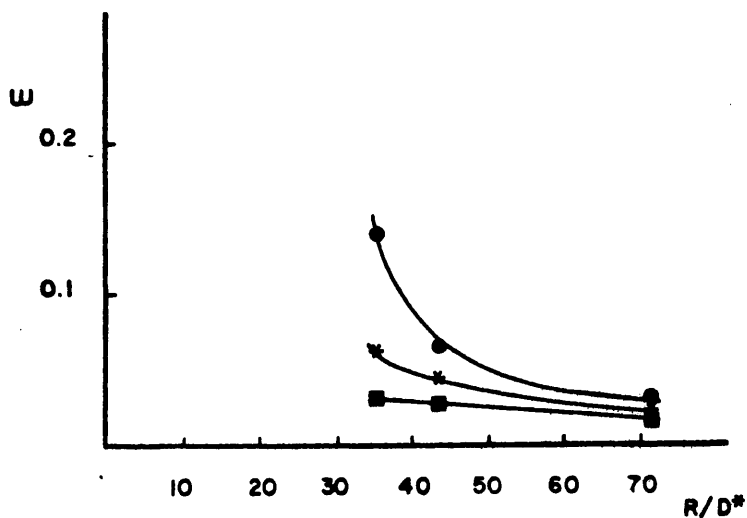


FIGURA 27.- Preincubación simultánea con RNA y DNA. Fracción másica adquirida durante un pulso de 1 minuto en función de la concentración de RNA (R/D^*) en la preincubación.

● (DNA) = 5 $\mu\text{g/ml}$; * (DNA) = 10 $\mu\text{g/ml}$;
■ (DNA) = 20 $\mu\text{g/ml}$.

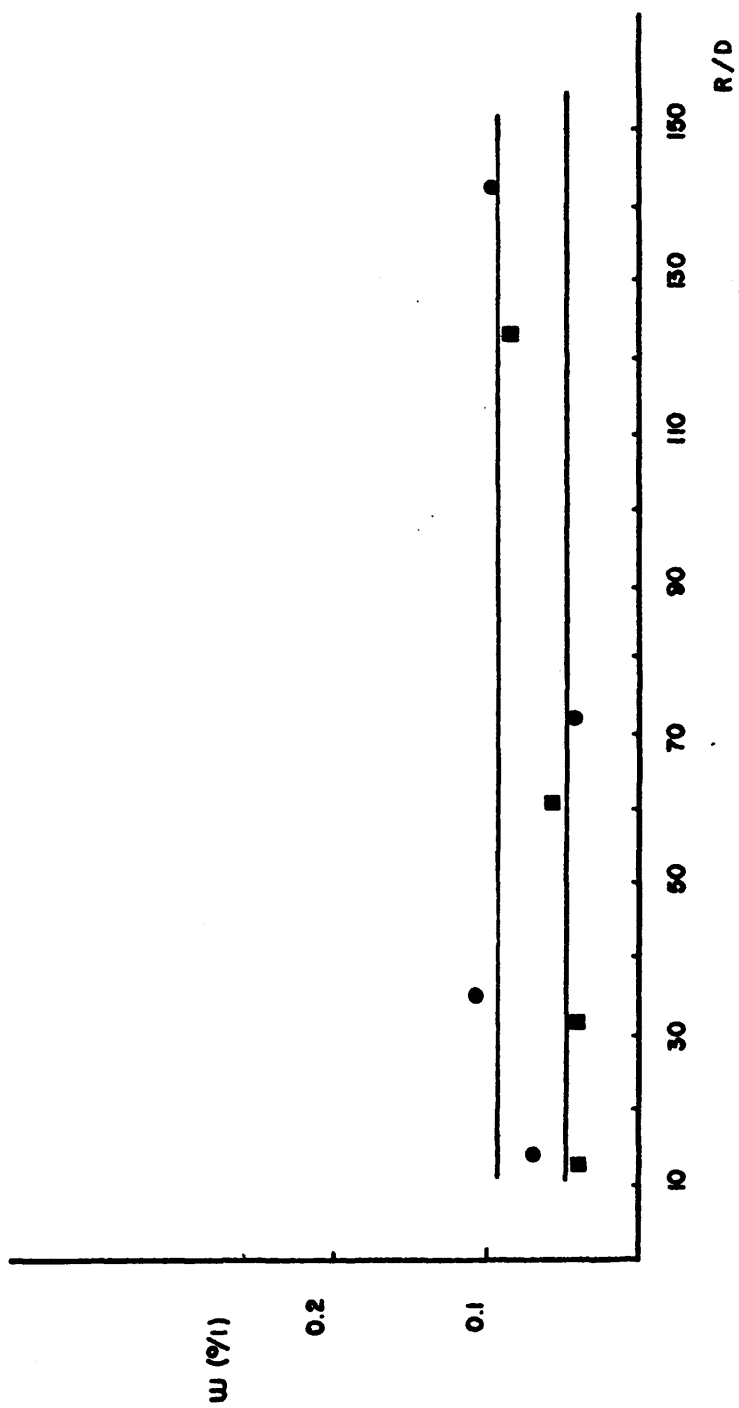


FIGURA 28.- Competencia entre DNA y RNA por los puntos receptores de polianiones en la superficie de Tetrahymena. Preincubación 10 minutos con RNA y pulsos de 1 minuto, con ^3H -DNA de diferentes tamaños moleculares.

■ - ^3H -DNA polimerizado.

● - ^3H -DNA poco polimerizado.

Es lógico que la competencia por las agrupaciones moleculares de la superficie celular con carga electrostática opuesta -y que, por tanto, puedan actuar como receptores de ambos polianiones- quede desplazada a favor de la molécula de ^3H -DNA de mayor tamaño. Así el ^3H -DNA más polimerizado *desplaza* más eficazmente al RNA que durante la preincubación se hubiera situado en los puntos de recepción, por lo que su incorporación *en unidades másicas*, resultará mayor.

III. b. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EUGLENA GRACILIS, CEPA Z

Los experimentos realizados sobre la cepa Z del flagelado *Euglena gracilis*, tienen por finalidad el aportar *elementos de comparación* con los datos obtenidos sobre *Tetrahymena pyriformis*. En ocasiones, los resultados abogan por una *similitud fenomenológica* entre ambos protozoos clasificados en grupos taxonómicos muy distantes (*Euglena* es un fitoflagelado del orden Euglenida y *Tetrahymena* un ciliado del orden Hymenostomatida). Sin embargo, *hay factores experimentales que, como se verá, condicionan de modo radicalmente opuesto la captura e incorporación de DNA exógeno a dichos cultivos*. Por último, señalemos que en procesos conceptualmente idénticos, ambos protozoos exhiben *propiedades cuantitativas diferentes* que, en general, se relacionan con sus *distintas capacidades para degradar y recibir al DNA en la superficie celular*.

III. b. 1. INCORPORACION DIRECTA DE ^3H -DNA PRESENTE EN EL MEDIO DE INCUBACION POR CELULAS DE EUGLENA GRACILIS

Se han observado *variaciones en la cuantía* de la incorporación de DNA exógeno, en dependencia de diferentes variables experimentales; dichos condicionamientos externos fueron:

A) Respecto del *estado de cultivo*; experimentos cinéticos.

- 1.- *Diferentes medios de incubación*. Medio de crecimiento a pH 7 y medios no nutrientes compuestos por soluciones catiónicas 0.035M.
- 2.- *Diferentes temperaturas*, en medios no nutrientes.
- 3.- *Diferentes fuerzas iónicas*, en soluciones de NaCl (tiempo de incubación constante).

B) Respecto del estado del DNA exógeno.

- 1.- Diferentes grados de polimerización (experimentos cinéticos).
- 2.- Diferentes concentraciones de ^3H -DNA (tiempo de incubación constante).

III.b.1.1. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE ^3H -DNA EN EL MEDIO DE INCUBACION NO NUTRIENTE

Se observa un fenómeno idéntico al encontrado en Tetrahymena, con un aumento lineal de la captura según se incrementa la concentración de ^3H -DNA exterior. En el intervalo experimentado, no se alcanza la saturación del cultivo; el tiempo de incubación, constante para todas las concentraciones, fue de 10 minutos (Fig. 29). Los otros factores que pueden modificar este comportamiento, han quedado expuestos en la sección III.a.1.1 de esta Tesis.

III.b.1.2. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE IONES SODIO EN EL MEDIO

No es indiferente a la concentración exterior de NaCl el proceso de captura de ^3H -DNA llevado a cabo por Euglena gracilis en medios no nutrientes, constituidos exclusivamente por soluciones de dicha sal. La figura 30 muestra esta influencia.

A partir de concentraciones 15 mM en NaCl se observa un aumento progresivo de la incorporación, posiblemente por aumentar la carga positiva de las células, tras la interiorización del catión Na^+ . No es fácil interpretar la mayor captura registrada a concentraciones bajas, si bien podemos aceptar que la fuerza iónica del medio de incubación, va a afectar a todos aquellos fenómenos dependientes de la carga (y por tanto, de la conformación) de la superficie celular; en este sentido, podríamos argüir que las bajas concentraciones de NaCl favorecen la accesibilidad del ^3H -DNA a los puntos superficiales de anclaje, al tiempo que las altas concentraciones de la sal aumentan el contenido electrostático positivo de las células por interiorización progresiva del Na^+ circundante. El mínimo observado correspondería a una situación de compromiso entre ambos extremos experimentales.

Por otro lado, el tiempo de incubación ensayado fue de 10 minutos. A este tiempo le corresponde el final de la liberación inicial del ^3H -DNA adherido a la superficie del protozoo (III.b.1.3) y la endocitosis del biopolímero ya ha comenzado; obviamente este proceso también

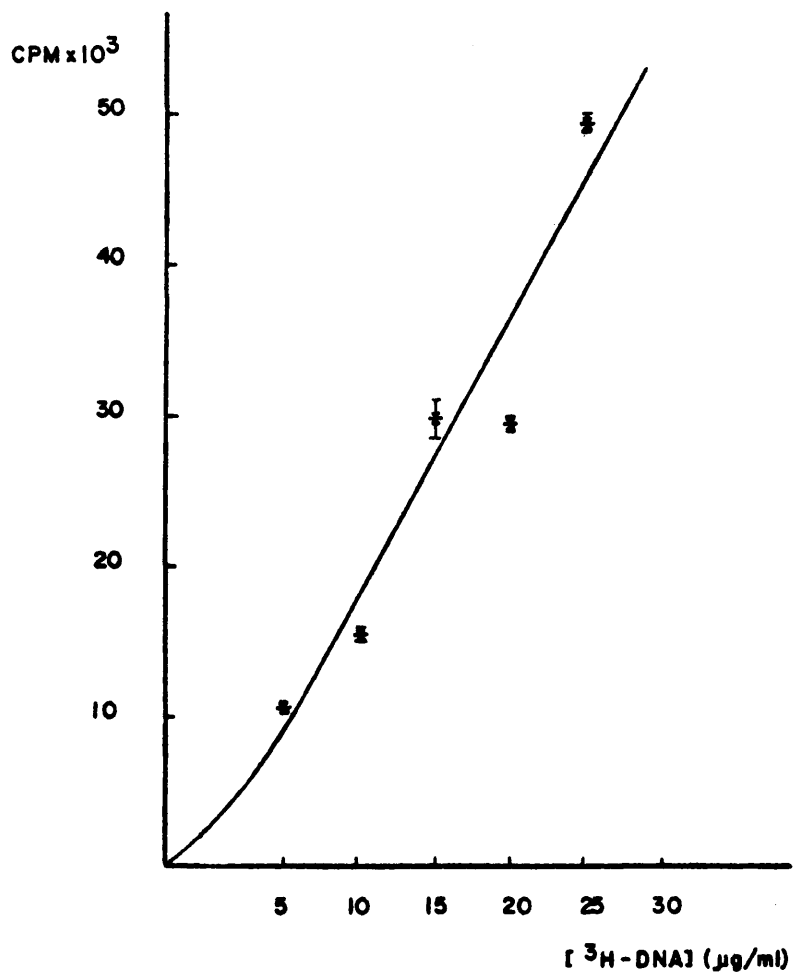


FIGURA 29.- Influencia de la concentración de ^3H -DNA en su captura directa del medio -no nutriente- por células de *Euglena gracilis*.
— Tiempo de incubación: 10 minutos.

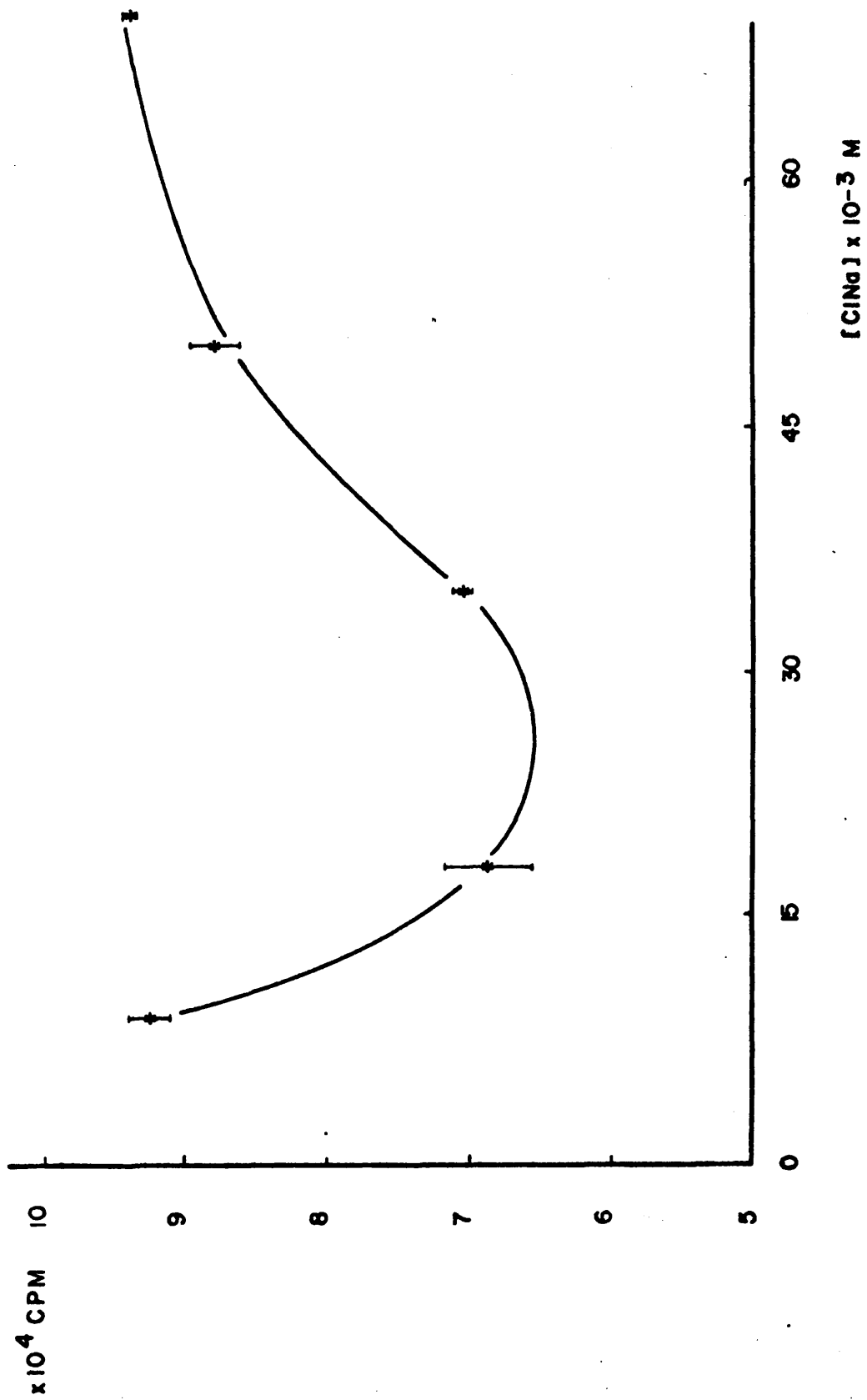


FIGURA 30.- Influencia de la concentración de NaCl en la captura directa del medio (NaCl a diferentes concentraciones) de ^3H -DNA, por células de *Euglena gracilis*.

debe verse afectado por el transporte iónico y la concentración salina exterior. De este modo la mayor *retención* del ^3H -DNA asociado (9 mM) indicaría una rapidez mayor en el desencadenamiento del proceso de ingestión, o una velocidad de liberación del ^3H -DNA al medio menor que a fuerzas iónicas algo más altas. Este efecto sería superado posteriormente por el aumento del potencial electrostático, justificándose así la elevación de la captura a fuerzas iónicas más altas.

III.b.1.3. CINETICA DE CAPTURA DE ^3H -DNA EN MEDIOS NO NUTRIENTES

De nuevo observamos (Fig. 31) profundas diferencias en las cinéticas de incorporación de DNA exógeno, en función de los diversos cationes que, en concentraciones del intervalo milimolar, constituyen los medios no nutrientes de incubación (LiCl, NaCl, KCl y NH_4Cl , todos ellos 0,035 M).

El fenómeno es análogo al encontrado en *Tetrahymena pyriformis*, poniéndose aquí también, como causa de las radicales diferencias entre los distintos medios, una alteración en los potenciales electrostáticos de las células en su conjunto, según que catión esté presente en su exterior y que por tanto, pueda ser transportado hasta alcanzarse el estado de equilibrio (exterior \rightleftharpoons interior) correspondiente.

El comportamiento presentado por *Euglena* frente a Na^+ y K^+ no es igual al que se puso de manifiesto en *Tetrahymena*, apuntando hacia una diversidad en los procesos de regulación iónica entre los protozoos estudiados, que como es sabido, pertenecen a grupos taxonómicos bien diferenciados en su adaptación evolutiva.

Destaca en primer lugar la mayor captura exhibida por *Euglena* en presencia de catión NH_4 frente a los demás cationes ensayados (Fig. 27). Advirtamos que la observación microscópica de *Euglena*, tras un periodo de 3 horas de incubación en NH_4 (35 mM), reveló la toxicidad de dicha solución para el protozoo, que daba muestras de plasmolisis intensa a la vez que había perdido su motilidad normal.

Por otro lado es evidente la contraposición de efectos detectada entre las incubaciones realizadas con NaCl y LiCl y KCl. Mientras el ión sodio reproduce, en su primera etapa, el proceso encontrado en *Tetrahymena* de captura rápida-cesión gradual, en presencia de ión potasio la incorporación de ^3H -DNA sigue un curso creciente con el tiempo, que

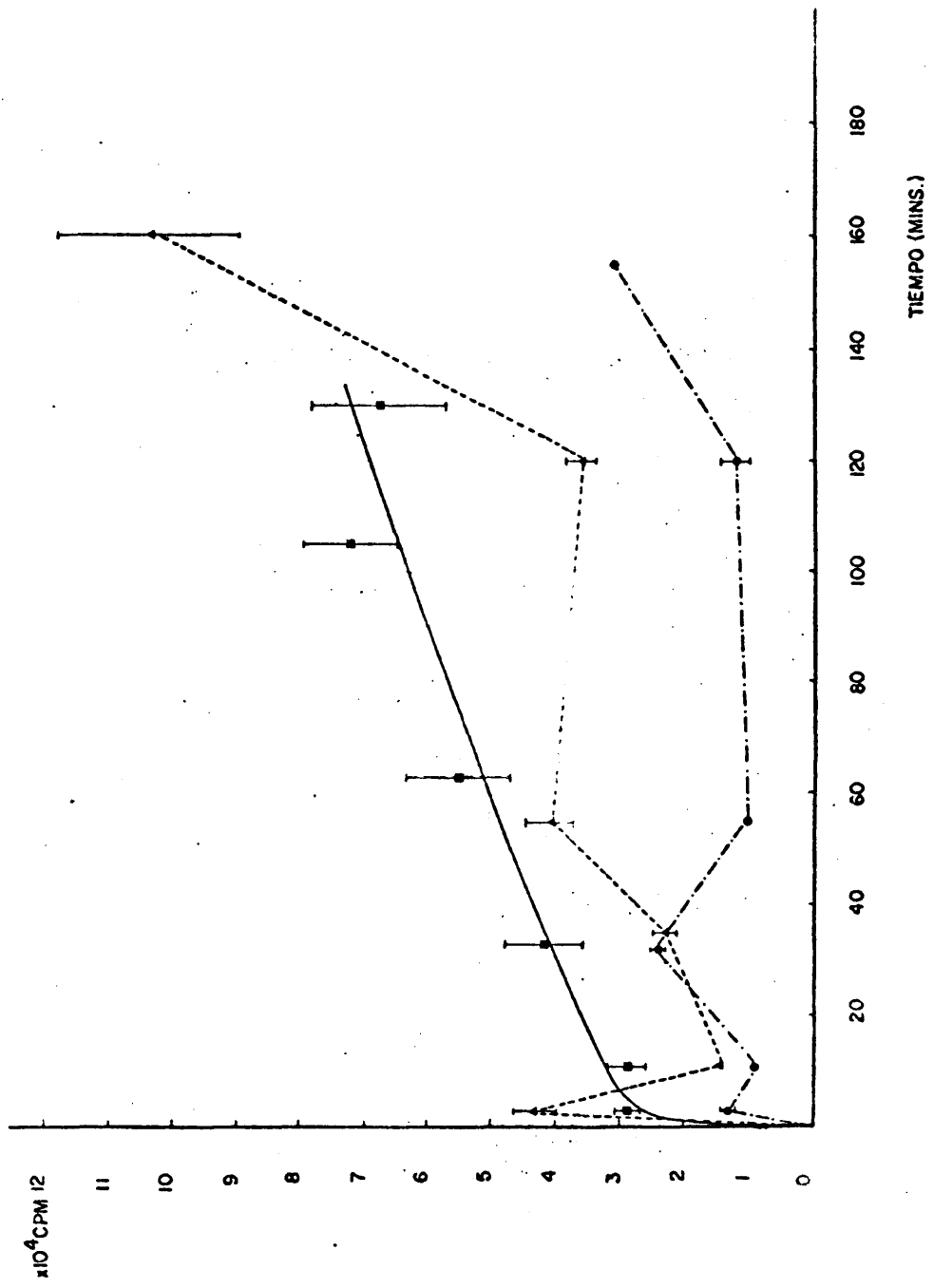


FIGURA 31.- Cinéticas de incorporación directa del medio -no nutriente- de ³H-DNA, por células de Euglena gracilis.

---▲--- NaCl 35 mM; ---●--- LiCl 35 mM; ---■--- KCl 35 mM.

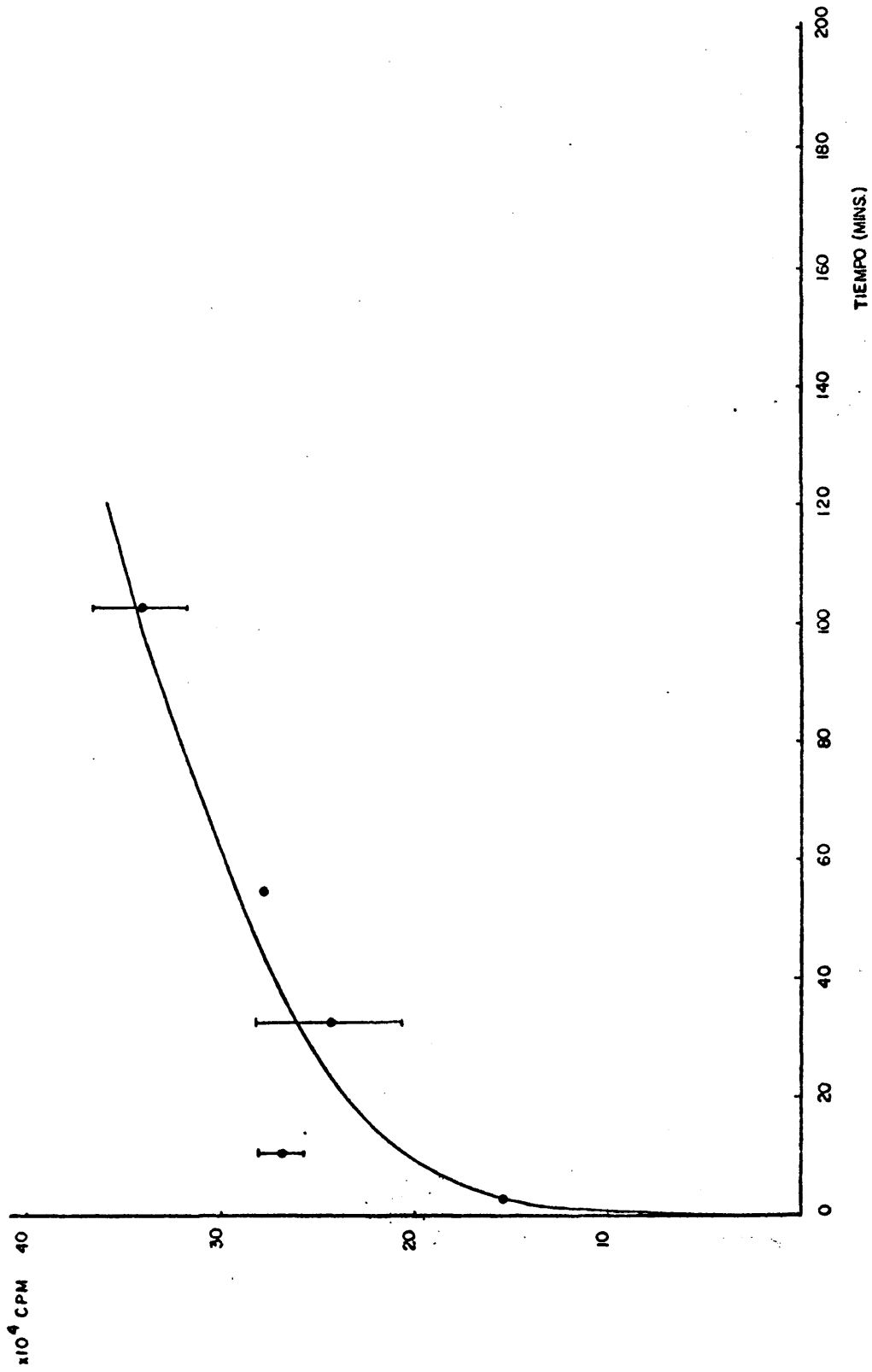


FIGURA 31 bis.- Cinética de incorporación directa del medio NH_4Cl -no nutriente- de ^3H -DNA, por células de *Euglena gracilis*.

tiende a la saturación de la capacidad del cultivo para albergar el DNA exógeno, que parece incorporarse acumulativamente. Esta saturación empieza a manifestarse a un tiempo superior a los 100 minutos indicando una *captura ininterrumpida* desde los primeros instantes de la incubación hasta, por lo menos, 130 minutos.

Las curvas de incorporación *en presencia de NaCl* (y LiCl), dan cuenta de un *peculiar ritmo biológico* que comienza con una captura intensa a tiempos muy cortos (3'); a continuación, se observa el mismo proceso de liberación que en *Tetrahymena*; (su explicación puede adaptarse al *modelo electrostático*, exclusivamente, ya que el fenómeno de degradación del DNA a tiempos de incubación cortos no se ha detectado en *Euglena*). El proceso de liberación conduce a un mínimo en los niveles capturados que se alcanza a un tiempo de unos 10 minutos aproximadamente. Después, con más lentitud que a tiempos muy cortos, la cantidad de DNA exógeno que se incorpora va aumentando hasta niveles comparables con los iniciales. A partir de los 60 minutos el ^3H -DNA incorporado se mantiene prácticamente constante, si bien desciende algo, en dicho nivel comparable con el alcanzado a tiempos muy cortos, y en cualquier caso, superior al primer mínimo detectado. Y, finalmente, el nivel de incorporación se incrementa bruscamente hasta alcanzar cotas superiores a la captura inicial, llegándose así al tiempo más largo estudiado de 165 minutos. (La cinética de captura en presencia de ión litio, sigue un ritmo análogo aunque es cuantitativamente menor respecto al producido con ión sodio).

Estos resultados abogan en favor de una posible *pinocitosis discontinua "por cargas acumulativas"*, que se registra tanto al medir el ^3H -DNA total incorporado (experimento de incorporación directa que se describe) como cuando se consideran los resultados obtenidos en la valoración de las posibilidades que, en diferentes momentos, presenta la superficie de este protózoos para recibir ^3H -DNA durante un pulso de 1 minuto. La figura 32 compara el ritmo de esta capacidad superficial con los resultados del total de ^3H -DNA incorporado en sucesivos estadios del proceso pinocitótico.

Aunque la experimentación no fuese diseñada con la intención de demostrar el fenómeno acumulativo que ahora se discute (de ahí la no coincidencia en los tiempos de incubación y preincubación) podemos establecer, a nivel cualitativo, una correspondencia entre los datos obtenidos

por *captura directa* y los relativos a la capacidad receptiva obtenidos mediante la preincubación con DNA de timo y pulsos de 1 minuto con $^3\text{H-DNA}$.

En un primer momento (tiempo < 2 minutos), Fig. 32, la incorporación a Euglena aumenta muy rápidamente, al tiempo que la disponibilidad de "huecos" en la superficie desciende también de manera pronunciada. Es pues claro, que la incorporación del $^3\text{H-DNA}$, en este estadio temprano del proceso, tiene lugar en la envoltura del huésped, donde inicialmente, queda retenido.

El subsiguiente *proceso de liberación rápida* del $^3\text{H-DNA}$ incorporado (interpretado más arriba en base al modelo de perturbación del potencial electrostático celular), se corresponde con el aumento de la *capacidad receptiva* durante el mismo periodo (3-10 minutos). Ello indica que el $^3\text{H-DNA}$ incorporado se libera hacia el medio ya que la radiactividad asociada a las células desciende.

A continuación, la cantidad de $^3\text{H-DNA}$ retenida por Euglena aumenta sustanciosamente, al tiempo que la capacidad receptiva lo hace de modo suave. Este intervalo de tiempo (10-45 minutos) es lo suficientemente dilatado para poder aceptar una *incorporación endocitótica* del $^3\text{H-DNA}$ aún retenido en la superficie de Euglena. Hemos de aceptar asimismo, que el aumento suave de la capacidad receptiva, puede deberse a la *terminación no sincrónica* de este proceso de ingestión; dada la posible amplitud en la distribución estadística de los estados fisiológicos de los individuos del cultivo, no es de extrañar que se haga menos intenso el aumento en la capacidad receptiva puesto que la superficie irá quedando apta para albergar nuevo $^3\text{H-DNA}$ en diferentes instantes para cada grupo de células.

Se alcanza así un tiempo aproximado de 50 minutos. A partir de él y hasta los 110-120 minutos, se observa una *estabilización de la cantidad* de $^3\text{H-DNA}$ retenido por las células y simultáneamente, la superficie atraviesa un mínimo en su disponibilidad de sitios receptores. Parece propio interpretar esta ausencia de incorporación, con la *reparación de las estructuras externas responsables de la endocitosis* que han sido gastadas tras la interiorización de la primera carga de $^3\text{H-DNA}$; (de nuevo, los diferentes estados fisiológicos individuales, suavizan los efectos que se describen a nivel de membrana). Al mismo tiempo, el leve descenso en la radiactividad retenida, indica la puesta en juego

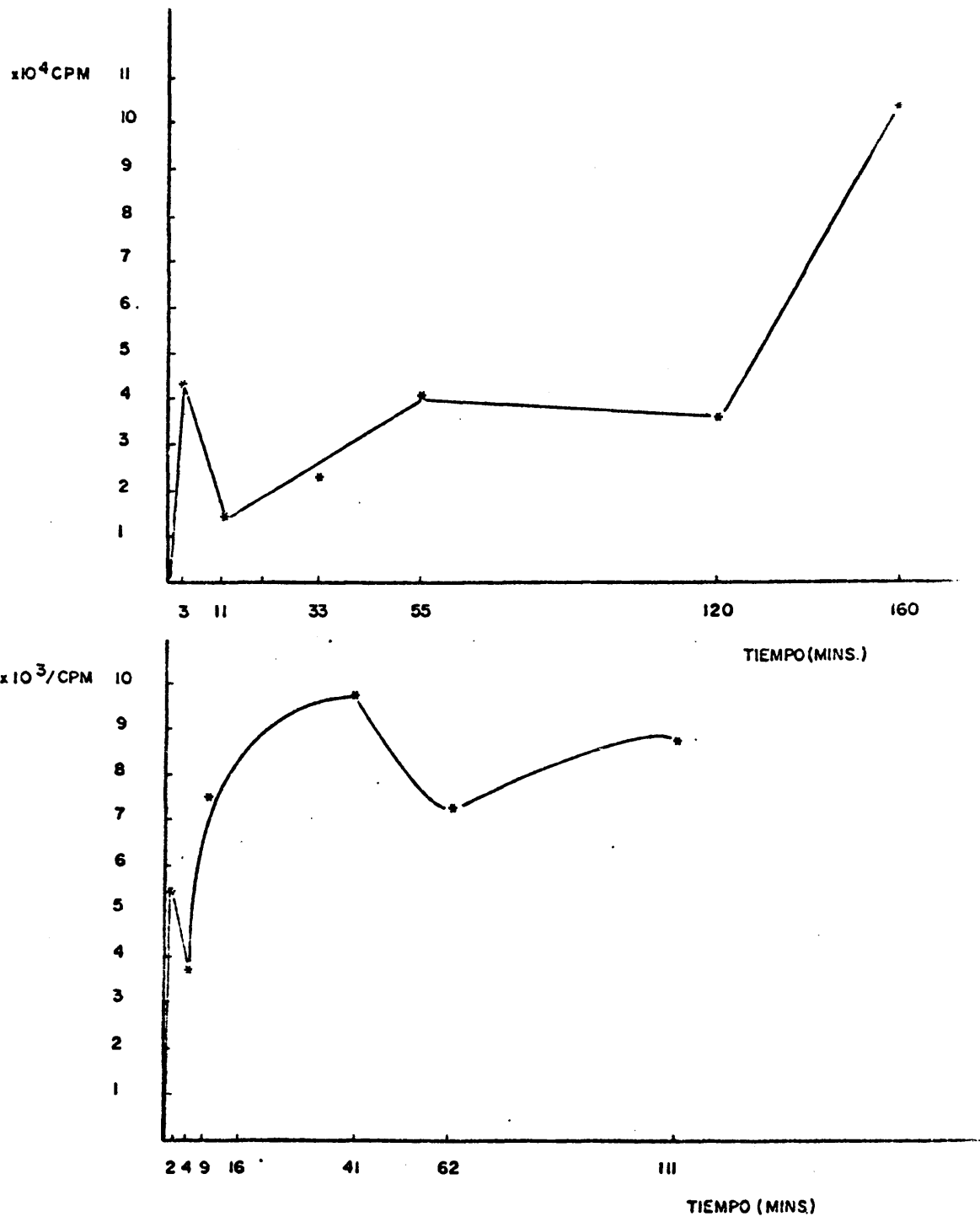


FIGURA 32.- Pinocitosis de 3 H-DNA por células de Euglena. Comparación de las cinéticas de incorporación directa del medio -no nutriente- (arriba) y la de asociación con la envoltura (abajo). (Diferentes tiempos de preincubación con DNA en el mismo medio).

de los fenómenos de *exocitosis*, con la lógica aparición en el medio de una cierta cantidad de productos derivados del "turn-over" que sufre el DNA ingerido. (Este punto será discutido en III.b.1.7).

Como resultado de todo este proceso, *las células quedan cargadas con una cierta cantidad de ^3H -DNA exógeno y dispuestas para iniciar una segunda toma de material exocelular*, proceso que se inicia a los 110-120 minutos y que se desarrolla con más lentitud (diversidad fisiológica) que en la primera ocasión; (el periodo desde los 120 a los 160 minutos, volvería a corresponder al segundo proceso pinocitótico y explicaría la alta incorporación registrada en el tiempo último estudiado). La existencia de un segundo ciclo pinocitótico, es aceptable si tenemos en cuenta que el medio de incubación es "no nutriente"

III.b.1.4. CINÉTICA DE LA ASOCIACIÓN ^3H -DNA - EUGLENA EN MEDIO DE CULTIVO COMPLETO A pH 7 (PULSOS DE 1 MINUTO)

El crecimiento de *Euglena gracilis*, cepa Z, se desarrolla a un pH 3,5. Por esta razón, cuando debamos añadir DNA al medio de incubación siendo éste el de cultivo, hemos de someter a las células a un pH mayor que evite la precipitación del biopolímero. Esta precipitación tiene lugar a pH 3,5, cooperando en el fenómeno las proteínas básicas del medio (Bacto-triptona) que puedan asociarse con el DNA al referido pH.

La figura 33 muestra los resultados obtenidos.

El curso de la asociación del ^3H -DNA con *Euglena* coincide conceptualmente con los descritos en otras condiciones experimentales (III.b.1.3). Parece, no obstante, que *a tiempos más largos (120-140 minutos) vuelve a haber un importante descenso en la disponibilidad de huecos en la superficie celular*, lo que supondría un dato en favor del incremento del ^3H -DNA incorporado que se observa a estos tiempos en los medios no nutrientes. Dicho aumento de la capacidad receptiva indicaría el *final de los procesos de reparación* de las estructuras empleadas para la endocitosis precedente. La uniformidad observada en los valores experimentales concuerda con la homogeneidad de estados fisiológicos individuales que debe poseer *Euglena* en un medio nutriente.

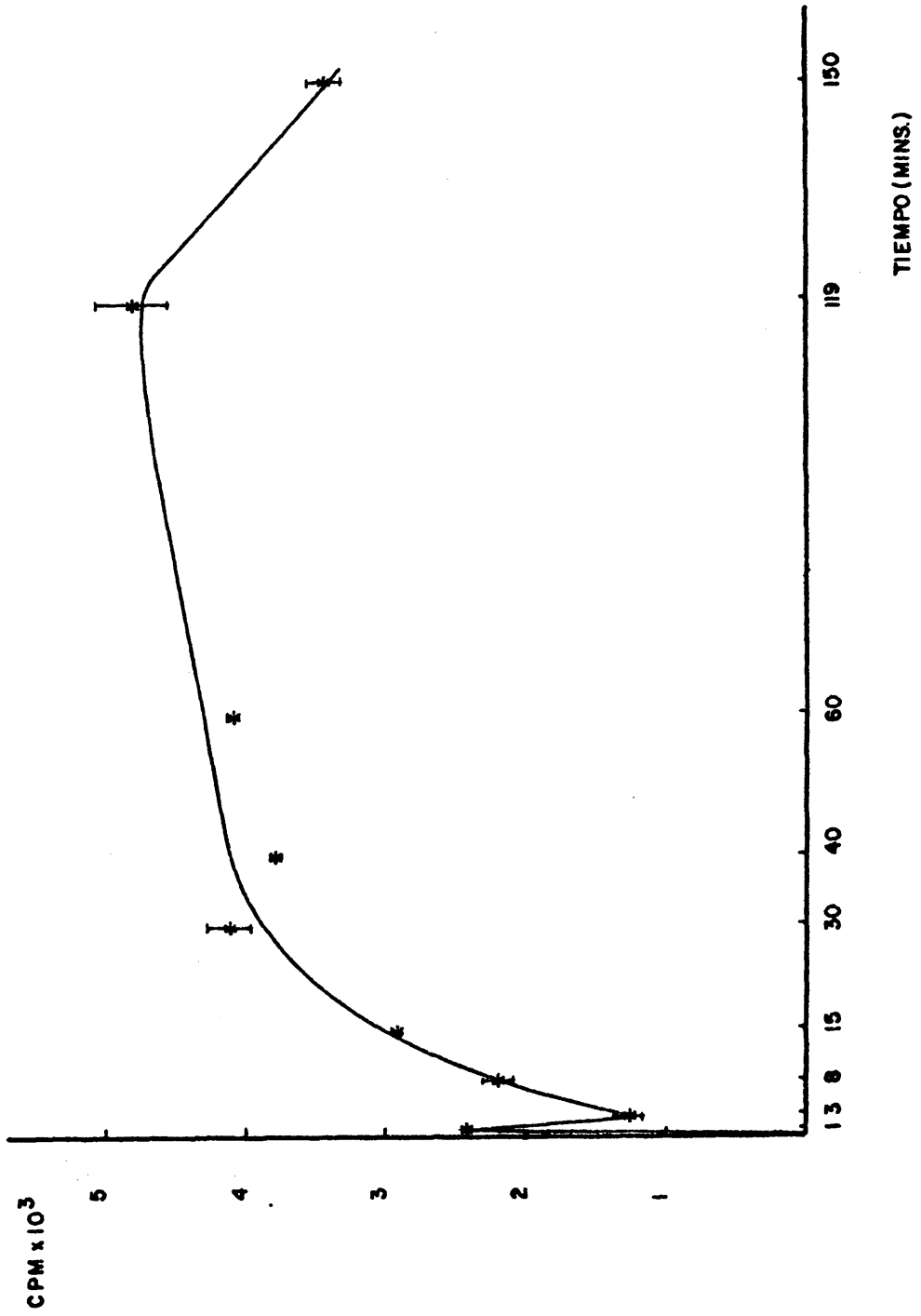


FIGURA 33.- Asociación del ³H-DNA con la envoltura de Euglena. Diferentes tiempos de preincubación con DNA de timo de ternera en medio de cultivo a pH 7.

III.b.1.5. INFLUENCIA DEL PESO MOLECULAR DEL ^3H -DNA EN SU INCORPORACION POR EUGLENA. MEDIOS NO NUTRIENTES

Las Figuras 34 y 35 muestran los resultados. Claramente, se advierte el aumento, en unidades másicas, de la incorporación, cuando el peso molecular promedio en peso se hace mayor.

En contraposición con lo observado en Tetrahymena, en presencia de ión sodio a tiempos más bajos (unión DNA-superficie), se mantiene el orden de las respectivas capturas aún en unidades molares: se prefieren las moléculas de mayor tamaño aunque no existe una correlación directa entre los PM y el número de moléculas capturadas. Los resultados para estos tiempos se resumen en la tabla adjunta.

PM _p	πg/cel	Nº molec/cel
10^7	4,44	$26,7 \times 10^4$
$3,5 \times 10^6$	1,08	$18,6 \times 10^4$
$2,0 \times 10^6$	0,19	$5,7 \times 10^4$

Captura de DNA de diferentes tamaños. Tiempos mínimos en NaCl 35 mM.

Así pues, la comparación con Tetrahymena, permite suponer que la recepción del ^3H -DNA en Euglena está basada en la existencia de puntos funcionales más accesibles que en aquel ciliado y que el tamaño de las moléculas del ^3H -DNA ejerce, en Euglena, un efecto estimulador de la captura. De este modo, parece que el modelo electrostático puro, (sin intervención de unidades moleculares con especificidad para el DNA) es el operativo en el citado protozoo flagelado.

Por otro lado, se advierte que los cambios temporales en la cantidad de ^3H -DNA incorporado, se hacen más ostensibles -demostrando acciones más potentes- conforme el PM aumenta, hecho probado también en Tetrahymena cuando el ión sodio estaba presente en el medio de incubación.

En presencia de ión potasio (Fig. 35) las relaciones másicas capturadas también guardan el mismo orden que sus respectivos PM. Pero la cinética es tan diferente que no puede ser juzgada con arreglo a los mismos criterios que el fenómeno "captura rápida-cesión gradual" manifestado en incubaciones con sodio.

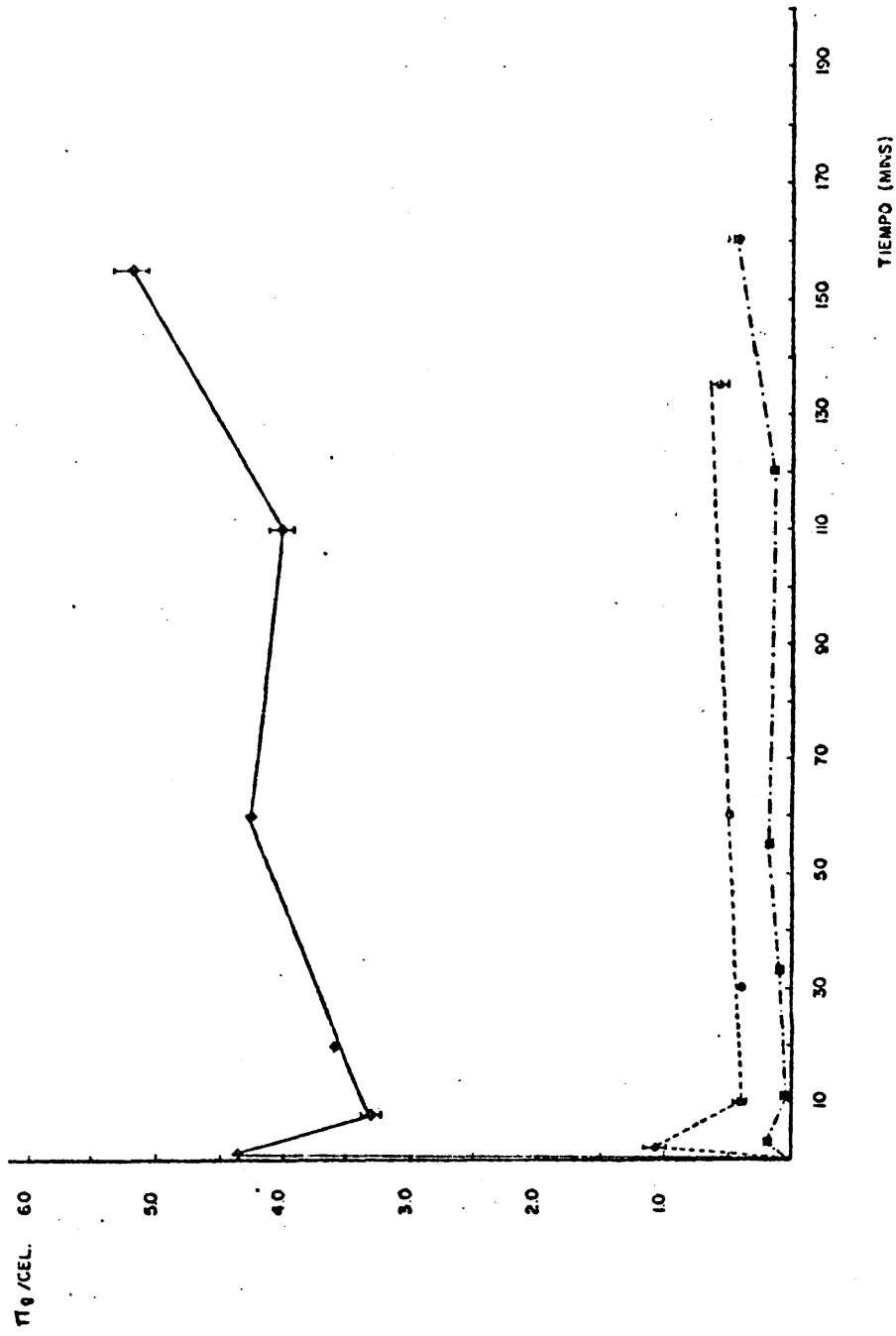


FIGURA 34.- Influencia del \overline{PM}_p del $^3\text{H-DNA}$ en su incorporación directa del medio -no nutriente- NaCl 35 mM, por células de *Euglena gracilis*.
 —◆— $\overline{PM}_p = 10^7$ daltons. - - -○- - - $\overline{PM}_p = 3,5 \times 10^6$ daltons.
 - - -■- - - $\overline{PM}_p = 2 \times 10^6$ daltons.

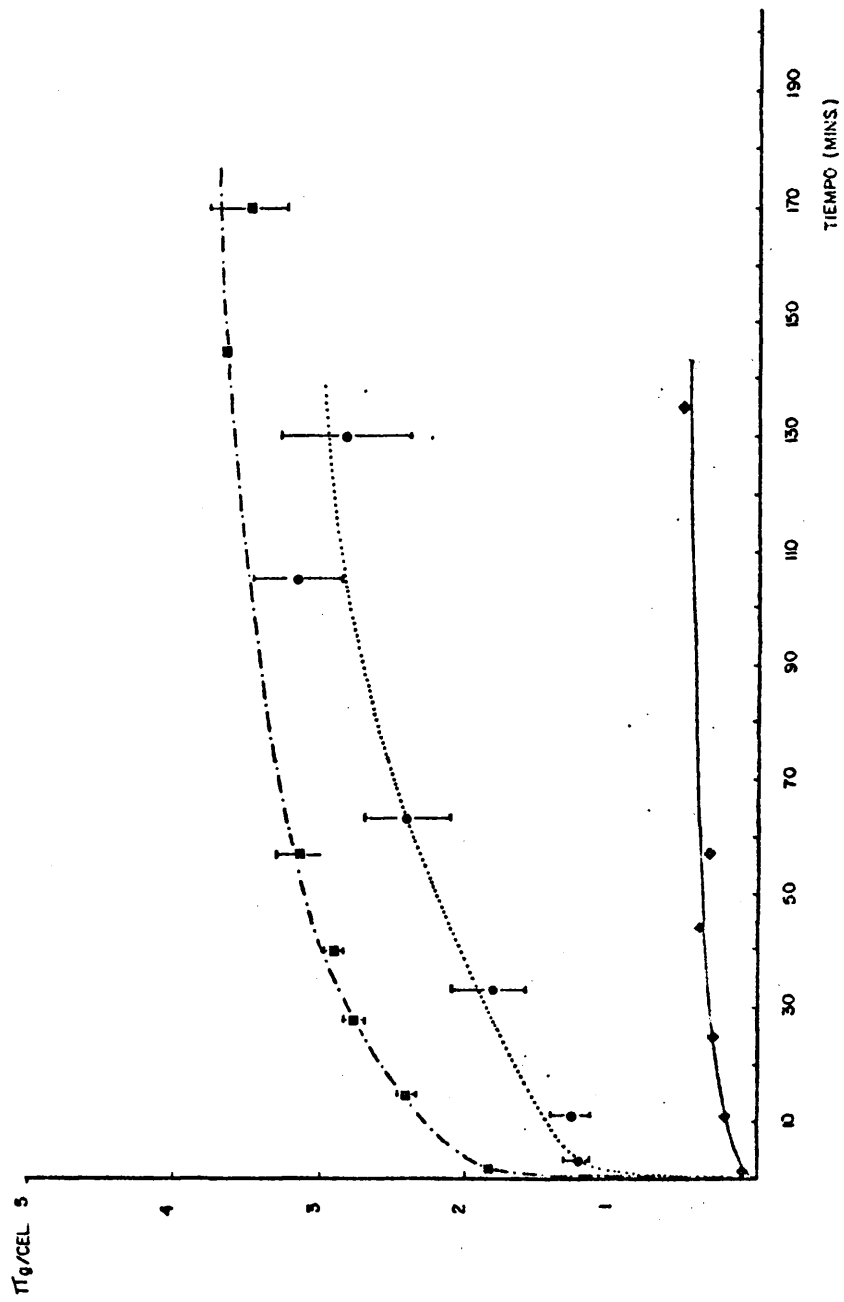


FIGURA 35.- Influencia del \overline{PM}_P del 3H -DNA en su incorporación directa de medio -no nutritivo- KCl 35 mM, por células de *Euglena gracilis*.

- - - - $\overline{PM}_P = 10^7$ daltons.
- $\overline{PM}_P = 2 \times 10^6$ daltons.
- $\overline{PM}_P = 10^6$ daltons.

En cualquier caso parece que existe un *tamaño óptimo* por debajo del cual la *atracción electrostática inicial sería muy débil* y por encima de él, la *especial conformación del receptor superficial*, adquirida por la presencia de potasio, reduciría las posibilidades de unión de las moléculas mayores. Otra alternativa para explicar este tamaño límite (reducción de la captura por el aumento del grado de polimerización del DNA) se basa en la posibilidad de que una molécula larga, *ocupara varios centros receptores* impidiendo así nuevas entradas.

Los resultados que se comentan, se reúnen en la siguiente tabla.

\overline{PM}_D	$\mu\text{g/cel}$	Nº molec/cel
10^7	1,90	$11,44 \times 10^4$
2×10^6	1,20	$36,14 \times 10^4$ *
10^6	0,15	$9,03 \times 10^4$

Captura de DNA de diferentes tamaños.
Tiempos mínimos en KCl 35 mM.

III.b.1.6. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN MEDIOS NO NUTRIENTES (NaCl, 0,035 M)

Se han elegido (Fig. 36) los tiempos experimentales correspondientes a la *iniciación de la primera carga endocitótica* (intervalo desde los 8-10' minutos hasta los 60-70 minutos). La cinética corresponde, pues, a dicho período del proceso descrito en III.b.1.3.

Se observa un *descenso en la incorporación a temperaturas bajas*. Este hecho indica la *mayor participación del fenómeno endocitótico en Euglena* frente al proceso exocitótico que, principalmente, tenía lugar en *Tetrahymena*, y cuya modificación por la temperatura era, asimismo, inversa. Sabido es, (Chapman-Andresen, 1962; Brandt y Pappas, 1962; Marshall y Nachmias, 1968) que las etapas subsiguientes a la fijación superficial de moléculas, promotoras de la endocitosis, son considerablemente inhibidas por un descenso en la temperatura.

En *Tetrahymena* se detectó el *aumento del fenómeno exocitótico al aumentar la temperatura* y este fenómeno se relacionaba con una mayor degradación del ^3H -DNA asociado, así como con la inhibición de la fase

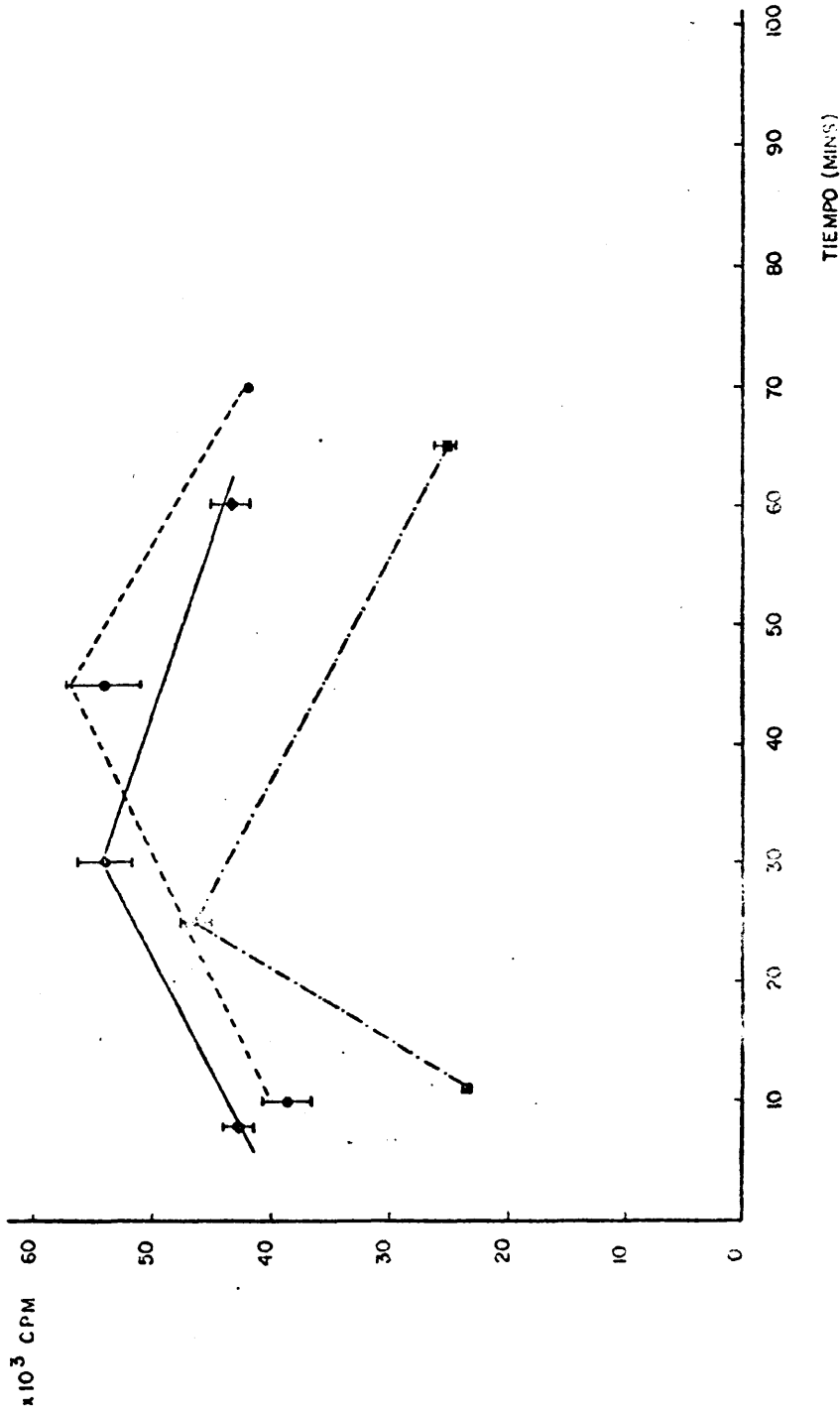


FIGURA 36.- Influencia de la temperatura de incubación en la captura directa del medio -no nutriente- de ³H-DNA por células de *Euglena gracilis*. Medio NaCl 35 mM.

- 0-4°C.
- 18°C.
- 29°C.

de asociación con la envoltura externa del ciliado (III.a.2.3). Por el contrario, *Euglena* muestra una *reducción en la endocitosis de DNA cuando la temperatura disminuye* indicando una menor eficacia en los gastos energéticos que hacen posible el desarrollo de la ingestión cítica.

Queda fuera de nuestro estudio la influencia de la temperatura en la interacción primaria habida entre *Euglena* y DNA a tiempos cortos.

III.b.1.7. ESTADO MOLECULAR DEL ^3H -DNA INCORPORADO Y RESTANTE EN EL MEDIO DE INCUBACION

Se realizaron cromatografías en las siguientes condiciones experimentales (*Medios no nutrientes*).

- 1) ^3H -DNA asociado en 1' de incubación tras 1' de preincubación con DNA de timo.
- 2) ^3H -DNA presente en el medio después de 10' de incubación.
- 3) Lavados con ácido iodoacético.
- 4) Estado molecular del ^3H -DNA incorporado en tiempos cortos (15 minutos) y en tiempos muy largos (24 horas). Diferentes grados de polimerización del ^3H -DNA de partida.
- 5) Influencia de la temperatura en la degradación del ^3H -DNA ingerido.
- 6) Estudio de la acción degradadora del medio -no nutriente- en el que han sido resuspendidas, un cierto tiempo, las células de *Euglena* (Proceso de cesión de proteínas al medio).

La peculiar estructura de la superficie de *Euglena*, hace difícil su lisis por los métodos convencionales de rotura de células animales. La naturaleza glicoproteica de su película hace indispensable el uso de enzimas proteolíticas para facilitar la acción del detergente no iónico "Nonidet P40", que realiza eficazmente los fenómenos de solvatación hidrofóbica conducentes a la lisis celular, a la temperatura ambiente y en una concentración del 2% (V/V) en NaCl 35 mM (*medio hipotónico*). A continuación la adición de lauril sulfato sódico al 0,2% en etanol 25% y EDTA-0,1 M en ClNa 35 mM, completa la lisis de orgánulos que, co

mo los núcleos, hayan podido escapar de ella a pesar de la hipotonicidad del medio.

El método seguido (modificado por nosotros del de Parenti et al., 1969), está condicionado por la *necesidad de conservar la integridad del ^3H -DNA asociado a Euglena*, puesto que en ciertas ocasiones se persigue el estudio del estado de-polimerización de aquel.

Por esta circunstancia, se descartan los ultrasonidos, útiles cuando se persiguen otros objetivos (aislamiento de enzimas de Euglena, de gránulos de paramilo, etc.). Asimismo, el método de Potter queda relegado para otros fines, puesto que no es ni lo suficientemente eficaz, ni resulta práctico dado el elevado número de incubaciones independientes que se realizan en nuestros estudios.

Cuando en la digestión proteolítica se utiliza *pronasa*, debe *autodigerirse* conforme se describe en el Material y Métodos de esta Tesis.

1º) ^3H -DNA asociado en 1 minuto de incubación y 1 minuto de preincubación con DNA de tимо (NaCl 35 mM)

Los resultados se ofrecen en la tabla siguiente, y se han representado en la figura 37.

FRACCION	CONTROL	CONTROL SIN CELULAS	LISADO (1'-1')
NR + II	0,3	0	0
III	0,3	0,2	0,4
IV	44,8*	40,7	34,6*
V + VI	34,9	33,8	35,6
VII	13,1	16,0	21,7*
VIII	6,6	9,3	7,6
	100,0	100,0	99,9

Se realizaron dos controles, (conforme se describen en la sección de Material y Métodos) omitiendo en uno de ellos la presencia de células. La similitud entre ambos es acusada, si bien parece que la presencia de Euglena durante el tratamiento de lisado (realizado sobre el ^3H -DNA) conduce a una degradación algo mayor. Accidentalmente, las fracciones V y VI se obtuvieron reunidas en una sola elución.

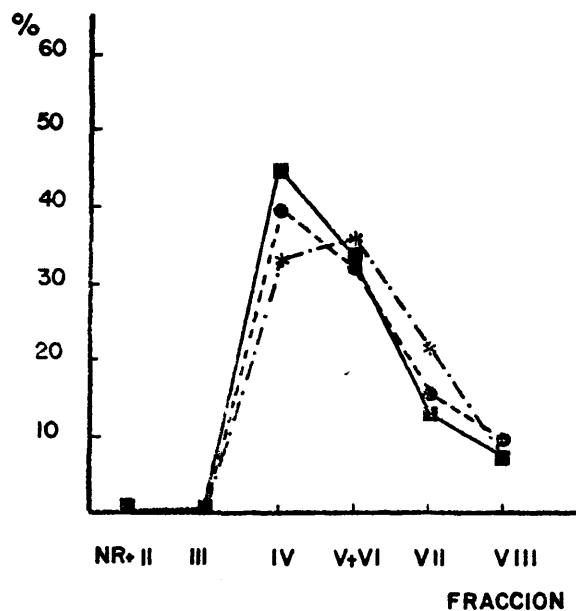


FIGURA 37.- Dispersión de tamaños moleculares del ^3H -DNA retenido por Euglena en 1 minuto de pulso tras 1 minuto de pre incubación con DNA de timo de ternera. Medio NaCl 35 mM.
 ----*---- ^3H -DNA asociado a Euglena.
 —■— Control (con células).
 ----●---- Control (sin células).

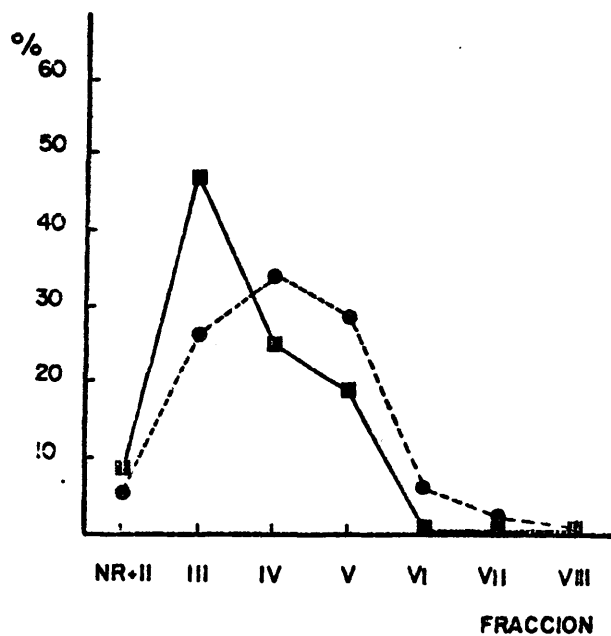


FIGURA 38.- Dispersión de tamaños moleculares del ^3H -DNA remanente en el medio después de 10 minutos de incubación con Euglena. Medio NaCl 35 mM.
 —■— ^3H -DNA en el medio.
 ----●---- ^3H -DNA control.

En la figura 37 se observa una *mayor polimerización del ^3H -DNA asociado por Euglena en tiempos muy cortos*, comparado con el tamaño que presenta el ^3H -DNA de control. Ello se interpreta como una *mayor ventaja por parte de las moléculas grandes* para competir por los receptores. El esquema concuerda con el modelo electrostático descrito en III.b.1.3; la *captura selectiva* obedece a la mayor carga neta de las partículas de ^3H -DNA de mayor grado de polimerización.

Otro hecho que se evidencia simultáneamente al referido, es la *ausencia de degradación* en tiempos tan cortos como 1 minuto de contacto. La liberación del ^3H -DNA unido, seguiría pues los cauces que se propusieron en III.b.1.3.

2°) ^3H -DNA presente en el medio de incubación

A 10 minutos de incubación, los resultados obtenidos fueron:

FRACCION	1 ^{er} LAVADO NaCl Y MEDIO INCUB.	CONTROL ^3H -DNA
NR + II	8,5	6,4
III	46,7 *	26,7
IV	25,3	33,0
V	18,7	28,0
VI	0,6	5,6
VII	0,1	1,2
VIII	0,2	0,1
	100,1	100,0

Se comprueba que *en el medio predominan las fracciones menos polimerizadas*. La desaparición de las fracciones polimerizadas es prácticamente total y ambos hechos encajan en el esquema de *captura selectiva* antes mencionado.

La figura 38 resume los resultados que se comentan.

En este punto de nuestra discusión, hemos de considerar la posibilidad de que en Euglena gracilis, cepa Z, se produzca un fenómeno de *cesión al medio de proteínas específicas*, análogo al encontrado por nosotros en Tetrahymena pyriformis, cepa W. En este protozoo (Díaz de Espa

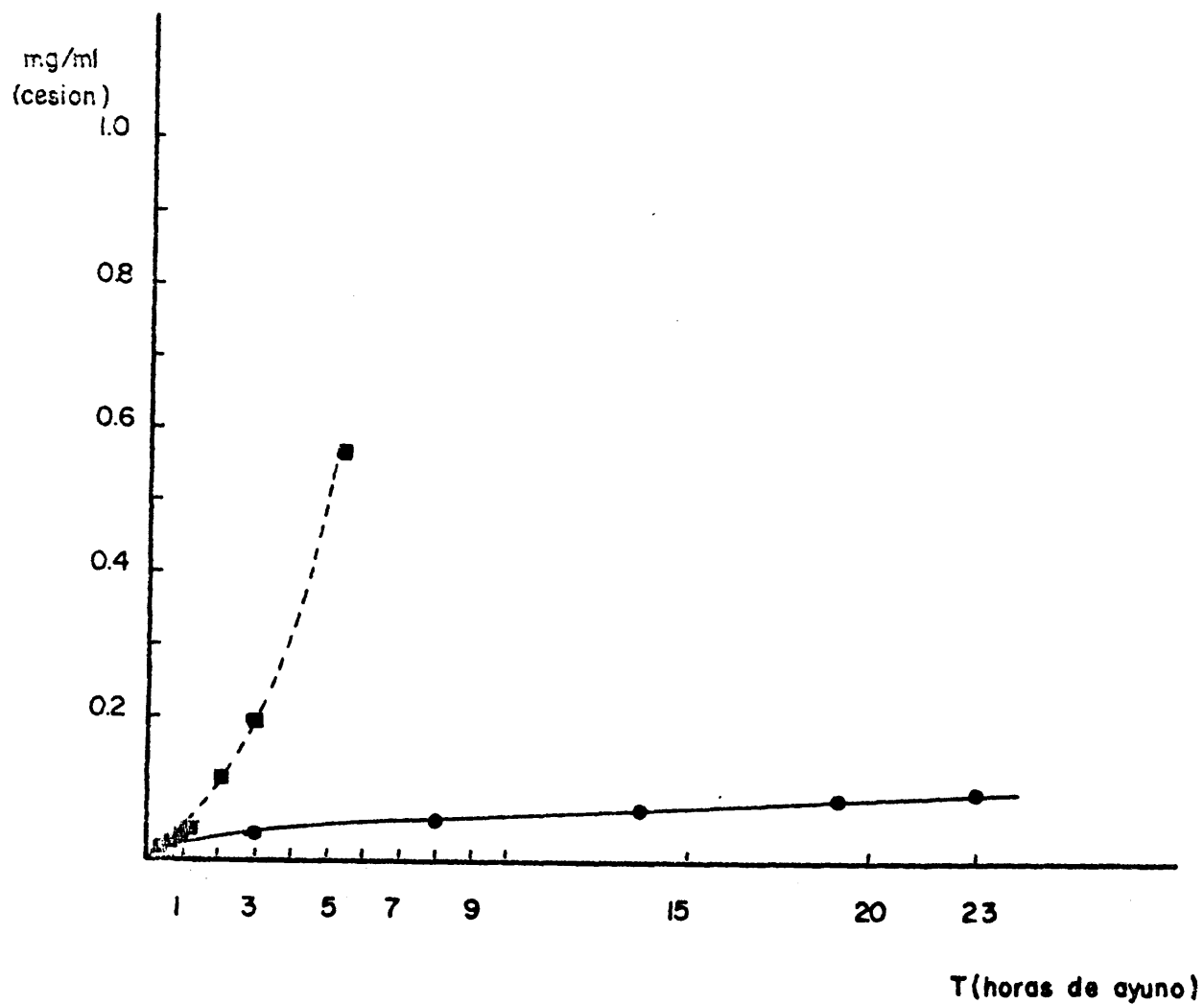


FIGURA 39.- Cesión de proteínas al medio -no nutriente- de suspensión. (NaCl 35 mM).

- Tetrahymena pyriformis.
- Euglena gracilis.

da, 1972 página 67) se puso de manifiesto la presencia de una DNAasa exocelular cedida al medio, no nutriente, en el que permanecían las células. Para verificar su existencia en cultivos de *Euglena gracilis*, cepa Z, se valoraron por el método de Lowry las proteínas totales cedidas al medio no nutriente, (NaCl 35 mM) a diferentes tiempos de resuspensión.

La figura 39 muestra la comparación entre *Tetrahymena pyriformis* y *Euglena gracilis*, evidenciando la ausencia de este fenómeno en *Euglena*.

La presencia de actividad DNA-ásica en el medio no nutriente de permanencia de *Euglena* se investigó como sigue:

a) Centrifugación suave del cultivo del sobrenadante (en NaCl 35 mM, 3 horas) y filtración por Millipore (0,8µ).

b) Incubación del filtrado desprovisto de células, durante 60 minutos con ³H-DNA de tamaño molecular controlado.

FRACCION	NaCl 35 mM SIN CELULAS	CONTROL ³ H-DNA
NR + II	0,1	0,5
III	7,0	5,5
IV	27,3 (± 3)	33,0 (± 3)
V	33,0	34,0
VI	28,0 (± 2)	24,0 (± 2)
VII	4,0	2,8
VIII	0,7	0,3
	100,1	100,1

Los resultados fueron negativos en cuanto a una degradación del ³H-DNA por el fluido exocelular. El control se realizó incubando ³H-DNA en NaCl 35 mM durante 60 minutos.

La figura 40 muestra gráficamente los resultados:

3°) ³H-DNA arrastrado por lavados con ácido iodoacético (IAC) 0,08 M, pH 7

A 10 minutos de incubación, los resultados obtenidos fueron (Fig. 41):

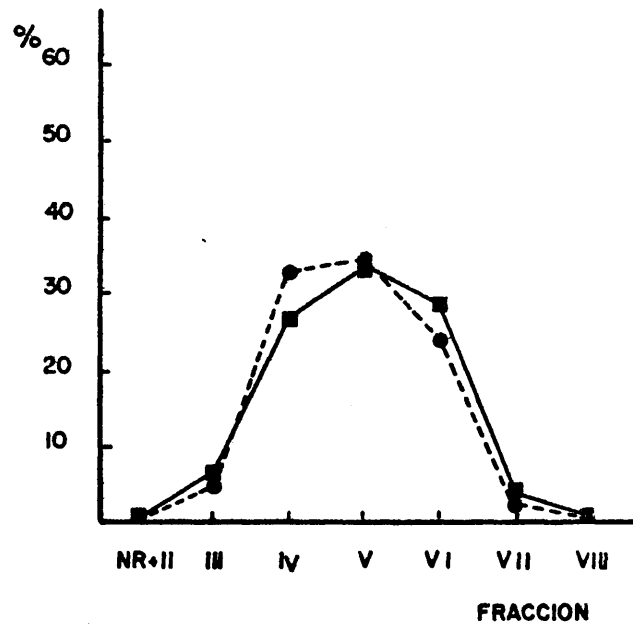


FIGURA 40.- Dispersión de tamaños moleculares del $^3\text{H-DNA}$ expuesto 60 minutos al medio no nutriente desprovisto de células de *Euglena*. Ausencia de efecto degradativo.

---●--- $^3\text{H-DNA control}$.

—■— NaCl 35 mM, sin células.

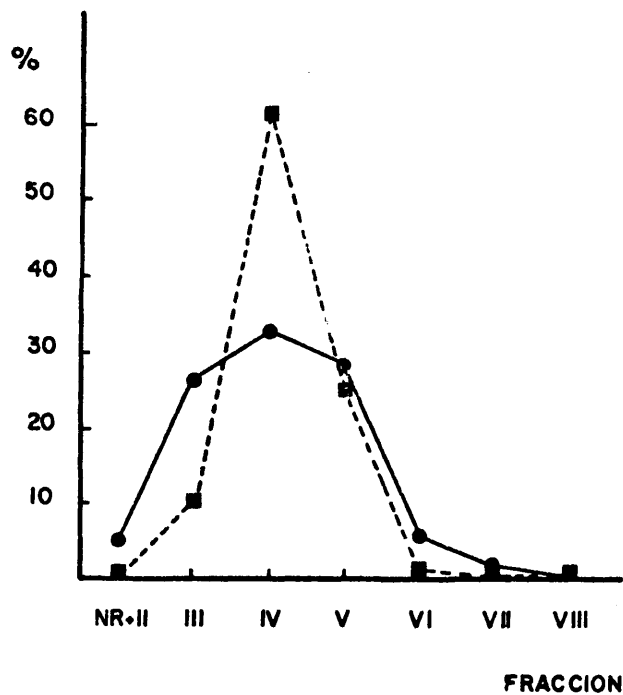


FIGURA 41.- Dispersión de tamaños moleculares del ³H-DNA arrastrado por el lavado con 2 x 5 ml de ácido iodoacético 0,08 M pH 7, a los 10 minutos de incubación con Euglena. Medio no nutriente.

--■-- Lavado con IAc.
 ●— ³H-DNA control.

FRACCION	LAVADO IAC	CONTROL ³ H-DNA
NR + II	0,8	5,4
III	11,4	26,7
IV	61,4*	33,0
V	25,0	28,0
VI	1,0	5,6
VII	0,1	1,2
VIII	0,2	0,1

El lavado con IAC se efectuó después de dar tres lavados sucesivos con NaCl 35 mM, el último de los cuales presentó una radiactividad del 0,1% respecto del primero.

La fracción principalmente arrastrada por el ácido iodoacético a pH 7 es la fracción IV (arrastré adicional sobre el ³H-DNA lavado por el NaCl). Hay un sensible desplazamiento hacia fracciones más polimerizadas respecto al \overline{PM} en peso que se observa en el lavado con NaCl 35 mM. Ello concuerda plenamente con el dato encontrado en *Tetrahymena pyriformis* y con los precedentes bibliográficos ya citados (Meizel y Kay, 1965) que establecen un arrastre de las fracciones más polimerizadas adheridas a la superficie celular.

4°) ³H-DNA incorporado en tiempos cortos y largos

A un tiempo de 15 minutos, los resultados obtenidos para el ³H-DNA incorporado y remanente en el medio extracelular fueron:

FRACCION	LISADO 15'	MEDIO NaCl 35 mM	CONTROL ³ H-DNA
NR + II	5,6	0,0	0,5
III	4,6	18,0*	5,5
IV	24,0*	30,0	33,0*
V	44,1	29,1	34,0
VI	18,6	19,9	24,0
VII	2,9	2,4	2,8
VIII	0,3	0,5	0,3
	100,1	100,0	100,1

La figura 42 nos da su expresión gráfica.

De nuevo puede verse un *aumento* (en la fracción máxima) del \overline{PM} en *pe*so del $^3\text{H-DNA}$ asociado respecto al que queda en el medio. Sin embargo, a 15 minutos ya se observa la aparición de una cierta fracción NR + II, hecho no detectado en tiempos más cortos y obviamente debido a las *exonucleasas endocelulares*. La fracción V (máxima en el lisado) puede *generarse* por endonucleolisis de fracciones mayores.

Es significativo el hecho de que la fracción IV asociada a Euglena, esté disminuida en relación a la presente en el control. Al mismo tiempo, en el medio permanecen aumentadas las fracciones menos polimerizadas. Todo ello nos lleva a *proponer un esquema de captura selectiva* de las fracciones de mayor tamaño, que a continuación sufren una *degradación endógena lenta* (más lenta, al menos, que la encontrada en Tetrahymena pyriformis). Su aparición más tardía, junto con los síntomas de la actividad exonucleolítica paralela, sugiere un *mecanismo degradativo no ectoenzimático* que sería llevado a cabo, no obstante, por las nucleasas endocelulares. El fenómeno sería pues distinto al que propusimos en Tetrahymena ya descrito en el apartado III.a.2.2 de esta discusión.

A *tiempos de incubación muy largos* (24 horas) y en medios no nutrientes (NaCl, KCl, LiCl y NH_4Cl , todos ellos 35 mM) se comprobó que la *degradación aparente del $^3\text{H-DNA}$ no era muy acusada*. Los resultados se expresan en las siguientes tablas comparativas y en las figuras 43 y 44.

FRACCION	Li Cl	Na Cl	K Cl	NH_4Cl	CONTROL $^3\text{H-DNA}$
NR + II	1,7	1,2	1,0	0,2	0,5
III	4,5	5,4	4,3	3,6	6,0
IV	66,0*	57,0*	70,0*	64,0*	66,0*
V	23,0	31,0	18,0	26,0	24,0
VI	4,0	4,5	5,5	5,0	2,8
VII	0,8	0,6	0,7	0,6	0,4
VIII	0,1	0,5	0,2	0,2	0,2

Las cromatografías de los lisados de Euglena *reproducen exactamente el espectro de dispersión* de tamaños moleculares del $^3\text{H-DNA}$ control. Es un $^3\text{H-DNA}$ muy degradado (por autorradiolisis durante su almacenamiento),

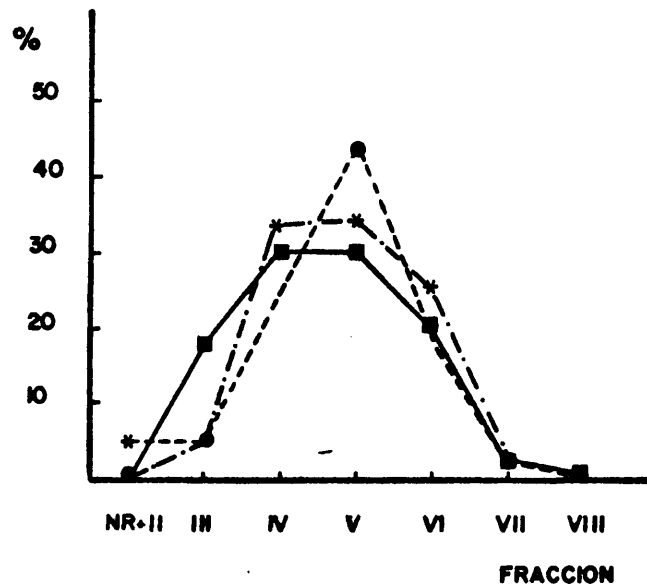


FIGURA 42.- Dispersión de tamaños moleculares del ^3H -DNA asociado a Euglena en 15 minutos de incubación (---●---), del ^3H -DNA remanente en el medio y arrastrado por el lavado con NaCl 35 mM al mismo tiempo (—■—). Control ^3H -DNA: ---*--- . Medio no nutritivo.

cuyo PM promedio en peso es aproximadamente 2×10^6 daltons.

Sin embargo, para un ^3H -DNA de mayor tamaño inicial, (10^7 daltons) se obtuvieron, a las 24 horas de incubación en presencia de sodio y potasio, los siguientes resultados: (Figura 44).

FRACCION	Na Cl	K Cl	^3H -DNA CONTROL
NR + II	0,2	0,1	0,0
III	5,8	7,6	3,2
IV	35,6*	35,9*	13,3
V	28,6	29,6	20,4
VI	20,2	18,4	44,4*
VII	7,4	6,2	15,3
VIII	2,3	2,2	3,4

Aparentemente, la degradación en Euglena no progresa, en 24 horas, de la fracción IV. Una alternativa -ciertamente especulativa- para explicar este dato, sería aceptar que el DNA exógeno incorporado en estos medios no nutrientes, *se integrara en el DNA del huésped*, ofreciendo un espectro con máximo en la fracción IV cuando se cromatografía. Pero hemos de aceptar, no obstante, que el DNA exógeno haya sido *degradado previamente y sus fragmentos* -incluso los nucleótidos procedentes de la exonucleolisis ya referida- *utilizados en la resíntesis del DNA propio del cultivo*, que en ese tiempo experimentó un aumento de la población individual de $3/4$ aproximadamente (de 5×10^6 cells/ml pasó a $8,5 \times 10^6$ cells/ml a las 24 horas de ayuno en la oscuridad). La ausencia de fracciones NR+II a estos tiempos, en contraposición a lo encontrado a tiempos más cortos (15 minutos), indicaría su utilización e incorporación a las fracciones mayoritarias del DNA huésped, aceptando para éstas un $\overline{\text{PM}}$ en peso pequeño (IV, V y VI) con máxima participación de la fracción IV.

La posibilidad de aceptar una escasa efectividad de las DNA asas endocelulares de Euglena, de modo que el ^3H -DNA exógeno escapara a su acción, permaneciendo intacto dicho tiempo de 24 horas en el citoplasma celular, no parece una alternativa muy firme.

Sin embargo, una *situación de compromiso* entre ambas posibilidades, traería consigo que aunque fragmentos degradados del ^3H -DNA exógeno resistieran las 24 horas en estado polimerizado (algo menor de fracción IV),

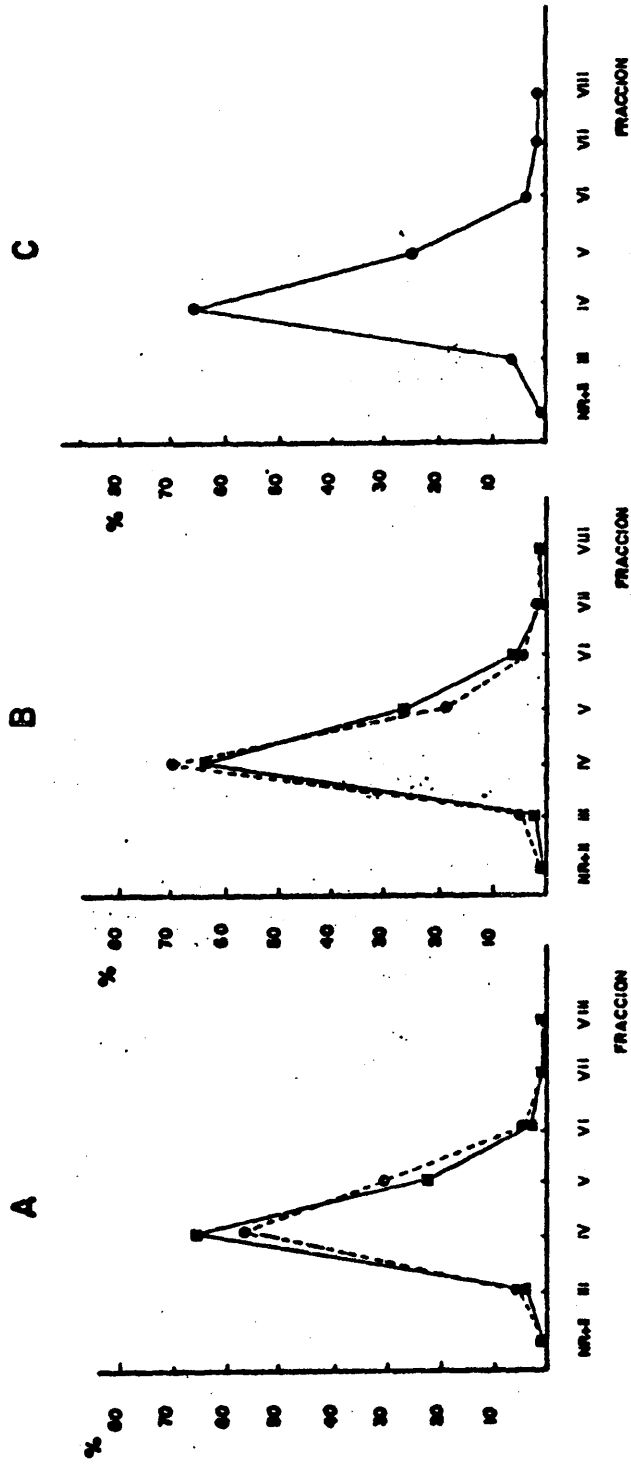


FIGURA 43.- Dispersión de tamaños moleculares del ³H-DNA retenido por Euglena a las 24 horas de incubación en medios no nutrientes.

- A \bullet LICI 35 mM. $\text{---}\bullet\text{---}$ KCl 35 mM.
- $\text{---}\bullet\text{---}$ NaCl 35 mM. \blacksquare NH₄ Cl 35 mM.
- \bullet Control ³H-DNA (poco polimerizado).

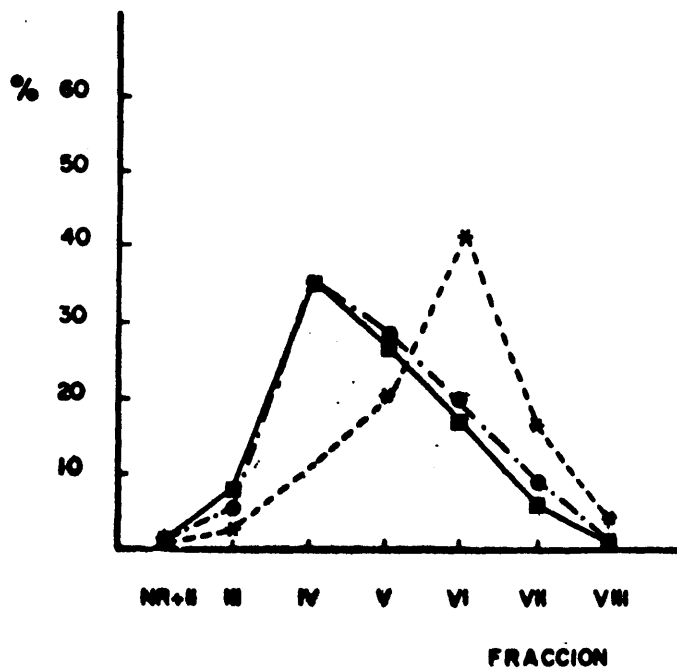


FIGURA 44.- Dispersión de tamaños moleculares del ³H-DNA retenido por Euglena a las 24 horas de incubación en medios no nutrientes.

- KCl 35 mM.
- NaCl 35 mM.
- *--- Control ³H-DNA (alto \overline{PM}_p).

los nucleótidos liberados simultáneamente e incorporados al DNA huésped (de tamaño molecular más alto que el supuesto en la primera posibilidad) *enmascarasen la degradación endonucleolítica al estar integrada su radiactividad en las fracciones más polimerizadas*, del DNA del huésped.

5°) Influencia de la temperatura en la degradación del ^3H -DNA incorporado

Se llevó a cabo un experimento análogo al realizado en *Tetrahymena pyriformis*, cromatografiándose por duplicado las incubaciones realizadas a 0-4°C y a 29°C, durante 65 y 60 minutos respectivamente.

Los resultados expresados en la figura 45 fueron los siguientes:

FRACCION	29°C	0 - 4°C	^3H -DNA CONTROL
NR + II	1,3*	0,0*	0,0
III	7,0	2,9	0,0
IV	48,4 (\pm 5)*	63,1 (\pm 6)*	23,0
V	33,6	27,1	24,9
VI	9,1	6,2	30,0*
VII	0,7	0,8	16,9
VIII	0,0	0,0	5,2
TOTAL	100,1	100,1	100,0

A un tiempo de 60-70 minutos, el ^3H -DNA ingerido ya ha sufrido una *degradación notable*, con máximo en fracción IV, hecho que contrasta con los datos obtenidos de incubaciones más cortas, indicativos de una cierta selectividad de captura. *La temperatura parece aumentar la exonucleolisis* al tiempo que disminuye la degradación a fracción IV. La fiabilidad de los datos cromatográficos (10% de error en cada fracción) no nos permite establecer este hecho definitivamente. Por el contrario, podemos afirmar que *la degradación a fracción IV progresa conforme aumenta el tiempo de incubación* (en el intervalo investigado desde los 15 minutos a los 60-70 minutos).

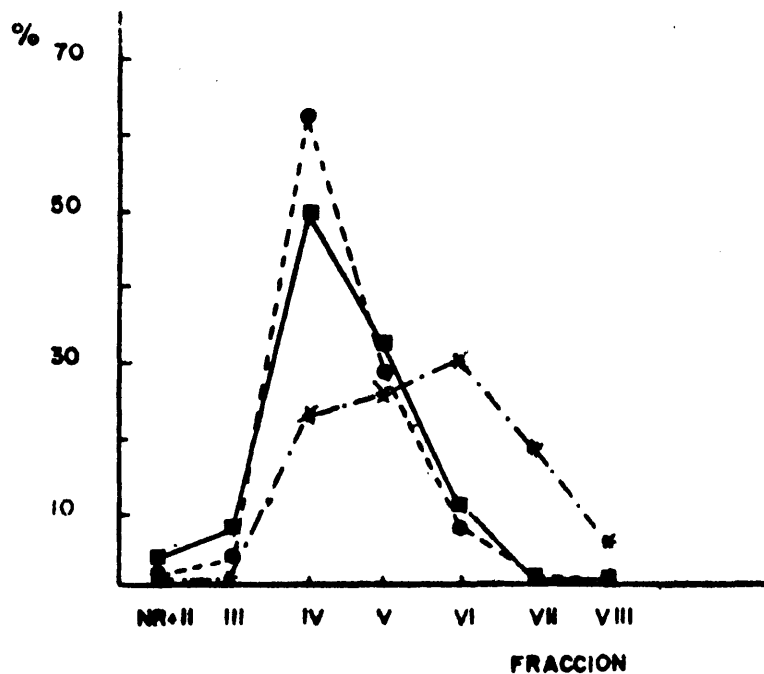


FIGURA 45.- Influencia de la temperatura de incubación en la degradación del ³H-DNA asociado a Euglena durante un tiempo "medio". Medio no nutricional.

- 29°C, 60 minutos.
- 0-4°C, 65 minutos.
- * ³H-DNA control.

III.b.2. CINÉTICA DE ASOCIACION ^3H -DNA - EUGLENA. PULSOS DE 1 MINUTO DE DURACION

Ya ha quedado descrita, en el apartado III.b.1.3, la cinética de asociación que sigue el DNA expuesto a un cultivo de Euglena preincubado con DNA de timo de ternera durante periodos de tiempo diferentes. En dicho experimento llegamos a concluir la existencia de una pinocitosis "por cargas acumulativas" del DNA presente en el medio, no nutriente, de incubación.

Estos mismos experimentos se realizaron preincubando diferentes tiempos, cultivos ayunantes de Euglena gracilis en presencia de RNA de levadura y poliglutámico.

III.b.2.1. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE PREINCUBACION CON RNA DE LEVADURA, EN LA CAPTURA DE ^3H -DNA

En la figura 46 se han representado los valores obtenidos para las diferentes capacidades receptoras que presentan, para el ^3H -DNA de pulso, células de Euglena preincubadas diferentes tiempos con RNA de levadura.

Desde los primeros instantes, la concentración externa de RNA (24,4 $\mu\text{g/ml}$), satura la superficie de Euglena, de modo que en el minuto de pulso, el ^3H -DNA capaz de incorporarse es el mismo sea cual sea el tiempo de preincubación; el nivel de incorporación es, en todos los casos, muy bajo.

El fenómeno corresponde con los hechos encontrados en Tetrahymena, indicando que el número de moles de RNA presente en el medio es suficiente para mantener bloqueados los puntos receptores de ^3H -DNA. No se observa liberación del RNA adherido en el periodo de tiempo investigado.

III.b.2.2. INFLUENCIA DEL TIEMPO DE PREINCUBACION CON PG EN LA CAPTURA DE ^3H -DNA

Según se observa en la figura 47, todo parece indicar que la ocupación de la superficie de Euglena por el PG es más lenta que con cualquier otro polímero aniónico ensayado. A un tiempo de 3-5 minutos de preincubación, el ^3H -DNA puede incorporarse en mayor proporción, si bien

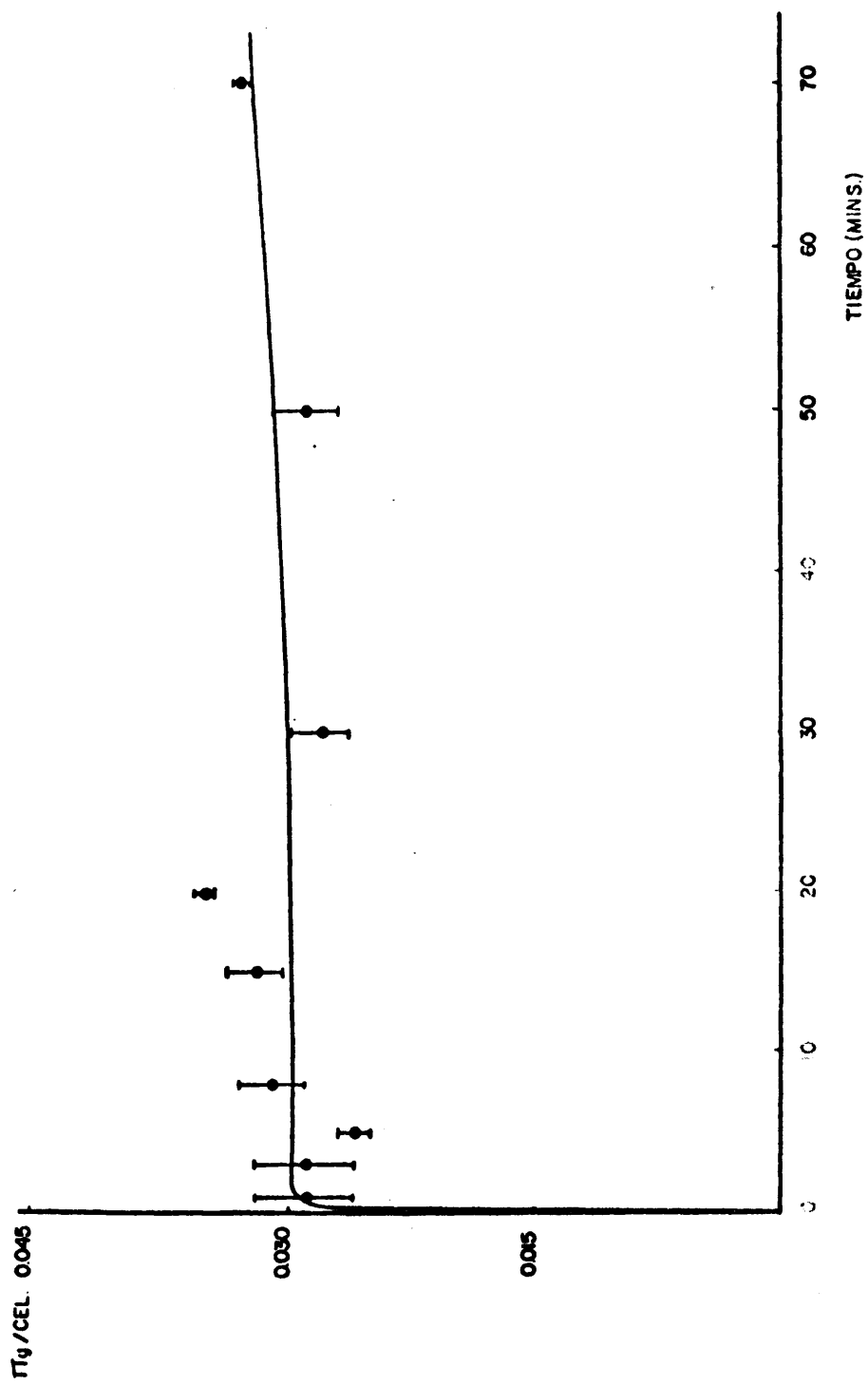


FIGURA 46.- Asociación del ³H-DNA con la superficie de Euglena. Diferentes tiempos de pre-incubación con RNA de levadura. Medio no nutriente.

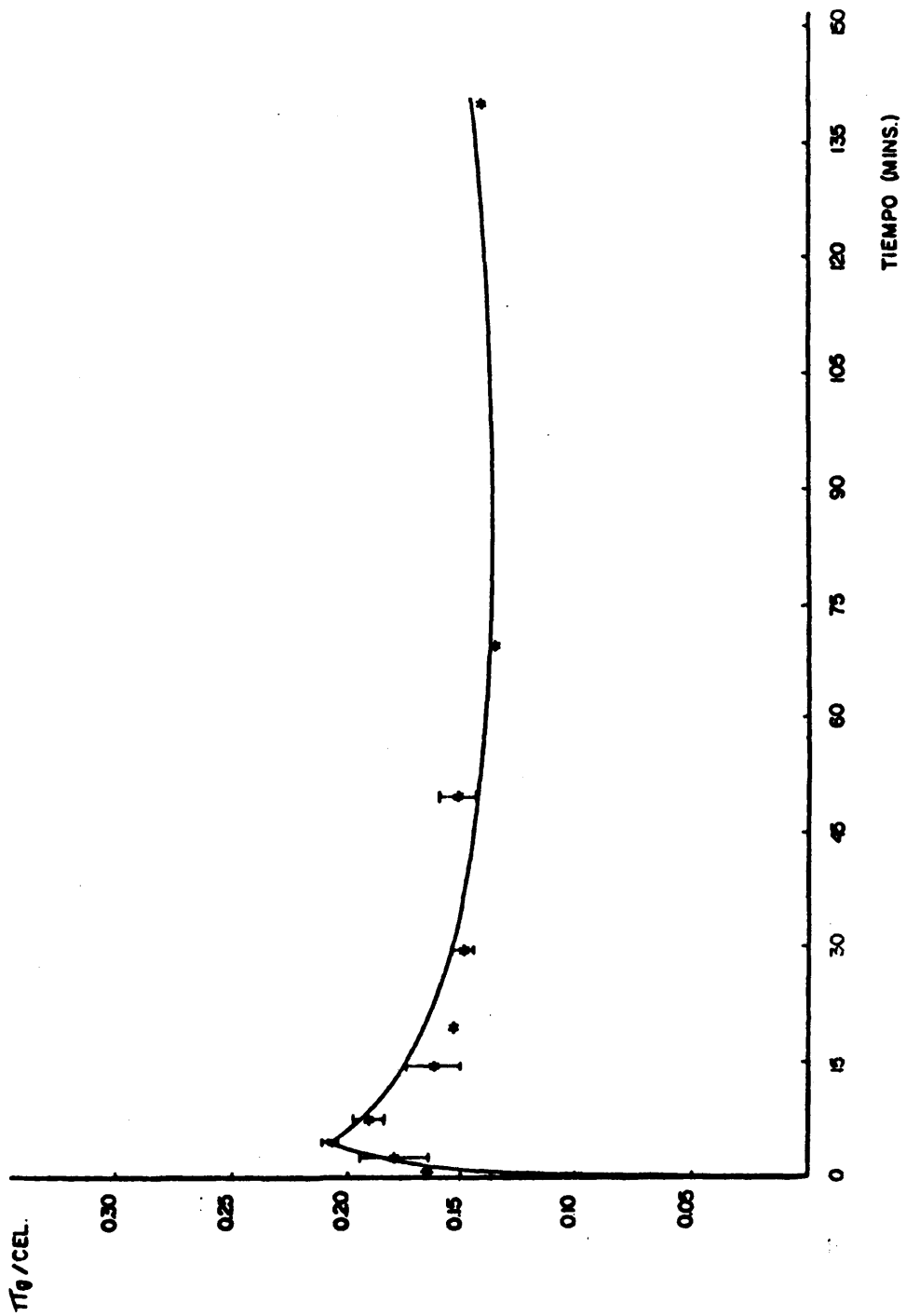


FIGURA 47.- Asociación del ^3H -DNA con la superficie de Euglena. Diferentes tiempos de preincubación con Poliglutámico (PG), PM = 48000 daltons, 308 residuos. Medio no nutriente.

no es muy significativa la diferencia cuantitativa con respecto a otros tiempos.

No hay liberación del poliglutámico asociado. Por el contrario, a tiempos mayores de 8 minutos, el nivel permitido de captura es constante y su diferencia con el nivel máximo alcanzado muy pequeña. La cantidad de ^3H -DNA incorporado, en $\mu\text{g}/\text{célula}$, es significativamente mayor que la que hacen posible el RNA y el DNA de preincubación. Todo ello, conduce a suponer una *escasa interacción entre el poliglutámico y Euglena*. El ^3H -DNA de pulso, interaccionaría favorablemente con la superficie, desplazando al PG retenido.

III.b.2.3. SATURACION SECUENCIAL CON DNA, RNA Y PG

La figura 48 muestra como *en el intervalo de concentraciones* en que se ha experimentado, *no hay variación apreciable* de la incorporación de ^3H -DNA, conforme se aumenta la concentración de preincubación de cualquiera de los biopolímeros. Estas concentraciones parecen pues *suficientes* para que se alcance la *saturación de los puntos superficiales* que reciben al DNA de pulso.

Sin embargo, *los valores de w que se alcanzan con el PG son considerablemente mayores que los logrados con DNA y RNA* (en este orden). Ello supone que el ^3H -DNA de pulso, desplaza con mayor ventaja el PG de los sitios receptores (y logra ocupar más huecos), después a un biopolímero homólogo (DNA de timo) y finalmente, el desplazamiento que es capaz de hacer a moléculas de RNA, es el menos favorable para su incorporación. Estos datos constituyen una confirmación de los encontrados cuando se estudió la cinética de asociación *entre dichos polianiones y Euglena*. Al mismo tiempo, *coinciden conceptualmente con los datos encontrados en Tetrahymena*.

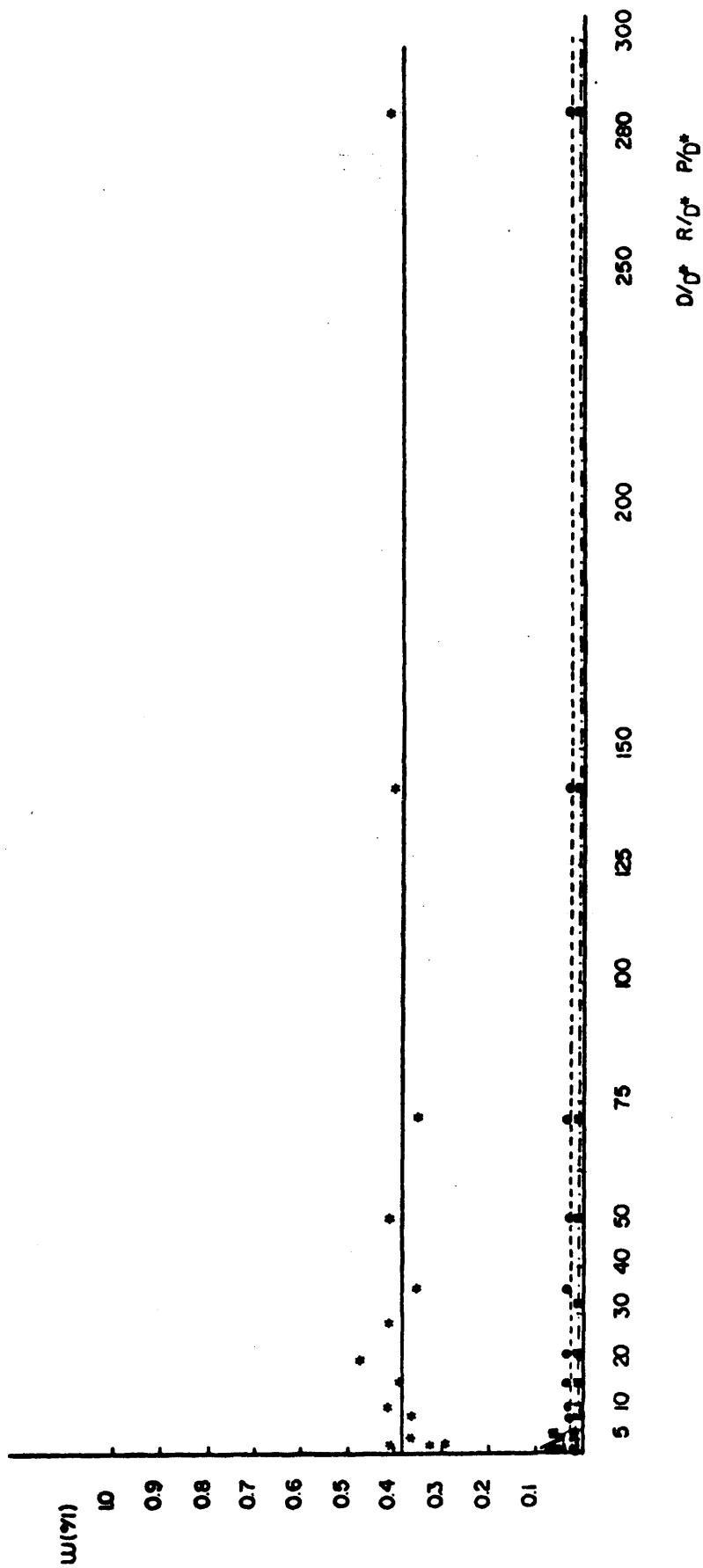


FIGURA 48.- Saturación de la envoltura de Euglena con diferentes polianiones en medio no nutriente. Fracción másica de ^3H -DNA adquirida durante un pulso de 1 minuto, en función de la concentración del polímero de preincubación.

- Preincubación 15 minutos con PG (P/D*).
- Preincubación 5 minutos con RNA (R/D*).
- Preincubación 3 minutos en DNA (D/D*).

IV. CONCLUSIONES

Se han investigado diferentes variables que influyen en la incorporación directa del medio de ^3H -DNA exógeno a células de protozoos. Asimismo, la fase de interacción primaria biopolímero \longleftrightarrow célula ha sido caracterizada en atención a factores químicos y físicos capaces de alterarla.

Los datos experimentales han sido procesados con arreglo a un tratamiento estadístico. Las conclusiones cuantitativas hay que valorarlas, por tanto, con el grado de fiabilidad que permiten los errores experimentales obtenidos, reseñados todos ellos en el apéndice de esta Tesis.

I)

A) La cuantía de la captura se incrementa de modo lineal conforme aumenta la concentración de ^3H -DNA presente en el medio, en el intervalo desde 0,24 $\mu\text{g/ml}$ hasta 25 $\mu\text{g/ml}$.

B) El medio de incubación, modifica la cinética de captura de ^3H -DNA, manifestándose de este modo alteraciones fisiológicas relacionadas con la regulación iónica del protozoo; estos fenómenos son capaces de modificar el estado electrostático de las células y por tanto su capacidad de incorporar ^3H -DNA.

C) Los datos cinéticos de incorporación en presencia de ión sodio evidencian un fenómeno de captura rápida-cesión gradual distinto del encontrado en otros medios.

D) La captura de ^3H -DNA es mayor, en unidades másicas y en unidades molares, conforme se incrementa el peso molecular promedio en peso del ^3H -DNA de ensayo. Este incremento es diferente, en su orden de magnitud,

al considerar los $\mu\text{g}/\text{célula}$ incorporados o el n° de moléculas/célula.

E) La *asociación del $^3\text{H-DNA}$ con histonas* totales de timo de ternera, no afecta a la cinética de incorporación.

F) En *un medio definido*, la cinética de incorporación es similar a la descrita para los procesos en presencia de ión sodio. Los niveles capturados se modifican favorablemente por *efectores metabólicos* (ATP, GTP), que aportan la energía necesaria para los procesos relacionados con la endocitosis (formación de canales, reparación de las estructuras empleadas, etc.).

G) El *ATP es más eficaz* como promotor de la endocitosis (y como reparador de las estructuras) que el GTP.

H) El aumento de *temperatura* disminuye la incorporación de $^3\text{H-DNA}$ a Tetrahymena. El fenómeno está relacionado con una *inhibición de la fase de interacción primaria* DNA-célula, con una *mayor degradación* del $^3\text{H-DNA}$ asociado a Tetrahymena y con los fenómenos de *regulación iónica* que también se alteran por esta variable.

K) En *un minuto* de tiempo de interacción el $^3\text{H-DNA}$ sólo alcanza la superficie celular (*autorradiografía*).

L) La *superficie celular* sigue un proceso de *ocupación-liberación* con un mínimo en la receptividad para el nuevo $^3\text{H-DNA}$ de pulso a 3-4 minutos y una estabilización a partir de los 10 minutos (nivel máximo).

M) La saturación de los receptores (de DNA) *con RNA es más lenta* que con DNA; asimismo ocurre con el *proceso de de-saturación* consiguiente. (El mínimo en la receptividad del pulso, se encuentra a 13-15 minutos).

N) El polímero aniónico *poliglutámico* (PG) no presenta el doble fenómeno de ocupación-liberación encontrado con RNA y DNA. La saturación de la superficie es *gradual y acumulativa*, relacionándose este comportamiento con la *inducción -no sincrónica-* de procesos de pinocitosis que, *pro*gresivamente, inutilizan los receptores superficiales de polianiones.

O) La inhibición de la receptividad para el $^3\text{H-DNA}$ de pulso en la superficie celular es más sensible al aumento de la *concentración de pre-*

incubación (en unidades másicas), de RNA y DNA (en este orden) que de PG. Este hecho se relaciona con la *estequiometría de la interacción polímero-receptor*.

P) El RNA es un inhibidor levemente más fuerte que el DNA y ambos lo son considerablemente más potentes que el PG, demostrando aquellos una mayor *afinidad por el receptor* que este último.

Q) El ^3H -DNA que interacciona con *Tetrahymena* *tiempos tan cortos como 1-2 minutos* aparece degradado tanto en el medio de incubación como el que permanece asociado a las células (*endonucleolisis ectoenzimática*). La degradación es *endonucleolítica* principalmente aunque hay síntomas evidentes de *exonucleolisis* a tiempos más largos. Ambas actividades *progresan* conforme aumenta el tiempo de interacción ^3H -DNA-células.

R) La preincubación con DNA y PG no afecta a la degradación *endonucleolítica*; sin embargo, *la preincubación con RNA la estimula*.

S) La *liberación* hacia el medio del DNA unido a la superficie de *Tetrahymena*, se relaciona con la *degradación* producida sobre aquel por una *DNA-asa ectoenzimática*. Esta actividad *se estimula por la presencia de RNA* en la superficie celular; al mismo tiempo *el incremento de la degradación* es el factor responsable de la *mayor inhibición aparente* que *presenta el RNA frente al DNA*. El término "aparente" significa que el ^3H -DNA de pulso aparece asociado en menor cantidad (cuando la preincubación se realizó con RNA) porque *su liberación es mayor al ser más intensa su degradación*.

II) T) Se ha puesto de manifiesto un fenómeno de competencia por los puntos receptores entre DNA y RNA, de forma que el RNA es desplazado con más eficacia por el ^3H -DNA de pulso de mayor tamaño molecular. Este hecho se relaciona con la mayor carga electrostática por molécula.

Por otro lado, utilizando *medios no nutrientes* para el estudio de la interacción DNA-células de *Euglena*, se ha llegado a las siguientes conclusiones:

U) *La cuantía de la incorporación* aumenta de modo lineal al *incrementarse* la concentración de ^3H -DNA en el medio de incubación. El intervalo de concentraciones ensayado va desde 5 $\mu\text{g/ml}$ hasta 25 $\mu\text{g/ml}$.

V) La *concentración exterior de ión sodio* influye en los niveles de ^3H -DNA capturados. El *mínimo* presentado a concentraciones 18-30 mM de NaCl se interpreta como una consecuencia de los *efectos contrapuestos* producidos por la sal tanto en la *accesibilidad* (conformación del receptor) como en la carga electrostática de las células como consecuencia de la *interiorización de iones Na^+* .

X) El *medio no nutriente de incubación* afecta a la cinética de incorporación de ^3H -DNA.

En presencia de K^+ existe un fenómeno de *pinocitosis acumulativa* que tiende a la *saturación*.

En presencia de Na^+ , existe un proceso de *pinocitosis discontinua* "por cargas" determinado por los *diferentes estados de ocupación-liberación que sigue la superficie* de Euglena.

Y) El $\overline{\text{PM}}_p$ del ^3H -DNA presenta un *valor óptimo* para su incorporación en presencia de ión K^+ . El hecho se relaciona con la dualidad de efectos antagónicos derivados de la *menor afinidad* de las moléculas pequeñas (menor carga electrostática) frente a la *menor accesibilidad* a los receptores de las moléculas grandes (*diferente conformación en este medio*), junto con una variación en la *estequiometría* de la asociación DNA-célula (*ocupación de varios receptores por moléculas grandes*).

En presencia de ión Na^+ , se prefieren las moléculas de mayor tamaño, siendo por tanto, de importancia principal en este medio, *el efecto de la carga electrostática*.

Z) El *descenso de la temperatura disminuye la capacidad endocitótica* de Euglena.

A') El RNA de preincubación, satura en tiempos muy cortos, la *superficie* de Euglena. En contraposición a lo observado con el DNA de preincubación en NaCl 35 mM, no se advierten variaciones con el tiempo en el estado de ocupación de la superficie por el RNA, y el nivel de incorporación del ^3H -DNA de pulso es muy bajo.

B') La *ocupación de la superficie por el PG* de preincubación es más lenta que con RNA y DNA. Tampoco se observa el fenómeno de liberación descrito para el DNA. El PG adherido a la envoltura de Euglena es *fácilmente desplazado* por el ^3H -DNA de pulso.

C') La *afinidad* por la superficie de Euglena de los polianiones ensayados es, *por orden decreciente*: RNA \geq DNA \gg PG.

D') El ^3H -DNA asociado a Euglena en tiempos cortos, presenta una *dis*tribución estadística de tamaños moleculares mayor que el ^3H -DNA de *par*tida, postulándose una *captura selectiva de las moléculas de mayor tama*ño. Al mismo tiempo el ^3H -DNA del medio aparece más degradado.

E') La degradación del ^3H -DNA del medio *no se debe a una endonuclea*sa *exocelular* como se detectó en Tetrahymena.

F') El ácido Iodoacético 0,08 M provoca un arrastre adicional -sobre el lavado con NaCl- de las fracciones de mayor $\overline{\text{PM}}_p$ asociadas a Euglena.

G') La *degradación endonucleolítica* es en Euglena de *carácter endoce*lular y transcurre, por tanto, con mayor lentitud que la detectada en Tetrahymena, de naturaleza ectoenzimática.

H') La *exonucleolisis* también está presente en Euglena, manifestándose en tiempos medios (1-2 horas). Esta actividad *se incrementa con la temperatura*.

I') A *tiempos de incubación muy largos*, la degradación del ^3H -DNA *in*corporado no progresa más allá de las fracciones IV y V, en dependencia del tamaño del ^3H -DNA de partida, *desapareciendo las fracciones NR+II (exonucleolisis)*.

J') Este comportamiento se interpreta como una consecuencia de la participación en el espectro global del DNA asociado a Euglena, de fragmentos degradados con el DNA propio del huésped, marcado radiactivamente por la utilización en su *resíntesis* de los nucleótidos liberados en la exonucleolisis.

K') Todos los datos llevan a proponer para Euglena un *esquema de cap*tura *selectiva* de las moléculas de mayor tamaño; *los fenómenos de aso*ciación-liberación presentados por el DNA *no están relacionados en Eu*glena con una actividad ectoenzimática endonucleolítica, sino con efectos derivados de la *carga electrostática* de dichas moléculas *modificado*ras de algunos procesos implicados en la regulación iónica de este flagelado.

V. BIBLIOGRAFIA

1. ANDRUS W.D. y A.C. GIESE; *J. Cellular Comp. Physiol.* 61, 17 (1963).
2. BENACERRAF, B., B.N. HOLPERN, C. STIFFEL, S. GRUCHAND y G. BIOZZI; *Ann. Inst. Pasteur*, 89, 601 (1955).
3. BENEDETTI, E.L. y P. EMMELOT; "The Membranes: Ultrastructure in Biological Systems". A.J. Dalton (Ed.), Vol. IV, Academic Press, N.Y. (1968).
4. BRANDT, P.W. y A.R. FREEMAN; *J. Colloid and Interface Science*, 25, 47-56 (1967).
5. BRANDT, P.W. y A.R. FREEMAN; *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 8, 675 (1960).
6. BRANDT, P.W. y G.D. PAPPAS; *J. Cell Biol.* 15, 55 (1962).
7. BRANDTS, J.F.; "Thermobiology". A.H. Rose (Ed.), Academic Press, London (1967).
8. BRANTON, D. y D.W. DEAMER; "Protoplasma"ogia". M. Alfert, H. Baner, W. Sandritter y P. Sitte (Eds.), pág. 1-70, Springer-Verlag, Vienna y Nueva York (1972).
9. BLUM, J.J.; *J. Cell Biol.* 24, 223 (1965).
10. BLUM, J.J.; *J. Gen. Physiol.* 49, 1125 (1966).
11. CATO, A. y W.R. GUILD; *J. Mol. Biol.* 37, 157 (1968).
12. COHN, Z.A.; "Cell Recognition". R.T. Smith (Ed.), pág. 39-45 Appleton-Century-Crofts. New York (1969).
13. COHN, Z.A.; "Cell Membranes: Biological and Pathological Aspects". 129 (1971).
14. COOPER, B.A.; *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg*, 36, 21 (1968).
15. COX, D., FRANK, O., HUTNER, S.H. y H. BAKER; *J. Protozool.*, 15, (4), 713-716 (1968).

16. CRAMER, H.; "Métodos matemáticos de Estadística". Aguilar S.A. de Ediciones, 3^a ed. pág. 642, Madrid (1963).
17. CHAPMAN-ANDRESEN, C.; *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg*, 33, 73, (1962).
18. CHAPMAN-ANDRESEN, C. y H. HOLTER; *Esp. Cell. Res. Suppl.* 3, 52 (1955).
19. CHAPMAN-ANDRESEN, C.; *Progr. Protozool. Int. Congress Ser.* N° 91, 256 (1965).
20. CHAPMAN-ANDRESEN, C. y D. LAGUNOFF; *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg*, 35, 419 (1966).
21. CHEN, K.C. y A.W. RAVIN; *J. Mol. Biol.*, 33, 873 (1968).
22. DE DUVE, C.; *Symp. on Biophys. and Physiol. of Biol. Transport*, pág. 95, Springer-Verlag. Viena y Nueva York (1967).
23. DE TERRA, N. y R.C. RUSTAD; *Exp. Cell. Res.* 17, 191 (1959).
24. DIAZ DE ESPADA, F.; *Tesis Doctoral*. Facultad de Ciencias, (Ed.), Universidad Complutense de Madrid, Madrid (1973).
25. DICKIE, N. e I.E. LIENER; *Biochim. Biophys. Acta*, 64, 41 (1962).
26. DICKIE, N. e I.E. LIENER; *Biochim. Biophys. Acta*, 64, 52 (1962).
27. DUBNAU, C. y C. CIRIGLIANO; *J. Mol. Biol.* 64, 9 (1972).
28. DUBNAU, C. y C. CIRIGLIANO; *J. Mol. Biol.* 64, 31 (1972).
29. DUNHAM, P.B. y F.M. CHILD; *Biol. Bull.* 121, 129 (1961).
30. EICHEL, H.J. y J.S. ROTH; *Biol. Bull.* 104, 351 (1963).
31. ELLIOT, A.M. y G.L. CLEMMONS; *J. Protozool* 13, 311 (1966).
32. FARQUHAR, M.G. y G.E. PALADE; *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 7, 297 (1960).
33. FELIX, M.D. y A.J. DALTON; *J. Biophys. Biochem. Cytol. Suppl.* 2, 109 (1956).
34. FREDERIC, J. y J. CORIN-FREDERIK; *C.R. Soc. Biol.* 156, 742 (1962).
35. FRIED, J.J.; "El misterio de la herencia". Alianza Editorial, Madrid (1973).
36. GERARD, P. y R. CORDIER; *Biol. Rev. Cambridge Phyl. Soc.* 9, 110 (1934).
37. GOSSELIN, R.E.; *J. Gen. Physiol.* 39, 625 (1956).

38. GROPP, A.; *Phagocytosis y pinocytosis. Cinemicrography in Cell Biology*. Academic Press. New York and London (1963).
39. HAESLER, H.A. y L. CUNNINGHAM; *Expt. Cell Res.* 13, 304 (1957).
40. HILL, M. y J. HILLOVA; *Nature New Biology*, 231, 261 (1971).
41. HOLTER, H. y J.M. MARSHALL; *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg*, 29, 7 (1954).
42. HOLTER, H.; Berlin-Heidelberg-New York. Springer (1965).
43. HOLTER, H. y M. HOLTZER; *Exptl. Cell. Res.* 18, 421 (1959).
44. HOTCHKISS, R.D. y M. GABOR; *Ann. Rev. Genetics.* 4, 193 (1970).
45. JEON, K.W. y L.G.E. BELL; *Exptl. Cell. Res.* 33, 531 (1964).
46. JHONS, E.W.; *Biochem. Journal*, 105, 611 (1967).
47. JHONSON, F.H., EYRING, H. y M.J. POLISSAR; "*The Kinetic Basis of Molecular Biology*". Jhon Wiley and Sons Inc. New York (1954).
48. JOSEFSSON, J.O.; *Acta Physiol. Scand.* 66, 395-405 (1966).
49. KARNOWSKY, M.L.; *Physiol. Rev.* 42, 143 (1962).
50. KARRER, H.E.; *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 7, 357 (1960).
51. KAYE, G.J. y G.D. PAPPAS; *J. Cell. Biol.*, 12, 457 (1962).
52. KORN, E.D. y R.A. WISSMAN; *J. Cell. Biol.*, 34, 219 (1967).
53. KRAUS, L.M.; *Nature*, 192, 1055 (1961).
54. LACKS, S., B. GREENBERG y K. CARLSON; *J. Mol. Biol.* 29, 327 (1967).
55. LAGUNOFF, D.; *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg*, 34, (8) 433 (1964).
56. LANTOS, T, MÜLLER, M, TÖRO, I., DRUGA, A. e I. VARGHA; *Acta Biol. Acad. Sc. Hung. Suppl.* 6, 22, (1964).
57. LEDOUX, L., R. HUART y M. JACOBS; *Eur. J. Biochem.* 23, 96 (1971).
58. LEUCHTENBERGER, C. y R. LEUCHTENBERGER; *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 44, 700 (1958).
59. LEVINE, Y.K. y M.H.F. WILKINS; *Nature New Biology* 230, 69-72 (1971).
60. LEWIS, W.H.; *Bull. Johns Hopkins Hosp.* 49, 17 (1931).
61. MARCHESI, V.T., T.W. TILLACK, R.L. JACKSON, J.P. SEGREST y R.E. SCOTT; *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 69, 1445-49 (1972).
62. MARMUR, J.; *J. Mol. Biol.*, 3, 208 (1965).

63. MARSHALL, J.M. y V.T. NACHMIAS; *J. Histochem. Cytochem.* 13 (1965).
64. MEIZEL, S. y E.R.M. KAY; *Biochem. Biophys. Acta*, 103, 431 (1965).
65. MERRIL, C.R.; *Nature* 233, 370 (1971).
66. METSCHNIKOFF, E.; *Biol. Centralbl.* 3, 360 (1833).
67. MILETIC, B.; D. PETROVIC y L. ZAJEC; *Nature*, 197, 90 (1963).
68. MILLAR, J.R., D.G. SMITH, W.E. MARR y T.R.E. KRESSMAN; *J. Chem. Soc.* pp 2740-2746 (1964).
69. MINGOT, F. y C.A. DAVILA; *J. Chromatog.* 94, 75-83 (1974).
70. MÜLLER, M.; *J. Protozool.*, 16 (3) 428-31 (1969).
71. MÜLLER, M., P. RÖHLICH e I. TÖRO; *J. Protozool.*, 12, 27 (1965).
72. NOTANI, N.K. y S.H. GOODGAL; *J. Mol. Biol.*, 13, 611 (1965).
73. ODOR, D.L.; *J. Biophys. Biochem. Cytol. Suppl.* 2, 105 (1956).
74. OTTOLENGHI-NIGHTINGALE, E. y R.D. HOTCHKISS; *J. Exp. Med.* 116, 491 (1962).
75. OTTOLENGHI-NIGHTINGALE, E.; *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 64, 184 (1969).
76. OTTOLENGHI-NIGHTINGALE, E.; *J. Bacteriol.*, 100, 445 (1969a).
77. PINTO DA SILVA, P.; *J. Cell. Biol.* 53, 777-787 (1972).
78. POLICARD, A. y M. BESSIS; *C.R. Soc. Biol.* 246, 3194 (1958).
79. PRICE, C.A.; *Science*, 135, 46 (1962).
80. PRUETT, P.O.; *Ph. D. Thesis*, Bryn Mawr College (Ed.) Bryn Mawr, Pennsylvania, (1965).
81. RASMUNSEN, L. y T.A. KLUDT; *Exptl. Cell Res.*, 59 (3), 457-63 (1970).
82. REGAN, J.D. y E. VOLKIN; *Biochem. Biophys. Acta*, 324, 1-13 (1973).
83. REICHEMBERG, D.; "Ion Exchange". J.A. Marinsky (Ed.) Marcel Dekker Inc. New York, pp. 227-76 (1966).
84. REVEL, J.P. y S. ITO; "The Specificity of Cell Surfaces". Englewood Cliffs (Ed.) N.J. Prentice Hall Inc. (1967).
85. RINALDI, R.A.; *Exptl. Cell Res.* 18, 70 (1959).
86. ROBINS, A.B. y D.M. TAYLOR; *Nature*, 217, 1228 (1968).
87. RUSTAD, R.C.; *Nature*, 183, 1058 (1959).

88. SARKAR, S.; *Methods Virol.* 2, 607 (1967).
89. SCALETTA, L.J. y B. EPHRUSSI; *Nature*, 197, 90 (1963).
90. SCHUMAKER, V.N.; *Exptl. Cell Res.* 15, 314 (1958).
91. SEAMAN, G.R.; *J. Protozool.* 8, 204 (1961).
92. SETLOW, J.K., M.L. RANDOLPH y M.E. BOLING; *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 33, 209 (1968).
93. SINGER, S.J. y G.L. NICOLSON; *Science* 175, 720-31 (1972).
94. SLATER, J.V. y J.W. TREMOR; *Biol. Bull.* 122, 298 (1962).
95. SMITH, I.; *Ph.D. Thesis*, Columbia University (Ed.) New York (1961).
96. SOMMER, J.R. y J.J. BLUM.; *J. Cell. Biol.*, 24, 235 (1965).
97. SPETH, V., D.F.H. WALLACH, E. WEIDEKAMM y H. KNÜFERMANN; *Biochem. Biophys. Acta*, 225, 386-394 (1972).
98. SPETH, V. y M. WUNDERLICH.; *Biochem. Biophys. Acta*, 324, 13 (1973).
99. SPIZIZEN, J.B., E. REILLY y A.H. EVANS; *Ann Rev. Microbiol.* 20, 371 (1966).
100. STAUBESAND, J.; *Klin. Wschr.* 38, 1248 (1960).
101. STOCKEM, W.; *Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat.* 74, 372 (1966).
102. STUY, J.H.; *J. Mol. Biol.* 13, 554 (1965).
103. SZIBALSKA, E. y W. SZIBALSKI; *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 48, 2926 (1962).
104. THOENES, W., K.H. LANGER y U. PFFEIFER; *Verhandl. Deutsch. Ges. Pathol.* 52, Tagung. Stuttgart, G. Fischer (Ed.) Verlag (1968).
105. TOMASZ, A.; *Ann. Rev. Genetics*, 3, 217-32 (1969).
106. TOURTELOTTE, M.E., D. BRANTON y A. KEITH; *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 66, 909-916 (1970).
107. TRAUBLE, H.; "*Biomembranes*", Vol. 3, Plenum Publ. Corp., New York (1972).
108. TSAN, M.F. y R.D. BERLIN; *J. Exptl. Med.* 134, 1016 (1971).
109. UDEN VAN, N.; "*The Yeast*" Vol. 2, A.H. Rose y J.S. Harrison (Eds.) Academic Press. London (1971).
110. UDEN VAN, N. y A. MADEIRA LOPES; *Z. allg. Mikrob.*, (1970).
111. UHLIGH, G., H. KOMNICK y K.E. WOHLFARHT-BOTTERMANN; *Helgolaender Wiss. Meeresuntersuch.*, 12, 61 (1965).

112. VOLKONSKY, M.; *Bull. Biol. Fr. Belg.* 67, 135 (1933).
113. WALLACH, D.F.H. y P.H. ZAHLER; *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 56, 1552-59 (1966).
114. WALLACH, D.F.H. y A. GORDON; *Fed. Proceedings*, 27, 1263-68 (1968).
115. WEISMAN, R.A. y E.D. KORN; *Biochemistry*, 6, 485 (1967).
116. WERB, Z. y Z.A. COHN; *J. Exptl. Med.* 134, 1570 (1971).
117. WERB, Z. y Z.A. COHN; *J. Biol. Chem.* 247, 2439 (1972).
118. WILKINS, M.H.F., A.E. BLAUROCK y D.M. ENGELMAN; *Nature New Biology*, 230, 72-76 (1971).
119. WOHLFARHT-BOTTERMANN, K.E.; *Ver. Dtsch. Zool. Ges. Munster/Westf. Zool. Anz. Suppl.* 23, 393 (1959).
120. WOHLFARHT-BOTTERMANN, K.E. y W. STOCHEM; *Z. Zellforsch. Mikroskop. Anat.* 73, 444 (1966).
121. WOLPERT, L. y C.H. O'NEILL; *Nature*, 19 b, 1261 (1961).
122. WORTHING, G. y J. GETTNER; "Treatment of Experimental Data". John Wiley and Sons Inc., New York, 6^a Edición (1950).
123. YANNARELL, A. y N. ARONSON JR; *Biochem. Biophys. Acta*, 34, 191-204 (1973).
124. ZIMMERMAN, A.M. y R.C. RUSTAD; *J. Cell Biol.*, 25, 397 (1965).

reunido el Tribunal que suscribe en el día de
la fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral
con la censura de Sobresaliente cum laude

Madrid, 25 de Junio de 1975

Alencas

Alencas

Alencas

Alencas

Alencas

Alencas

ADDENDUM

125. AVERY, O.T., C.M. MACLEOD y M. MACCARTY.- *J. Exptl. Med.* 79, 137 (1944).
126. BEARN, J.G. y K.S. KIRBY.- *Exptl. Cell. Res.* 17, 547 (1959).
127. BEATTY, R.A. y F.S. BILLET.- *Proc. Royal Soc. Edinburgh* 68, 83 (1961).
128. BENDICH, A., WILCZOK, T. y E. BORENFREUND.- *Science*, 148, 374(1965).
129. BENOIT, J., P. LEROY, C. VENDRELY y R. VENDRELY.- *C.R. Acad. Sci.* 224, 2321 (1951).
130. BENOIT, J. P. LEROY, C. VENDRELY y R. VENDRELY.- *Biochem. Pharmacol.* 4, 181 (1960).
131. BILLET, F.S., L. HAMILTON y D.R. NEWTH.- *Heredity*, 19, 259 (1964).
132. BRANDT, P.W. y G.D. PAPPAS.- *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 8, 675 (1960).
133. BRATINAU, S. y A. LLOMBART.- *Compt. Rend. Soc. Biol.* 101, 299 (1929).
134. CASPARI, E. y S. NAWA.- *Z. Naturforsch.*, 206, 281 (1965).
135. COE, E.H. y K.R. SARKAR.- *Crop. Sci.*, 6, 432 (1966).
136. CONNER, R.L., R. GOLDBERG y M.S. KORNACKER.- *J. Gen. Microbiol.* 24, 239 (1961 a).
137. CONNER, R.L., M.S. KORNACKER y R. GOLDBERG.- *J. Gen. Microbiol.* 26, 437 (1961 b).
138. CHANG, S.B. y R.S. MATSON.- *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 46, 1529-1535 (1972).
139. DAVILA, C.- *J. Chromatog.*, 19, 396 (1965).
140. DAVILA, C., P. CHARLES y L. LEDOUX.- *J. Chromatog.*, 19 382 (1965).
141. FAHMY, O.G. y M.J. FAHMY.- *Nature*, 191, 766 (1961).
142. FAHMY, O.G. y M.J. FAHMY.- *Nature*, 207, 506 (1965).
143. FOX, M.S. y S.B. YOON.- *Genetics*, 53, 897 (1966).
144. GERSHENSON, S.- *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, 25, 224 (1939).
145. GERSHENSON, S.- *Genet. Res.*, 6, 157 (1965).

146. GITLER, C.- En "*Biomembranes*" (Manson, L.A., Ed.). Vol. 2, pp. 41-73. Plenum Press. New York y London (1971).
147. LEROY, P., J. BENOIT, R. VENDRELY y C. VENDRELY.- *C.R. Acad. Sci., Paris*, 258, 1905 (1964).
148. LOWRY, O.H., N.J. ROSEBROUGH, A.L. FARR y R.J. RANDALL.- *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).
149. MARTINOVICH, P.N., D.T. KANAZAR, A.A. KNEZEVITCH y M.M. SMITCH.- *C.R. Acad. Sci., Paris*, 253, 1854 (1961).
150. MATHEW, C.- *Genet. Res.*, 6, 163 (1965).
151. NAWA, S. y M.A. YAMADA.- *Genetics*, 58, 573 (1968).
152. NOVIKOF, B.G., O.P. CHEMINOVA y D. LYUBARSKAIA.- *J. Gener. Acad. Sci., Moscou*, 22, 317 (1961).
153. NOVIKOFF, A.B.- En "*Developing Cell Systems and their Control*". D. Rudnick, ed., Ronald Press, New York (1960).
154. PARENTI, F., G. BRAVERMAN, J.F. PRESTON y J.M. EISENSTADT.- *Biochem Biophys. Acta* 195, 234 (1969).
155. PERRY, T.R. y D. WALKER.- *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 99, 717 (1958).
156. PUCHKOV, N.V.- *Biokhimiya* 20, 709 (1955).
157. RUDZINSKA, M.A., W. TRAGER y R.S. BRAY.- *J. Protozool.* 12, (4) 563 (1965).
158. SCALETTA, L.J. y B. EPHRUSSI.- *Nature*, 205, 1169(1965).
159. SHOFFNER, R.N., R.E. BURGER, C.W. ROBERTS y A.T. LEIGHTON.- *J. Heredity*, 52, 105 (1961).
160. SMITH, A.G. y H.R. CRESS.- *Labor. Invest.*, 10, 898 (1961).
161. SOLDI, A.T. y W.I. VAN WAGTENDOUK.- *J. Protozool.*, 8, 41 (1961).
162. STOCKEM, W.- *Mikroskopie*, 22, 143 (1967).
163. SVOVODA, J. y V. HASKOVA.- *Folia Biol, Prague*, 5, 402 (1959).
164. WEISBERGER, A.S.- *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 48, 68 (1962).
165. WOHLFARTH-BOTTERMANN, K.E.- *Protoplasma*, 52, 58 (1960).

A P E N D I C E

A continuación se detallan las condiciones experimentales que en cada caso dieron lugar a la obtención de los resultados recientemente discutidos.

Las correcciones realizadas se han detallado en el Material y Métodos de esta Tesis, al igual que el procedimiento empleado en el proceso estadístico que han seguido los datos, con arreglo al *criterio de Chauvenet*.

En este Apéndice se recogen asimismo todos los valores experimentales obtenidos, indicándose la *desviación estandar original* y la *desviación estandar reducida* después de haber desechado el valor más lejano a la media, siguiendo el mencionado criterio de Chauvenet.

Las nuevas medias aritméticas así conseguidas, se han utilizado para la elaboración de los datos ($\mu\text{g}/\text{cel}$) que se representan en las correspondientes figuras o bien, si la discusión no lo requiere, se han representado directamente en cpm.

Algunos valores independientes no han podido ser tratados de este modo, por no derivarse de la media de tres medidas experimentales.

El experimento de incubación directa en un medio definido (en presencia de ATP y GTP), realizado con *Tetrahymena pyriformis*, es el único experimento no procesado con arreglo al criterio de Chauvenet.

Las Cromatografías en DEAE-Celulosa, ofrecen unos valores porcentuales de las diferentes fracciones eluidas; la desviación estandar estimada para todas las fracciones es del 10% de su valor. (Ejemplo: $68\% \pm 6,8\%$). Los datos experimentales que figuran con un signo (-) son los desechados por el tratamiento estadístico.

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE ³H-DNA EN SU CAPTURA DIRECTA DEL MEDIO
(TETRAHYMENA PYRIFORMIS)

Medio de incubación = medio de crecimiento completo.

(Células): $1,5 \times 10^6$ /ml.

(³H-DNA): variable.

Tiempo de incubación: 10 minutos (constante).

Alícuotas: 0,75 ml.

Lavados sobre el filtro: 2 x 5 ml de medio de incubación a 0-4°C.

Volumen incubación: 25 ml.

RESULTADOS: en Cpm, según tabla de tratamiento estadístico de datos.

TETRAHYMENA PYRIFORMIS

EXPERIMENTO: Influencia de la concentración de ³H-DNA en su captura directa del medio

Y ₁	Y ₂	Y ₃	Media	Desv. típica.	%	Media corr. gida.	Desv. típica.	%	Error típico (+)	³ H-DNA
344	618	- 1119	693	393	56,66	481	193	40,28	111	0,24 µg/ml
423	713	- 1205	780	395	50,66	568	205	36,10	118	0,48 "
1449	2253	1813	1838	402	21,90	1838	402	21,90	232	1,00 "
3815	3608	4101	3841	247	6,44	3841	247	6,44	143	4,00 "
13504	13580	11621	12928	1132	8,76	12928	1132	8,76	653	8,00 "
14429	15775	16319	15507	972	6,27	15507	972	6,27	661	12,00 "
20444	19713	20935	20364	815	3,07	20364	815	3,02	353	16,00 "
26623	25239	27574	24479	1194	4,87	26479	1194	4,87	689	24,00 "

CINETICAS DE CAPTURA DIRECTA DE ^3H -DNA EN MEDIOS NO NUTRIENTES (Tetrahymena Pyriformis)

Medios de incubación: LiCl, NaCl y KCl, 35 mM, pH 7.

(Células): a) LiCl = $1,15 \times 10^6$ /ml.

b) NaCl = $1,5 \times 10^6$ /ml

c) KCl = $1,08 \times 10^6$ /ml

(^3H -DNA) = 1,27 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Actividad específica = $1,98 \times 10^6$ dpm/ μg (239 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Eficiencia: 8,5% (patrones).

Alícuotas: 0,5 ml.

Lavados: 2 x 5 ml con el medio de incubación a 0-4°C.

RESULTADOS: Tabla siguiente

cpm	dpm	dpm / cel	$\mu\text{g} / \text{cel}$	$\pm E_{\sigma}$	$t_{\text{inc.}}$	
29110	342470	0,596	0,30	0,012	1'15"	Litio
20913	246035	0,428	0,22	0,012	10'	
24910	293059	0,510	0,25	0,014	26'	
14387	169259	0,294	0,15	0,006	42'	
12090	142235	0,248	0,12	-	60'	
7013	82506	0,144	0,07	0,006	106'	
79512	935435	1,250	0,63	0,014	1'30"	Sodio
27519	323753	0,432	0,22	0,004	15'	
20407	240082	0,320	0,16	0,002	26'	
12464	146635	0,196	0,10	-	40'	
6041	71070	0,094	0,05	0,004	70'	
5300*	62353	0,082	0,04	-	103'	
15400	181176	0,336	0,17	0,002	1'15"	Potasio
20160	237176	0,440	0,22	0,004	8'	
14474	170282	0,316	0,16	0,004	24'	
7941	93423	0,172	0,09	0,001	40'	
7125	83823	0,156	0,08	-	62'	
5331	62718	0,116	0,06	0,001	90'	
4900*	57647	0,106	0,05	-	120'	

*Incubaciones individuales (sin tratamiento estadístico).

EXPERIMENTO: Cinética de captura de ³H-DNA en medios no nutrientes.

t _{incub.}	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Media	Desv. típica.	%	Media gral.	Desv. típica.	%	Error Exp. (+)	Catión 35 mM
1'15"	30582	29967	26783	29110	2039	7,00	29110	2039	7,00	1177	Li
10'	22970	19127	20643	20913	1935	9,26	20913	1935	9,26	1117	Li
26'	22820	27001	17650	22490	4684	20,80	24910	2956	11,87	1706	Li
42'	-18159	15173	13601	15644	2315	14,80	14387	1111	7,73	641	Li
60'	12200	11980	-15420	13200	1925	14,59	12090	155	1,29	89	Li
106'	7702	6733	6604	7013	600	8,56	7013	600	8,56	346	Li
1'30"	82887	79271	76380	79512	3260	4,10	79512	3260	4,10	1882	Na
15'	26897	28680	26980	27519	1006	3,66	27519	1006	3,66	580	Na
26'	19840	20325	21056	20407	612	3,00	20407	612	3,00	353	Na
40'	12517	12358	12518	12464	92	0,74	12454	92	0,74	53	Na
70'	5327	6289	6507	6041	627	10,39	6041	627	10,39	361	Na
103'	-	-	5300	5300	-	-	5300	-	-	-	Na
1'15"	-12102	15003	15798	14301	1945	13,60	15400	562	3,65	324	K
8'	19567	19862	21052	20160	786	3,90	20160	786	3,90	453	K
24'	13430	16153	13841	14474	1467	10,14	14474	1467	10,14	846	K
40'	9119	7764	-11088	9990	1825	20,30	7941	251	3,16	144	K
62'	-4996	7008	7243	6415	1235	19,25	7125	166	2,33	95	K
90'	5187	5846	5162	5331	272	5,11	5331	272	5,11	157	K
120'	-	-	4900	4900	-	-	4900	-	-	-	K

INCORPORACION DIRECTA DE UN COMPLEJO ³H-DNA-HISTONAS
(Tetrahymena pyriformis)

Medio de incubación: NaCl 35 mM.

(Células) = $1,3 \times 10^6$ /ml.

(³H-DNA-Histonas) = 1 mg/ml.

Actividad específica = Desconocida.

Lavados: 2 x 5 ml de medio de incubación a 0-4°C.

Alícuotas: 0,5 ml.

RESULTADOS: En cpm, según figura en el correspondiente cuadro de tratamiento estadístico de datos.

TETRAHYMENA PYRIFORMIS

EXPERIMENTO: Incorporación directa de un complejo ³H-DNA-Histonas en medio no nutritivo. ClNa 35 mM.

t _{incub.}	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Media	Desv. típica.	%	Media corregida.	Desv. típica.	%	Error típico. (+)
1'30"	-8525	11468	11468	10620	1825	17,19	11667	282	2,42	162
7'	4732	5488	5315	5178	396	7,65	5178	396	7,65	228
10'	4641	4361	4460	4487	141	3,16	4487	141	3,16	81
14'30"	3461	3560	3496	3505	50	1,43	3505	50	1,43	28
19'30"	3405	4145	3177	3575	506	14,15	3291	161	4,90	93
27'	2463	2259	2333	2351	103	4,39	2351	103	4,39	59
37'	2190	2048	1990	2076	102	4,96	2076	102	4,96	58
47'	1797	1900	1748	1815	77	4,27	1815	77	4,27	44
60'	1499	1687	1793	1659	148	8,97	1659	148	8,97	85
72'	1875	1316	1374	1355	93	2,49	1355	93	2,49	19
84'	1485	1394	1203	1360	143	10,58	1439	64	4,47	37
93'	1080	1025	960	1021	60	5,88	1021	60	5,88	34
145'	779	704	-951	811	126	15,61	741	53	7,15	30
210'	486	-408	502	465	50	10,81	494	11	2,29	6
260'	-461	349	336	382	68	17,99	342	6	2,68	5
290'	308	285	296	296	11	3,88	396	11	3,88	6

1,70

INFLUENCIA DEL PM DEL ^3H -DNA EN SU CAPTURA DIRECTA DEL MEDIO.
(Tetrahymena pyriformis)

(1) $\overline{\text{PM}}_p = 6 \times 10^6$ daltons.

Medio de incubación: NaCl 35 mM.

(Células) = $1,5 \times 10^6$ /ml.

(^3H -DNA) = 1,27 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Actividad específica: $1,98 \times 10^6$ dmp/ μg (239 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Eficiencia: 8,5% (patrones).

Alícuotas: 0,5 ml.

Lavados: 2 x 5 ml con medio de incubación a 0-4°C.

(Corresponde a la experiencia de "Cinética de captura directa en medios no nutrientes").

(2) $\overline{\text{PM}}_p = 10^6$ daltons. Se utilizó el mismo ^3H -DNA degradado espontáneamente hasta dicho $\overline{\text{PM}}_p$ y a la misma concentración en $\mu\text{g}/\text{ml}$, el mismo número de células por ml, mismos volúmenes alícuotas y lavados.

La eficiencia fue en este caso del 10% medida también con la ayuda de patrones.

Sin embargo, los resultados no han sido tratados estadísticamente por derivarse de filtraciones únicas para cada tiempo.

RESULTADOS

cpm	dpm	dpm/cel	$\mu\text{g}/\text{cel}$	$t_{\text{inc.}}$
58432	584320	0,78	0,39	1
23157	231570	0,30	0,15	6
18135	181350	0,24	0,12	15
13556	135560	0,18	0,09	27
6324	63240	0,08	0,04	80

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA DE INCUBACION EN LA INCORPORACION DIRECTA DE ³H-DNA-TETRAHYMENA PYRIFORMIS

Medio de incubación: Medio de crecimiento completo.

(Células): 10⁶/ml.

(³H-DNA): 1,2 µg/ml.

Actividad específica: 1,98 x 10⁶ dpm/µg (239 µg/ml).

Eficiencia: 12,5% (patrón).

Alícuotas: 1 ml.

Lavados sobre el filtro: 2 x 5 ml de medio de incubación a 0-4°C.

Volumen de incubación: 10 ml.

RESULTADOS: En cpm, según tabla de tratamiento estadístico de los datos.

cpm	dpm	dpm/cel	wg/cel	t _{inc.}	T ^o
125304	1002432	1,00	0,50	8'	0°-4°C
112735	901880	0,90	0,45	30'	
95894	767152	0,77	0,39	60'	
93379	747052	0,75	0,38	10'	18°C
82778	662224	0,66	0,33	33'	
55621	444968	0,44	0,22	70'	
46523	372184	0,37	0,19	5'	28°C
8178	65424	0,06	0,03	40'	
2627	21016	0,02	0,01	70'	

TETRAHYMENA PYRIFORMIS

EXPERIMENTO: Influencia de la temperatura de incubación, en la incorporación directa de ³H-DNA.

t _{inc.}	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Media	Desv. típica.	%	Media corre-gida	Desv. típica.	%	Error típico (+)	Observac.
8 mins	126548	125912	123452	125304	1635	1,30	125304	1635	1,30	943	0°-4°C
30 "	112141	111008	115057	112735	2088	1,85	112735	2088	1,85	1205	0°-4°C
60 "	-113879	100623	91166	101889	11409	11,20	95894	6687	6,97	3860	0°-4°C
10 "	91900	94900	-74610	87122	10936	12,55	93379	2091	2,24	1207	18°C
33 "	76456	87828	84051	82778	5791	7,00	82778	5791	7,00	3343	18°C
70 "	59312	56588	50962	55620	4258	7,66	55620	4258	7,66	2458	18°C
5 "	49285	43762	-34981	42676	7213	16,90	46523	3905	8,39	2254	28°C
40 "	-5664	7999	8358	7340	1462	19,93	8178	253	3,10	146	28°C
70 "	2486	2635	2761	2627	137	5,24	2627	137	5,24	79	21°C

TETRAHYMENA PYRIFORMIS

EXPERIMENTO: Efecto de la variación de temperatura en la recepción de ³H-DNA (Temperatura variable)

t _{preinc.}	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Media	Desv. típica.	%	Media corre gida.-	Desv. típica.	%	Error típico. (+)	Observac.
15 min	4099	4541	-2780	3806	916	24,07	4320	916	24,07	528	23,5°C
21 "	3840	3218	-2250	3102	801	25,82	3529	439	12,46	253	24,5°C
35 "	2840	2800	3001	2880	106	3,69	2880	106	3,69	61	25,0°C
50 "	-2993	2233	1973	2399	530	22,09	2103	530	22,09	305	25,5°C
80 "	2142	1818	1478	1812	332	18,32	1812	332	18,32	191	26,5°C

DIFERENTES TIEMPOS DE PREINCUBACION CON RNA DE LEVADURA

(Tetrahymena Pyriformis)

Medio incubación: Medio de crecimiento completo.

(Células): $9,1 \times 10^5$ /ml.

(^3H -DNA): 0,49 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (pulso con 2 μl).

(RNA) = 90,9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (150 μl , solución 1 mg/ml).

Actividad específica: $2,47 \times 10^6$ dpm/ μg (407 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Alicuotas: 0,5 ml.

Volumen incubación: 1,65 ml.

Eficiencia: 5% (Relación de canales).

Lavados sobre el filtro: 2 x 5 ml de medio de incubación a 0-4°C.

RESULTADOS:

cpm	dpm	dpm/cel	$\mu\text{g}/\text{cel}$	$t_{\text{preinc.}}$
1849	36980	0,0814	0,033	1'
1021	20420	0,0449	0,018	3'
1016	20332	0,0447	0,018	6'
448	8974	0,0197	0,008	13'
2252	45040	0,0991	0,040	21'
3273	65472	0,1440	0,058	31'
2506	50136	0,1103	0,045	45'

TETRAHYMENA PYRIFORMIS

EXPERIMENTO: Diferentes tiempos de preincubación con RNA de levadura.

$t_{\text{preinc.}}$	Y_1	Y_2	Y_3	Media	Desv. típica.	%	Media corr. gida.	Desv. típica.	%	Error típico. (+)
1'	28920	18122	18859	21933	5975	27,24	18490	521	2,82	300
3'	10569	9634	10428	10210	504	4,94	10210	504	4,94	291
6'	9895	10437	-13722	11351	2070	18,24	10166	383	3,77	221
13'	4183	4791	-6335	5103	1109	21,74	4487	429	9,58	247
21'	25173	21009	21379	22520	2304	10,23	22520	2304	10,23	1330
31'	38195	31835	28378	32736	4999	15,27	32736	4999	15,27	2686
45'	25006	23795	26403	25068	1305	5,21	25068	1305	5,21	753

DIFERENTES TIEMPOS DE PREINCUBACION CON POLIGLUTAMICO
(Tetrahymena pyriformis)

Medio de incubación: Medio de crecimiento completo.

(Células) = $9,87 \times 10^5$ /ml.

(^3H -DNA) = 0,34 $\mu\text{g/ml}$ (pulso con 2 μl).

Actividad específica: $2,74 \times 10^6$ dpm/ μg (352 $\mu\text{g/ml}$).

(PG) = 12,3 $\mu\text{g/ml}$ (25 μl , sol. 1 mg/ml); PM = 48000 daltons; (308 restos).

Alícuotas: 0,5 ml.

Lavados sobre el filtro: 2 x 5 ml de medio de incubación a 0-4°C.

Volumen de incubación: 2,025ml.

Eficiencia: 6,7% (Patrón).

RESULTADOS:

cpm	dpm	dpm/cel	$\mu\text{g/cel}$	$t_{\text{preinc.}}$
33008	495120	1,004	0,180	1'
27176	407640	0,827	0,148	3'
26598	398970	0,809	0,145	5'
27148	407220	0,826	0,148	8'
26887	403305	0,818	0,147	15'
24370	365565	0,741	0,133	20'
25514	382710	0,776	0,139	30'
24110	361650	0,734	0,131	52'
21323	319845	0,649	0,116	70'

TETRAHYMENA PYRIFORMIS

EXPERIMENTO: Diferentes tiempos de preincubación con poliglutámico.

t_{preinc}	Y_1	Y_2	Y_3	Media	Desv. típica.	%	Media corregida.	Desv. típica.	%	Error típico. (+)
1'	34566	31450	-26875	30963	3868	12,49	33008	2203	6,68	1271
3'	26550	27015	27964	27276	720	2,65	27176	720	2,65	415
5'	26660	26418	26716	26598	158	0,60	26598	158	0,60	91
8'	26776	27612	27056	27148	425	1,57	27148	425	1,57	245
15'	27930	25735	26996	26887	1101	4,10	26887	1101	4,10	635
20'	25078	24171	23863	24370	631	2,59	24370	631	2,59	364
30'	-28420	25270	25758	26482	1695	6,40	25514	345	1,35	199
52'	24500	23720	-28166	25462	2373	9,32	24110	551	2,29	318
70'	20285	22190	21495	21323	964	4,52	21323	964	4,52	556

SATURACION SECUENCIAL CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DNA EN LA PREINCUBACION. (Tetrahymena Pyriformis)

Medio de incubación: el de cultivo completo.

(Células) = variable.

(³H-DNA) = variable.

Volumen de incubación: variable.

(DNA) = variable experimental. (Solución de 1 mg/ml).

Actividad específica: $1,98 \times 10^6$ dpm/ μ g (239 μ g/ml).

Eficiencia de contaje: 8,5% (patrones).

Lavados: 2 x 5 ml con medio de incubación a 0-4°C.

Alicuotas: 0,5 ml.

Tiempo de preincubación: 20 minutos.

RESULTADOS: Para el cálculo de w , debe seguirse el procedimiento que se describe en la tabla siguiente. Los valores han sido corregidos por el efecto de dilución al aumentar el volumen de incubación. (Normalización a 2 ml).

Nº	DNA _T (μ g)	V(ml) incub	DNA _T (μ g/ml)	DNA [*] (μ g)	DNA [*] · 10 ⁻² (μ g/ml)	cpm	dpm	(Células)/ml x 10 ⁶	dpm/cel x 10 ⁻²	g ^o /cel incorp.	g ^o /cel puestos	% DNA [*] (capturado) puesto	% DNA [*] corregido por V. incub	1/P D ³ · 10 ⁻³
1	10	2,02	4,95	0,06	2,97	2369	2795	0,99	5,64	0,0285	0,030	.8500	.96 ± .03	0,166
2	20	2,030	9,85	0,16	7,87	4941	58303	1,082	10,77	0,0544	0,073	.745	.757 ± .02	0,126
3	40	2,050	19,51	0,24	11,70	4903	57855	1,073	10,79	0,0545	0,108	.500	.512 ± .05	0,166
4	70	2,080	33,65	0,24	11,54	1529	18042	1,105	3,27	0,0155	0,104	.159	.185 ± .04	0,294
5	75	2,085	35,97	0,24	11,51	969	11434	1,103	2,07	0,0104	0,104	.100	.104 ± .01	0,312
6	100	2,110	47,39	0,24	11,87	1112	13122	1,137	2,31	0,0117	0,100	.117	.123 ± .02	0,417
7	100	2,102	47,57	0,48	22,83	2176	25678	1,000	5,39	0,0272	0,228	.1191	.125 ± .03	0,268
8	125	2,135	58,55	0,24	11,24	798	9416	1,124	1,67	0,0084	0,100	.084	.09 ± .009	0,526
9	150	2,160	69,44	0,24	11,11	689	8130	1,157	1,41	0,0071	0,096	.074	.08 ± .007	0,625
10	175	2,185	80,09	0,24	10,98	588	6938	1,190	1,17	0,0059	0,092	.064	.07 ± .006	0,714
11	200	2,210	90,50	0,24	10,86	384	4531	1,176	0,77	0,0039	0,092	.047	.046 ± .004	0,833
12	250	2,260	110,62	0,24	10,62	436	5145	1,238	0,83	0,0042	0,096	.048	.055 ± .005	1,04

± D₉₅ = 0/5

TETRAHYENA PYRIFORMIS

EXPERIMENTO: Diferentes concentraciones de DMA de tamo en preincubación.

D/D*	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Media	Desv. típica.	%	Media core gida.	Desv. típica.	%	Error típico. (+)	$\mu \pm E_{\mu}$
166	2419	2319	1581	2106	457	21,73	2369	70	2,98	40	0,960±0,03
125	4990	5024	4810	4941	115	2,33	4941	115	2,33	66	0,757±0,02
167	4549	5258	-2466	4091	1451	35,47	4903	501	10,22	289	0,512±0,05
294	-2852	1262	1796	1970	809	41,07	1529	377	24,70	217	0,165±0,04
312	1141	929	836	968	156	16,14	968	156	16,14	90	0,104±0,01
417	1029	-2661	1195	1628	898	55,16	1112	117	10,56	67	0,123±0,02
526	752	929	713	798	115	14,43	798	115	14,43	66	0,090±0,009
625	644	656	763	687	65	9,53	687	65	9,53	37	0,080±0,007
714	-411	626	550	529	109	20,61	588	53	9,14	30	0,070±0,006
833	423	381	350	384	36	9,52	384	36	9,52	20	0,046±0,004
1040	486	378	446	436	54	12,50	436	54	12,50	31	0,055±0,005
208	2328	2276	1925	2176	219	10,07	2176	219	10,07	126	0,125±0,03

SATURACION SECUENCIAL CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE RNA EN LA PREIN
CUBACION. (Tetrahymena pyriformis)

(1) Concentraciones bajas

Medio de incubación: el de cultivo completo.

(Células): 10^6 /ml.

(RNA) = variable experimental.

(3 H-DNA) = 0,352 μ g/ml (2 μ l).

Actividad específica: $2,74 \times 10^6$ dpm/ μ g (352 μ g/ml).

Eficiencia: 6,5% (Patrones).

Volumen de incubación: 2 ml (se considera constante).

Tiempo de preincubación: 13 minutos.

Alicuotas: 0,5 ml.

Lavados: 2 x 5 ml con medio de incubación a 0-4°C.

(2) Concentraciones medias y altas

Medio de incubación: el de cultivo completo.

(Células) = $1,4 \times 10^6$ /ml.

(RNA) = variable experimental.

(3 H-DNA) = 0,700/volumen de incubación; (pulso con 2 μ l).

Eficiencia: 5% (relación de canales).

Volumen de incubación: variable por dilución al añadir el RNA (solución
de 1 mg/ml).

Actividad específica: 3×10^6 dpm/ μ g (350 μ g/ml).

Alicuotas: 0,5 ml.

Lavados: 2 x 5 ml de medio de incubación a 0-4°C.

Tiempo de preincubación: 13 minutos.

RESULTADOS: Para el cálculo de w debe seguirse el procedimiento que se
detalla en la tabla adjunta.

Los valores que figuran en la tabla (2) del tratamiento estadístico
de los datos, son 4 x cpm.

En el cálculo de w estos valores han sido corregidos por el efecto
de la dilución provocada al añadir el RNA (solución de concentración
1 mg/ml).

RNA µg	V ml	DMA* µg	Células	µg/cel puestos	cpm	dpm	dpm/cel	µg*/cel incorporados	ω	ω corregido	R/D*
0,5	2	0,704	2 x 10 ⁶	0,352	27921	427191	0,854	0,312	0,89	0,89	0,71
1,0	2	"	"	"	30647	468899	0,938	0,342	0,97	0,97	1,42
1,25	2	"	"	"	29691	454288	0,908	0,331	0,94	0,94	1,77
2,0	2	"	"	"	29784	455695	0,911	0,332	0,94	0,94	2,84
2,5	2	"	"	"	32142	491742	0,983	0,359	1,02	1,02	3,55
5,0	2	"	"	"	18330	280449	0,561	0,205	0,58	0,58	7,1
10	2,01	0,700	2,8 x 10 ⁶	0,25	1985	39700	0,0570	0,0191	0,08	0,08	14,2
20	2,02	"	"	"	1991	39820	0,0574	0,0193	0,08	0,09	28,4
30	2,03	"	"	"	2191	43820	0,0635	0,0216	0,09	0,09	42,6
40	2,04	"	"	"	1874	37480	0,0546	0,0186	0,07	0,07	56,8
50	2,05	"	"	"	1613	32260	0,0472	0,0161	0,06	0,06	71,0
100	2,1	"	"	"	1554	31080	0,0466	0,0163	0,06	0,06	142,0
125	2,125	"	"	"	1407	28140	0,0429	0,0153	0,06	0,06	177,5
150	2,15	"	"	"	1142	22840	0,0350	0,0126	0,05	0,05	213,1
200	2,2	"	"	"	1007	20140	0,0317	0,0117	0,05	0,05	284,1
300	2,3	"	"	"	441	8820	0,0145	0,0056	0,02	0,03	426,1
(1)		(1)	(2)				(3)			(4)	

(1) µg puestos en volumen de incubación V.

(2) Células puestas en volumen de incubación V.

(3) En cada filtro se recogen 0,5 ml de la suspensión celular en V. Se tiene en cuenta el descenso del número de células/ml por el aumento de V.

(4) Corrección por dilución.

TETRAHYMENA PYRIFORMIS

EXPERIMENTO: Diferentes concentraciones de RNA de levadura en la preincubación. (1): Concentraciones bajas.

R/D*	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Media	Desv. típica.	%	Media corregida.	Desv. típica.	%	Error típico. (+)
0,71	28521	27862	27380	27921	572	2,05	27921	527	2,05	304
1,42	30522	30772	30647	30647	125	0,41	30647	125	0,41	72
1,77	28548	30478	30049	29691	1013	3,41	29691	1013	3,41	584
2,84	29843	31524	27987	29784	1769	5,94	29784	1769	5,94	1021
3,55	33242	31713	31471	32142	960	2,99	32142	960	2,99	554
7,1	18333	19017	17641	18330	486	2,65	18330	486	2,65	280

TETRAHYMENA PYRIFORMIS

EXPERIMENTO: Diferentes concentraciones de RNA de levadura en la preincubación. (2): Concentraciones altas.

Y ₁	Y ₂	Y ₃	Media	Desv. típica.	%	Media corregida.	Desv. típica.	%	Error típico. (+)
7568	7821	8437	7942	446	5,63	7942	446	5,63	257
8631	7547	7717	7965	583	7,32	7965	583	7,32	336
8086	9449	-5948	7827	1764	22,54	8767	963	10,99	555
7509	7371	7613	7497	121	1,62	7497	121	1,62	69
6515	-8099	6390	7001	952	13,61	6452	88	1,37	50
6101	6711	5838	6216	447	7,20	6216	447	7,20	235
5250	6061	5575	5628	408	7,25	5628	408	7,25	288
4173	5132	4402	4569	500	10,96	4569	500	10,96	288
3750	4391	3951	4030	327	8,13	4030	327	8,13	188
-2305	1843	1690	1946	320	16,45	1766	108	6,12	82

**SATURACION SECUENCIAL CON DIFERENTES CONCENTRACIONES DE POLIGLUTAMICO
EN LA PREINCUBACION. (Tetrahymena pyriformis)**

Medio de incubación: el de cultivo completo.

(Células) = 5×10^5 . Variable por la dilución provocada al añadir el po
liglutámico (solución de 1 mg/ml).

(³H-DNA) = 0,704 µg/volumen de incubación; (pulso con 2 µl).

(Poliglutámico) = variable experimental.

Volumen de incubación: variable por dilución.

Actividad específica: $2,74 \times 10^6$ dpm/µg (352 µg/ml).

Eficiencia: 6,66% (patrones).

Alicuotas: 0,5 ml.

Lavados: 2 x 5 ml con medio de incubación a 0-4°C.

RESULTADOS: Para el cálculo de w debe seguirse el procedimiento que se
detalla en la tabla adjunta. Los valores han sido corregidos por el efecto
de la dilución que se provoca al añadir las concentraciones crecien-
tes de Poliglutámico, a partir de una solución de concentración 1 mg/ml.
(Normalización a 2 ml).

PG (μ g)	V (ml)	DNA* (μ g)	células	μ g/cel. puestos	$\overline{\text{cpm}}$	$\overline{\text{dpm}}$	dpm/cel	μ g*/cel. incorporadas	ω	ω correg.	P/D*
1,0	2,002	0,704	10^7	0,704	30044	450660	1,802	0,658	0,93	0,93	1,42
1,25	2,005	"	"	"	25905	388575	1,554	0,567	0,81	0,81	1,80
2,0	2,002	"	"	"	25183	377745	1,511	0,551	0,78	0,78	2,84
2,5	2,005	"	"	"	24813	372195	1,481	0,543	0,77	0,77	3,60
5	2,005	"	"	"	22050	330750	1,323	0,483	0,69	0,69	7,1
7	2,007	"	"	"	23202	348030	1,392	0,508	0,72	0,72	9,9
10	2,01	"	"	"	17087	256305	1,025	0,374	0,54	0,54	14,2
15	2,015	"	"	"	23720	355800	1,423	0,519	0,73	0,73	21,3
20	2,02	"	"	"	23208	348120	1,403	0,512	0,72	0,73	28,4
25	2,025	"	"	"	14424	216360	0,876	0,32	0,45	0,46	35,5
35	2,035	"	"	"	15143	227145	0,919	0,335	0,47	0,48	49,7
50	2,05	"	"	"	20149	302235	1,233	0,450	0,63	0,63	71,0
100	2,1	"	"	"	13190	197850	0,811	0,296	0,42	0,43	142
200	2,2	"	"	"	9554	143310	0,602	0,22	0,31	0,34	284
400	2,4	"	"	"	7808	117120	0,516	0,19	0,27	0,32	568
(1)		(1)	(2)				(3)			(4)	

(1) μ g puntos en el volumen de incubación V.

(2) Células puestas en el volumen de incubación V.

(3) En cada filtro, sólo se recogen 0,5 ml de la suspensión celular en V. Se tiene en cuenta el descenso en el número de células/ml por el aumento de V.

(4) Corrección por dilución.

TETRAHYDENA PYRIFORMIS

EXPERIMENTO: Diferentes concentraciones de poliglútamico en la preincubación.

P/D*	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Media	Desv. típica.	%	Media corre. gida. -	Desv. típica.	%	Error típico. (+)	w ± E ₀
1,42	29984	29651	30497	40044	426	1,42	30044	426	1,42	245	0,94
1,8	25524	24815	27377	25905	1322	5,11	25905	1322	5,11	763	0,80
2,84	-19801	25132	25235	23389	3108	13,29	25183	72	0,29	41	0,72
3,6	26357	28896	25188	24813	1760	7,10	24813	1760	7,10	1016	0,77
7,1	20800	23550	21800	22050	1391	6,31	22050	1391	6,31	803	0,68
9,9	23802	21481	24323	23202	1513	6,52	23202	1513	6,52	873	0,71
14,2	17474	16700	-25600	19924	4930	24,74	17087	547	3,20	316	0,63
21,3	21700	24800	24660	23720	1750	7,38	23720	1750	7,38	1010	0,74
28,4	23013	22606	24006	23208	720	3,18	23208	720	3,19	415	0,72
35,5	15201	13160	14911	14424	1104	7,66	14424	1104	7,66	637	0,45
48,7	15981	15890	13558	15143	1373	9,07	15143	1373	9,07	792	0,48
71,0	21593	17900	20955	20149	1973	9,80	20149	1973	9,80	1139	0,65
142	12458	13477	13637	13190	639	4,85	13190	639	4,85	369	0,44
284	-13775	9770	9339	10961	2446	22,32	9554	304	3,19	175	0,41
568	-9777	8144	7473	8464	1184	14,00	7808	474	6,08	273	0,26

PREINCUBACION SIMULTANEA CON DNA DE TIMO Y RNA DE LEVADURA
(*Tetrahymena pyriformis*)

Medio de incubación: Medio de cultivo completo.

(Células) = $2,5 \times 10^5$ /ml (variable según V incubación).

(³H-DNA) = 0,7 µg/volumen de incubación (pulso con 2 µl).

Actividad específica: 3×10^6 dpm/µg (350 µg/ml).

Eficiencia: 5% (relación de canales).

Volumen de incubación: variable por dilución.

(DNA) = 5, 10, 15, 20 (µg/volumen de incubación).

(RNA) = 25, 30, 50 (µg/volumen de incubación).

Tiempo de preincubación: 10 minutos con ambos biopolímeros a la vez.

Alícuotas: 0,5 ml.

Lavados: 2 x 5 ml con medio de incubación a 0-4°C.

RESULTADOS: Para el cálculo de ω , debe seguirse el procedimiento de la tabla adjunta.

RNA µg/V	DNA µg/V	DNA* µg/V	V (ml)	cpm	dpm	dpm/cel	µg*/cel. incorporadas	µg*/cel puestos	ω (%)	ω (%) corrctg.	D/D*	R/D*
25	5	0,7	2,03	14508	290160	1,178	0,393	2,8	0,140	0,142	7,1	35,5
25	10	0,7	2,035	6139	122780	0,501	0,167	"	0,060	0,061	14,2	"
25	15	0,7	2,04	6323	126460	0,516	0,172	"	0,061	0,062	21,21	"
25	20	0,7	2,045	3408	68160	0,279	0,093	"	0,033	0,034	28,6	"
30	5	0,7	2,035	6334	126680	0,515	0,171	"	0,061	0,062	7,1	42,6
30	10	0,7	2,04	4648	92960	0,379	0,126	"	0,045	0,046	14,2	"
30	15	0,7	2,045	5084	101680	0,417	0,139	"	0,049	0,050	21,4	"
30	20	0,7	2,05	2356	47120	0,193	0,074	"	0,026	0,027	28,6	"
50	5	0,7	2,055	3209	64180	0,264	0,088	"	0,031	0,032	7,1	71
50	10	0,7	2,06	2524	50480	0,209	0,069	"	0,025	0,026	14,2	"
50	15	0,7	2,065	1731	34620	0,143	0,048	"	0,017	0,018	21,4	"
50	20	0,7	2,07	1813	36260	0,150	0,050	"	0,017	0,018	28,6	"

EUCLENA GRACILIS

EXPERIMENTO: Preincubación simultánea con DNA de tiso y RNA de levadura.

(DNA) µg/ml	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Media	Desv. típica.	%	Media corre- gida.	Desv. típica.	%	Error Epi- co. (+)	(RNA) µg/ml
2,46	11018	17434	15072	14508	3244	22,37	14508	3244	22,37	1872	12,31
4,91	5659	5550	7208	6139	927	15,11	6139	927	15,11	535	12,28
7,35	5418	5770	7782	6323	1275	20,17	6323	1275	20,17	736	12,25
9,78	3360	-5865	3456	4227	1419	33,58	3408	67	1,99	38	12,22
2,46	5917	6595	6490	6334	364	5,76	6334	364	5,76	210	14,74
4,90	5133	3778	5034	4648	755	16,25	4648	755	16,25	435	14,70
7,33	5662	-3113	4506	4427	1276	28,83	5084	817	16,08	471	14,63
9,75	2350	2362	3457	2723	635	23,35	2356	8	0,36	4	14,63
2,43	3914	3257	2456	3209	730	22,75	3209	730	22,75	421	24,33
4,85	2553	2995	2072	2540	461	18,17	2540	461	18,17	266	24,27
7,26	1805	-1658	2888	2023	511	25,27	1731	568	25,74	327	24,21
9,66	1668	1153	-1959	1593	408	25,62	1813	360	25,56	207	24,15

COMPETENCIA EN LA RECEPCION ENTRE DNA Y RNA. PULSO CON ^3H -DNA DE DISTINTO $\overline{\text{PM}}_p$. (Tetrahymena pyriformis).

Medio de incubación: Medio de cultivo completo.

(Células) = $8,3 \times 10^5$ /volumen de incubación.

(RNA) = 10, 25, 50, 100 μg /volumen de incubación.

(^3H -DNA) $_1$ = 0,814 μg /volumen incubación ($\overline{\text{PM}}_p = 10^6$ daltons).

Actividad específica: $2,47 \times 10^6$ dpm/ μg (407 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

(^3H -DNA) $_2$ = 0,700 μg /volumen incubación ($\overline{\text{PM}}_p = 6 \times 10^6$ daltons).

Actividad específica = 3×10^6 dpm/ μg (350 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Volumen incubación = variable según diluciones.

Alícuotas: 0,5 ml.

Eficiencia: 5% (Relación de canales).

Tiempo de preincubación: 10 minutos.

RESULTADOS: Para el cálculo de w debe seguirse el procedimiento que se detalla en la tabla adjunta.

RNA μg	RNA* μg	V inc.	$\overline{\text{cpm}}$	$\overline{\text{dpm}}$	dpm/cel	$\mu\text{g}/\text{cel}$ incorporadas	$\mu\text{g}/\text{cel}$ puestos	" %	" correg.	R/D*
10	0,814	1,51	2047	40940	0,099	0,040	1,47	0,03	0,04	12,3
25	"	1,525	3146	62920	0,154	0,062	"	0,04	0,04	30,7
50	"	1,55	4541	90820	0,226	0,091	"	0,06	0,06	61,4
100	"	1,65	6488	129760	0,344	0,139	"	0,09	0,09	123,0
10	0,700	1,51	4111	82220	0,199	0,080	1,28	0,06	0,07	14,3
25	"	1,525	6462	129240	0,313	0,126	"	0,10	0,11	35,7
50	"	1,55	2192	43840	0,109	0,044	"	0,04	0,04	71,4
100	"	1,65	5558	111160	0,294	0,119	"	0,09	0,10	143,0
(1)	(1)									

(1) μg puestos en volumen incubación V.

EXPERIMENTO: Competencia en la recepción de DNA de timo y RNA de levadura.

R/D*	Y $_1$	Y $_2$	Y $_3$	Media	Desv. típica.	%	Media corregida.	Desv. típica.	%	Error típico. (+)	$\overline{\text{PM}}_p$
12,3	2043	1814	2286	2047	236	11,53	2047	236	11,53	136	10^6 D
30,7	-2347	2898	3394	2879	523	18,19	3146	350	11,15	202	"
61,4	-3590	4386	4697	4224	570	13,52	4541	219	4,84	126	"
123	7088	5642	6736	6488	754	11,62	6488	754	11,62	435	"
14,3	4126	4464	3745	4111	359	8,75	4111	359	8,75	207	6×10^6 D
35,7	6268	6253	6866	6462	349	5,41	6462	349	5,41	201	"
71,4	2356	1945	2275	2192	217	9,93	2192	217	9,93	125	"
143	5611	-4233	5505	5116	766	14,99	5558	74	1,35	42	"

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE ^3H -DNA EN SU CAPTURA DIRECTA DEL MEDIO
(Euglena gracilis)

Medio de incubación: NaCl 35 mM.

Tiempo de incubación: 10 minutos.

(Células) = 10^6 ml.

(^3H -DNA) = variable experimental.

Volumen de incubación: 2 ml.

Alícuotas = 0,5 ml.

Lavados: 4 x 5 ml de medio incubación a $0-4^\circ\text{C}$.

RESULTADOS: En cpm, según figuran en el correspondiente cuadro del tratamiento estadístico de datos.

EUGLENA GRACILIS

EXPERIMENTO: Influencia de la concentración de ^3H -DNA en su incorporación directa.

(^3H -DNA) µg/ml	Y_1	Y_2	Y_3	Media	Desv. típica.	%	Media corre- gida.	Desv. típica.	%	Error típico. (+)
5	10485	11290	10887	10887	402	3,70	10887	10887	3,70	232
10	15140	15767	17848	16251	1417	8,72	16251	16251	8,72	828
15	-22420	32713	27567	27566	5146	18,77	30140	30140	12,07	2100
20	29846	-44663	29687	34732	8600	24,76	29766	29766	0,38	64
25	47899	51117	49508	49508	1609	3,25	49508	49508	3,25	929

**EFEECTO DE LA CONCENTRACION DE NaCl EN LA INCORPORACION DIRECTA DEL ³H-DNA
(Euglena gracilis)**

Medios de incubación: Soluciones de NaCl de concentraciones variables.

(Células) = $1,16 \times 10^6$ /ml.

(³H-DNA) = 0,985 µg/ml (5 µl, de una solución de 690 µg/ml).

Actividad específica: 10^6 dpm/µg.

Volumen de incubación: 3,5 ml.

Alicuotas: 1 ml.

Lavados: 2 x 5 ml de NaCl 35 mM a 0-4°C.

Tiempo de incubación: 10 minutos.

Eficiencia: 2% (patrones).

RESULTADOS:

cpm	dpm	dpm/cel	µg/cel	NaCl (mM)
92546	4627300	3,99	3,99	9
68784	3439200	2,96	2,96	18
70585	3529250	3,04	3,04	35
88036	4401800	3,79	3,79	50
94037	4701850	4,05	4,05	70

EUGLENA GRACILIS

EXPERIMENTO: Efecto de la concentración de ClNa en la incorporación de ³H-DNA.

(NaCl) mM	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Media	Desv. típica.	%	Media corregida.	Desv. típica.	%	Error típico. (+)
9	-84285	94410	90682	89792	5120	5,70	92546	2636	2,85	1521
18	64847	-80833	72721	72800	7993	10,98	68784	5567	8,09	3214
35	69278	71424	71054	70585	1147	1,63	70585	1147	1,63	662
50	84593	89699	89817	88036	2982	3,39	88036	2982	3,39	1721
70	94876	94876	93052	94037	920	0,98	94037	920	0,98	531

CINETICAS DE INCORPORACION DE ^3H -DNA EN MEDIOS NO NUTRIENTES (LiCl, NaCl, KCl y NH_4Cl , 35 mM). (Euglena gracilis).

- (Células): 1) LiCl $1,068 \times 10^6$ /ml.
 2) NaCl $1,063 \times 10^6$ /ml.
 3) K Cl $1,16 \times 10^6$ /ml.
 4) NH_4Cl $0,99 \times 10^6$ /ml

(^3H -DNA) = 8,8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($\overline{\text{PM}}_p = 2 \times 10^6$ daltons).

Actividad específica: $2,6 \times 10^6$ dpm/ μg (483 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

Eficiencia: 2% (relación de canales).

Volumen de incubación: 11 ml.

Alícuotas: 0,5 ml.

Lavados: 3 x 5 ml con el medio de incubación correspondiente a 0-4°C.

RESULTADOS: En cpm, según la tabla del tratamiento estadístico de los datos.

En la influencia del $\overline{\text{PM}}_p$ en captura, se han convertido los valores en NaCl y KCl a $\mu\text{g}/\text{célula}$.

EUGLENA GRACILIS

EXPERIMENTO: Cinéticas de incorporación de ^3H -DNA en medios no nutrientes (CLi, CLNa, CLK, 35 mM).

$t_{\text{inc.}}$	Y_1	Y_2	Y_3	Media	Desv. típica.	%	Media corregida.	Desv. típica.	%	Error típico. (+)	Medio
3'	11257	14602	14604	13487	1931	14,32	13487	1931	14,32	1114	Li Cl
11'	8954	8787	11112	9617	1296	13,48	9617	1296	13,48	748	
33'	-8745	23027	25637	19136	9093	47,52	24332	1845	7,58	1065	
55'	9249	9765	11678	10230	1279	12,51	10230	1279	12,51	738	
120'	15143	9499	-32521	19054	11999	62,97	12321	3990	32,39	2303	
155'	30906	32614	-18127	27149	7849	28,91	31660	1066	3,37	615	
3'	150104	158171	155964	154746	4169	2,69	154746	4169	2,69	2406	NH_4Cl
11'	254246	-154372	283623	230747	67754	29,36	268934	20772	7,72	11992	
33'	300417	260434	170778	243876	66386	27,22	243876	66386	27,22	38327	
55'	282878	-545795	275179	367617	15434	41,98	278528	4736	1,70	2734	
103'	386714	303374	333431	341173	42205	12,37	341173	42205	12,37	24367	
3'	31782	30402	25165	29116	3490	11,99	29116	3490	11,99	2014	K Cl
11'	34161	23782	28971	28971	5189	17,91	28971	5189	17,91	2995	
33'	53468	32238	40707	42137	10687	25,36	42137	10687	25,36	6170	
63'	46184	50493	70049	55575	12718	22,88	55575	12718	22,88	7342	
105'	60837	88465	58484	72595	14265	19,65	72595	14265	19,65	72595	
130'	84703	68634	47552	66963	18631	27,82	66963	18631	27,82	10756	
3'	39349	47798	-10247	32464	19699	60,68	43573	5974	13,71	3448	Na Cl
11'	13437	14685	-23923	17348	5727	33,02	14061	882	6,28	509	
33'	25134	25135	19623	23297	3182	13,66	23297	3182	13,66	1837	
55'	34704	47624	41471	41266	6462	15,66	41266	6462	15,66	3730	
120'	36619	40445	32050	36371	4202	11,56	36371	4202	11,56	2426	
160'	121194	-166543	86785	124840	40003	32,04	103989	24330	23,40	14046	

DIFERENTES TIEMPOS DE PREINCUBACION CON DNA EN NaCl 35 mM

(Euglena gracilis)

Medio de incubación: NaCl 35 mM.

{Células} = 10^6 /ml.

(3 H-DNA) = 0,64 g/ml (pulso con 5 l).

Actividad específica: $2,47 \times 10^6$ dpm/g (407 g/ml).

(DNA) = 47,6 g/ml (150 l, solución 1 mg/ml).

Eficiencia: 8,8% (relación de canales).

Alícuotas: 1 ml.

Lavados: 2 x 5 ml de medio de incubación a 0-4°C.

Volumen de incubación: 3,150 ml.

RESULTADOS: En el tratamiento estadístico, figuran cpm x 10.

cpm	dpm	dpm/cel	µg/cel	t _{preinc.}
5620	63864	0,0639	0,023	1
3970	45113	0,0451	0,016	3
7872	89454	0,0895	0,033	8
7715	87670	0,0877	0,032	15
9720	110455	0,110	0,040	40
7187	81670	0,0817	0,030	60
8663	98432	0,0984	0,036	110

EUGLENA GRACILIS

EXPERIMENTO: Diferentes tiempos de preincubación con DNA de tимо, en medio no nutritivo, ClNa 35 mM.

t _{preinc.}	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Media	Desv. típica.	%	Media corregida.	Desv. típica.	%	Error típico (+)
1	55831	56570	-71229	61210	8684	14,19	56200	522	0,93	301
3	36088	39117	43900	39701	3938	9,92	39701	3938	9,92	2273
8	75416	76219	84529	78721	5045	6,41	78721	5045	6,41	2012
15	-56590	75234	79074	70299	12026	17,11	77154	2715	3,52	1567
40	95732	98675	-118577	104328	12427	11,91	97208	2081	2,14	1201
60	73487	73932	68195	71871	3191	4,44	71871	3191	4,44	1842
110	85330	85570	88869	86623	2035	2,35	86620	2035	2,35	1174

DIFERENTES TIEMPOS DE PREINCUBACIÓN CON DNA EN MEDIO DE CULTIVO COMPLETO A pH 7. (*Euglena gracilis*).

Medio de incubación: el de cultivo completo, pH 7.

(Células) 10^6 /ml.

($^3\text{H-DNA}$) = 0,64 $\mu\text{g/ml}$ (pulso con 5 μl).

Actividad específica: $2,47 \times 10^6$ dpm/ μg (407 $\mu\text{g/ml}$).

(DNA) = 47,6 $\mu\text{g/ml}$ (150 μl , solución 1 mg/ml).

Eficiencia: 8,8% (relación de canales).

Alícuotas: 1 ml.

Lavados: 2 x 5 ml de medio de incubación a 0-4°C.

Volumen de incubación: 3,150 ml.

RESULTADOS

cpm	dpm	dpm/cel	$\mu\text{g/cel}$	$t_{\text{preinc.}}$
2440	27727	0,028	0,011	1
1338	15205	0,015	0,006	3
2193	24920	0,025	0,010	8
2959	33625	0,034	0,014	15
4164	47318	0,047	0,019	30
3796	43136	0,043	0,017	40
4139	47034	0,047	0,019	60
4818	54738	0,055	0,022	119
3418	38841	0,039	0,016	150

EUGLENA GRACILIS

EXPERIMENTO: Diferentes tiempos de preincubación con DNA de timo (medio de cultivo completo pH 7).

$t_{\text{preinc.}}$	Y_1	Y_2	Y_3	Media	Desv. típica.	%	Media corregida.	Desv. típica.	%	Error típico. (+)
1	2460	2421	-3264	2715	475	17,53	2440	27	1,13	15
3	1464	1212	-1863	1513	328	21,70	1338	178	13,32	102
8	2330	2057	-3436	2607	730	28,00	2193	193	8,80	111
15	3009	2910	-3815	3244	496	15,30	2959	70	2,37	40
30	4356	3814	4323	4164	303	7,30	4164	303	7,30	174
40	3835	3689	3863	3795	93	2,46	3795	93	2,46	53
60	4207	4091	4120	4139	60	1,46	4139	60	1,46	34
119	4411	4672	5370	4817	495	10,29	4817	495	10,29	285
150	3211	3625	-4504	3780	660	17,47	3418	292	8,56	168

CINETICA DE INCORPORACION DIRECTA DE $^3\text{H-DNA}$ EN MEDIO NO NUTRIENTE NaCl ,
35 mM. (*Euglena gracilis*).

(Células) = 8×10^5 ml.

($^3\text{H-DNA}$) = 14 $\mu\text{g/ml}$ ($\overline{\text{PM}}_p = 3,5 \times 10^6$ daltons).

Actividad específica: $2,86 \times 10^5$ dpm/ μg .

Volumen de incubación: 16 ml.

Alícuotas: 1 ml.

Lavados: 3 x 5 ml con el medio de incubación a 0-4°C.

Eficiencia: 2,5% (patrones).

RESULTADOS: Sólo se han utilizado para describir la influencia del $\overline{\text{PM}}_p$ del $^3\text{H-DNA}$ en su captura directa.

EUGLENA GRACILIS

EXPERIMENTO: Cinética de incorporación de $^3\text{H-DNA}$ en medio no nutriente ClNa , 35 mM.

$t_{\text{inc.}}$	Y_1	Y_2	Y_3	Media	Desv. típica.	%	Media corregida.	Desv. típica.	%	Error típico. (+)	$\overline{\text{PM}}_p$
2	13404	10072	11025	11500	1716	14,92	11500	1716	14,92	990	$3,5 \times 10^6$
10	3783	3806	5505	4364	987	22,63	4364	987	22,63	569	"
30	3998	4735	4144	4292	390	9,09	4292	390	9,09	225	"
60	4729	5905	5226	5286	590	11,17	5286	590	11,17	340	"
135	-10406	4192	3012	5870	3972	67,67	3602	834	23,16	481	"

CINETICA DE INCORPORACION DIRECTA DE ^3H -DNA EN MEDIO NO NUTRIENTE (Comprobación). (Euglena gracilis).

Medio de incubación: NaCl, 35 mM.

(Células) = $6,1 \times 10^5$ ml.

(^3H -DNA) = 3,45 $\mu\text{g/ml}$ ($\overline{\text{PM}} = 10^7$ daltons).

Actividad específica: $10^{6\text{p}}$ dpm/ μg (690 $\mu\text{g/ml}$).

Volumen de incubación: 20 ml.

Alícuotas: 1 ml.

Eficiencia: 2% (relación de canales).

Lavados: 2 x 5 ml con el medio de incubación a 0-4°C.

RESULTADOS: Se han utilizado para ver la influencia del $\overline{\text{PM}}_{\text{p}}$ en la incorporación del ^3H -DNA, (en $\mu\text{g/célula}$).

Para la descripción de la cinética, se han representado en cpm, según la tabla del tratamiento estadístico de datos.

EUGLENA GRACILIS

EXPERIMENTO: Cinética de incorporación directa de ^3H -DNA en medio no nutriente ClNa 35 mM. (Comprobación).

$t_{\text{inc.}}$	Y_1	Y_2	Y_3	Media	Desv. típica.	%	Media corregida.	Desv. típica.	%	Error típico. (+)	$\overline{\text{PM}}_{\text{p}}$
1'15"	311308	305334	310436	309026	3226	1,04	309026	3226	1,04	1862	10^7
8'	231631	239597	238093	236440	4232	1,79	236440	4232	1,79	2443	"
20'	238063	251675	-275126	254954	18747	7,35	244869	9625	3,93	5556	"
110'	266938	273596	280865	273799	6965	2,54	273799	6965	2,54	4021	"
155'	376779	-313941	351848	347522	31641	9,10	364313	17628	4,84	10177	"

INFLUENCIA DEL \overline{PM}_p DEL $^3\text{H-DNA}$ EN SU CAPTURA DIRECTA DEL MEDIO
(Euglena gracilis)

I: Medio de incubación NaCl, 35 mM.

\overline{PM}_p (daltons)	Relación $\frac{^3\text{H-DNA } (\mu\text{g})}{10^6 \text{ células}}$
1) 10^7	5,6
2) $3,5 \times 10^6$	17,5
3) 2×10^6	8,6

Normalización para una
relación $\frac{\mu\text{g } ^3\text{H-DNA}}{10^6 \text{ células}}$
de 10.

De experimentos independientes de incorporación directa, a diferentes tiempos, se obtuvieron los siguientes resultados:

Las condiciones se reseñan en los experimentos:

- 1) $\overline{PM}_p = 10^7$: "Cinética de incorporación de $^3\text{H-DNA}$ en medio no nutriente NaCl 35 mM" (comprobación).
- 2) $\overline{PM}_p = 3,5 \times 10^6$: "Cinética de incorporación de $^3\text{H-DNA}$ en medio no nutriente NaCl 35 mM.
- 3) $\overline{PM}_p = 2 \times 10^6$: "Cinética de incorporación de $^3\text{H-DNA}$ en medios no nutrientes" (LiCl, NaCl y KCl 35 mM).

Los resultados se expresan en unidades másicas tras convertir las cpm y corregir los $\mu\text{g/cel}$ según las diferentes relaciones $\mu\text{g } ^3\text{H-DNA}/10^6 \text{ células}$, normalizando a 10, según se detalla en la sección Materiales y métodos ("Correcciones a los datos en las experiencias de incorporación directa", II.4.2.).

$t_{inc.}$	wg/cel	$\pm E_{\sigma}$	\overline{PM} (daltons)	$\mu g \text{ } ^3\text{H-DNA}/10^6 \text{ células}$
1'15"	4,44	0,006	10^7	5,6
8	3,32	0,07	"	
20	3,60	0,023	"	
60	4,27	0,035	"	
110	4,03	0,10	"	
155	5,2	0,14	"	
2	1,08	0,09	$3,5 \times 10^6$	17,5
10	0,41	0,05	"	
30	0,39	0,02	"	
60	0,49	0,03	"	
135	0,57	0,07	"	
3	0,18	0,011	2×10^6	8,6
11	0,06	0,02	"	
33	0,09	0,007	"	
55	0,17	0,011	"	
120	0,15	0,01	"	
160	0,44	0,06	"	

- 147 -

INFLUENCIA DEL \overline{PM}_p DEL $^3\text{H-DNA}$ EN SU CAPTURA DIRECTA DEL MEDIO
(Euglena gracilis)

II: Medio de incubación: KCl, 35 mM.

\overline{PM}_p (daltons)	Relación $\frac{^3\text{H-DNA } (\mu\text{g})}{10^6 \text{ células}}$
10^7	1,57
2×10^6	7,58
10^6	1,4

Las cinéticas en presencia de $^3\text{H-DNA}$ de \overline{PM}_p 10^7 daltons y 10^6 daltons, corresponden a un mismo experimento. El \overline{PM}_p 2×10^6 daltons se ensayó en la experiencia de análisis de la influencia del medio -no nutriente- de incubación en la incorporación directa del $^3\text{H-DNA}$.

Condiciones en el experimento $10^6 - 10^7$ daltons:

Células) = 10^6 /ml.

$^3\text{H-DNA}$) = 10^6 daltons: 1,14 $\mu\text{g/ml}$.

= 10^7 daltons: 1,57 $\mu\text{g/ml}$.

Actividades específicas:

10^6 daltons: 10^6 dpm/ μg (690 $\mu\text{g/ml}$).

10^7 " : $2,8 \times 10^6$ dpm/ μg (280 $\mu\text{g/ml}$).

Eficiencias: 2% (relación de canales).

Volumen de incubación: 10 ml.

Alicuotas: 0,5 ml. La medida marcada con un asterisco(*) es el resultado de una alicuota doble (de 1 ml en cada filtración).

Lavados: 2 x 5 ml con medio de incubación a 0-4°C.

RESULTADOS:

t _{inc.}	µg/cel	E ₀	PM _p (daltons)	µg ³ H-DNA/10 ⁶ células
1	1,88	0,07	10 ⁷	1,57
15	2,41	0,06	"	
28	2,78	0,07	"	
40	2,91	0,07	"	
57	3,14	0,16	"	
145	3,66	0,07	"	
170	3,43	0,20	"	
3	1,26	0,15	2 x 10 ⁶	7,58
11	1,26	0,22	"	
33	1,84	0,46	"	
62	2,42	0,55	"	
105	3,16	0,62	"	
130	2,93	0,81	"	
1	0,12	0,005	10 ⁶	1,40
11	0,23	0,005	"	
25	0,30	0,014	"	
44	0,37	0,012	"	
57	0,37	0,011	"	
135	0,56	0,014	"	

EUGLENA GRACILIS

EXPERIMENTO: Influencia del PM en la incorporación de ³H-DNA en medio no nutriente CLK 35 mM.

Y ₁	Y ₂	Y ₃	Media	Desv. típica.	%	Media corregida	Desv. típica.	%	Error típico (+)
72299	74295	77288	74624	2515	3,37	37312*	2515	3,37	1452
48360	46270	50428	48352	2079	4,30	48352	2079	4,30	1200
58517	54519	54155	55730	2420	4,34	55730	2420	4,34	1397
58721	60527	55701	58316	2438	4,18	58316	2438	4,18	1407
63275	68479	57158	62970	5666	9,00	62970	5666	9,00	3271
-57617	71281	75067	67988	9179	13,50	73174	2677	3,66	1545
6640	7250	6325	6738	470	6,98	6738	470	3,98	271
12935	12314	-10528	11925	1249	10,48	12624	439	3,48	253
17634	15281	17730	16881	1387	8,22	16881	1387	8,22	800
22853	-17884	21069	20602	2517	12,22	21961	1261	5,74	728
-22746	20281	18808	20611	1989	9,65	19544	1941	5,33	601
30635	-35120	28798	31517	3252	10,32	29716	1288	4,37	749

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA EN LA INCORPORACION DIRECTA DE ³H-DNA (Euglena gracilis)

Medio de incubación: NaCl, 35 mM.

(Células) = 10⁶/ml.

(³H-DNA) = 1,2 µg/ml.

Actividad específica = 1,98 x 10⁶ dpm/µg (239 µg/ml).

Eficiencia: 8,9% (patrón).

Alicuotas: 1 ml.

Lavados sobre el filtro: 2 x 5 ml de medio de incubación a 0-4°C.

RESULTADOS: En cpm según tabla del tratamiento estadístico de datos.

EUGLENA GRACILIS

EXPERIMENTO: Influencia de la temperatura de incubación en la incorporación de ³H-DNA.

t _{inc.}	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Media	Desv. típica.	%	Media corregida.	Desv. típica.	%	Error típico. (+)	Temperatura
11'	23682	23324	-44284	30430	11999	39,43	23503	253	1,08	146	0-4°C
25'	48606	46135	43873	46204	2367	5,12	46204	2367	5,12	1366	
65'	23671	26923	25439	25344	1628	6,42	25344	1628	6,42	939	
10'	42761	37304	35812	38625	3658	9,47	38625	3658	9,47	2111	18°C
45'	47779	57513	57093	54128	5502	10,17	54128	5502	10,17	3176	
70'	42061	41578	-32547	38728	5358	13,84	41819	341	0,82	196	
8'	42013	45193	40956	42720	2205	5,16	42720	2205	5,16	1273	28°C
30'	57108	49335	55496	53979	4102	7,60	53979	4102	7,60	2368	
60'	41150	46022	41881	43017	2627	6,11	43017	2627	6,11	1516	

DIFERENTES TIEMPOS DE PREINCUBACION CON RNA DE LEVADURA

(Euglena gracilis)

Medio de incubación: NaCl, 35 mM.

(Células) = $9,6 \times 10^5$ /ml.

(³H-DNA) = 0,34 g/ml (pulso con 2 l).

Actividad específica: $2,74 \times 10^6$ dpm/g (352 g/ml).

(RNA) = 24,4 g/ml.

Alícuotas = 0,5 ml.

Lavados sobre el filtro: 2 x 5 ml de medio de incubación a 0-4°C.

Volumen de incubación: 2,05 ml.

Eficiencia: 3,7% (patrones).

RESULTADOS: En el correspondiente cuadro del tratamiento estadístico, figuran cpm x 10 (contaje a 10 minutos).

cpm	dpm	dpm/cel	µg/cel	t _{preinc.}
1421	38405	0,080	0,029	1
1411	38108	0,079	0,029	3
1252	33838	0,070	0,026	5
1515	40946	0,084	0,031	8
1574	42540	0,088	0,032	15
1733	46838	0,097	0,035	20
1396	37730	0,078	0,028	30
1424	38486	0,079	0,029	50
1629	44027	0,090	0,033	70

EUGLENA GRACILIS

EXPERIMENTO: Diferentes tiempos de preincubación con RNA de levadura.

t _{preinc.}	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Media	Desv. típica.	%	Media corregida.	Desv. típica.	%	Error típico. (+)
1	12282	-8168	16141	12197	3987	32,69	14211	2728	19,20	1575
3	15538	10902	15851	14097	2771	19,66	14097	2771	19,66	1599
5	12582	11277	13702	12520	1213	9,69	12520	1213	9,69	700
8	16303	16554	12597	15151	2215	14,62	15151	2215	14,62	1278
15	17752	14457	15014	15741	1763	11,20	15741	1763	11,20	1017
20	17718	-9935	16937	14863	4285	28,84	17327	552	3,19	318
30	14988	-21713	12932	16544	4592	27,76	13960	1453	10,41	838
50	16441	12039	14239	14239	2201	15,46	14239	2201	15,46	1270
70	17124	15562	16186	16294	785	4,82	16294	785	4,82	453
140	-4699	2467	3537	3567	1116	31,29	3002	756	25,20	436

DIFERENTES TIEMPOS DE PREINCUBACION CON POLIGLUTAMICO

(*Euglena gracilis*)

Medio de incubación: NaCl, 35 mM.

(Células) = $6,4 \times 10^5$ /ml.

(^3H -DNA) = 0,34 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (pulso con 2 μl).

Actividad específica = $2,74 \times 10^6$ dpm/ μg (352 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

(PG) = 12,3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (25 μl , sol. 1 mg/ml).

PM = 48,000 daltons (308 restos).

Alícuotas = 0,5 ml.

Lavados sobre el filtro: 2 x 5 ml de medio de incubación a 0-4°C.

Volumen de incubación = 2,025 ml.

Eficiencia: 5% (patrones).

RESULTADOS

cpm	dpm	dpm/cel	$\mu\text{g}/\text{cel}$	$t_{\text{preinc.}}$
7368	147360	0,460	0,167	1'
7980	159600	0,498	0,181	3'
9198	183960	0,574	0,209	5'
8434	168680	0,527	0,192	8'
7207	144140	0,450	0,164	15'
6803	136060	0,425	0,155	20'
6633	132660	0,414	0,151	30'
6724	134480	0,420	0,153	50'
5971	119420	0,373	0,136	70'
6270	125400	0,391	0,142	140'

EUGLENA GRACILIS

EXPERIMENTO: Diferentes tiempos de preincubación con poliglutamico.

$t_{\text{preinc.}}$	Y_1	Y_2	Y_3	Media	Desv. típica.	%	Media corre gida.	Desv. típica.	%	Error típico. (+)
1'	7330	7132	7642	7368	257	3,49	7368	257	3,49	148
3'	7149	-4629	8812	6863	2106	30,69	7980	1175	14,73	678
5'	8987	-6900	9409	8432	1343	15,93	9198	298	3,24	172
8'	8057	-5868	8811	7578	1528	20,17	8434	533	6,32	307
15'	6980	6377	8265	7207	964	13,38	7207	964	13,38	558
20'	6912	6694	-9139	7581	1353	17,85	6803	154	2,27	88
30'	6721	6212	6967	6633	385	5,80	6633	385	5,80	222
50'	7345	6103	-8528	7325	1213	16,56	6724	1621	9,23	935
70'	6235	5147	6531	5971	728	12,21	5971	728	12,21	420
140'	6347	6208	6258	6270	70	1,13	6270	70	1,13	40

DIFERENTES CONCENTRACIONES DE DNA DE TIMO EN LA PREINCUBACION
(*Euglena gracilis*)

Medio de incubación: NaCl, 35 mM, pH 7.

(Células) = $4,2 \times 10^5$ /ml.

(DNA) = variable experimental.

Tiempo de preincubación: 3 minutos.

(³H-DNA)=2 µl/volumen de incubación de una solución 352 µg/ml, (pulso
de 1 minuto).

Actividad específica: $2,74 \times 10^6$ dpm/µg.

Eficiencia: 3,7% (patrones).

Volumen de incubación: variable según diluciones.

Alícuotas: 0,5 ml.

Lavados: 2 x 5 ml de medio de incubación.

RESULTADOS: Para el cálculo de ω deberá seguirse el procedimiento que se detalla en la tabla adjunta.

$\frac{DNA_T}{V_{inc}}$	V_{incub}	$\frac{DNA^*}{V_{inc}}$	cpm	dpm	$\frac{Cells}{ml}$	dpm/cel	$\frac{\mu g^*}{cel}$ incorp.	$\frac{\mu g^*}{cel}$ puestos	$\frac{\%}{\omega}$	ω correg.	D/D*
0,50	2,002	0,704	1082	29214	$4,2 \times 10^5$	0,139	0,051	0,83	0,06	0,06	0,71
1,0	"	"	681	18387	"	0,0875	0,032	"	0,038	0,038	1,42
1,25	2,005	"	604	16308	"	0,0776	0,028	"	0,034	0,034	1,78
2,0	2,002	"	741	2007	"	0,0953	0,034	"	0,040	0,040	2,84
2,5	2,005	"	541	14607	"	0,0695	0,025	"	0,030	0,030	3,55
5,0	"	"	373	10179	"	0,0485	0,018	"	0,022	0,022	7,10
7,0	2,007	"	246	6642	$4,18 \times 10^5$	0,0318	0,012	"	0,015	0,015	9,94
10,0	2,01	"	262	7074	$4,17 \times 10^5$	0,0339	0,012	"	0,014	0,014	14,20
15,0	2,015	"	155	4185	"	0,0201	0,0073	"	0,009	0,009	21,31
25,0	2,025	"	142	3834	$4,15 \times 10^5$	0,0184	0,0068	"	0,008	0,0081	35,51
35,0	2,035	"	146	3942	$4,13 \times 10^5$	0,0191	0,007	"	0,008	0,0086	49,72
50,0	2,05	"	152	4117	$4,10 \times 10^5$	0,0201	0,0073	"	0,009	0,0092	71,02
100,0	2,1	"	1103	2794	$4,0 \times 10^5$	0,0140	0,0052	"	0,006	0,0063	142,00
150,0	2,15	"	93	2510	$3,90 \times 10^5$	0,0129	0,0047	"	0,005	0,0054	213,1
200,0	2,20	"	75	2025	$3,81 \times 10^5$	0,0106	0,0039	"	0,004	0,0044	284,1
250,0	2,25	"	56	1512	$3,73 \times 10^5$	0,0081	0,0029	"	0,003	0,0034	355,1
300,0	2,30	"	55	1242	$3,65 \times 10^5$	0,0068	0,0025	"	0,003	0,0034	426,1
				(1)	(2)	(2)	(3)	(4)			

(1) Se ha descontado en todos los casos un fondo de 40 cpm.

(2) Las alícuotas son de 0,5 ml.

(3) A.E. = 2,74 dpm/ μ g.

(4) 2 ml de suspensión de protozoos ($4,2 \times 10^5$) células/ml).

EXPERIMENTO: Diferentes concentraciones de DNA de tiso en la preincubación.

(DNA) (µg/ml)	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Media	Desv. típica.	%	Media corre- gida.	Desv. típica.	%	Error típico. (+)
0,25	1329	1110	806	1081	262	24,28	1081	262	24,28	151
0,50	787	461	795	681	190	27,98	681	190	27,98	109
0,62	684	549	580	604	70	11,70	604	70	11,70	40
1,00	883	662	677	740	123	16,67	740	123	16,67	71
1,25	531	475	618	541	72	13,31	541	72	13,31	41
2,49	440	355	337	377	55	14,58	377	55	14,58	31
2,48	274	210	253	245	32	13,28	245	32	13,28	18
4,97	292	191	304	262	62	23,66	262	62	23,66	35
7,44	-219	124	121	154	55	26,04	122	2	1,73	1
12,34	172	114	140	142	29	20,46	142	29	20,46	16
17,20	153	131	154	146	13	8,90	146	13	8,90	7
24,40	177	-47	128	117	65	55,95	152	34	22,72	19
47,60	92	115	-306	171	117	68,70	103	16	15,71	9
69,76	107	79	-339	175	142	81,55	93	19	21,29	11
90,91	70	44	-110	74	33	44,53	57	18	32,25	10
111,11	58	61	50	56	5	10,09	56	5	10,09	2
130,43	-73	46	46	55	15	28,34	55	15	28,34	8

DIFERENTES CONCENTRACIONES DE RNA EN LA PREINCUBACION
(*Euglena gracilis*)

Medio de incubación: NaCl, 35 mM, pH 7.

(Células) = $6,6 \times 10^5$.

(^3H -DNA) = 0,704/volumen de incubación.

(RNA) = variable experimental.

Actividad específica: $2,74 \times 10^6$ dpm/ μg . (0,352 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 2 μl).

Eficiencia: 2% (patrones).

Tiempo de preincubación: 5 minutos.

Volumen de incubación: variable según diluciones.

Alícuotas: 0,5 ml.

Lavados: 2 x 5 ml con el medio de incubación.

RESULTADOS: Para el cálculo de ω , debe seguirse el procedimiento que se detalla en la tabla adjunta. En todos los casos se han descontado 40 cpm atribuibles al fondo.

$\frac{\mu\text{g RNA}}{V_{\text{inc}}}$	$\frac{\mu\text{g DNA}^*}{V_{\text{inc}}}$	V incub. (ml)	cpm	dpm	cells/ml	$\mu\text{g}^*/\text{cell incorp.}$	$\mu\text{g}^*/\text{cel puestos}$	% ω	R/D*
0,5	0,704	2,002	191	9550	$6,6 \times 10^5$	0,0106	0,53	0,02	0,71
1,0	"	"	201	10050	"	0,0109	"	0,02	1,42
1,5	"	2,005	219	10950	"	0,0120	"	0,02	2,1
2,0	"	2,002	196	9800	"	0,0109	"	2,02	2,8
2,5	"	"	243	12150	"	0,0135	"	0,025	3,6
5,0	"	2,005	223	11150	"	0,0124	"	0,030	7,1
7,0	"	2,007	276	13800	$6,57 \times 10^5$	0,0154	"	0,03	9,94
10,0	"	2,01	350	17500	$6,56 \times 10^5$	0,0194	"	0,04	14,2
15,0	"	2,015	388	19400	$6,55 \times 10^5$	0,022	"	0,04	21,3
25,0	"	2,025	424	21200	$6,52 \times 10^5$	0,024	"	0,04	35,5
35,0	"	2,035	265	13250	$6,48 \times 10^5$	0,0172	"	0,03	49,7
50,0	"	2,05	349	17450	$6,44 \times 10^5$	0,0202	"	0,04	71
100,0	"	2,1	285	14250	$6,28 \times 10^5$	0,018	"	0,03	142
150,0	"	2,15	266	13200	$6,14 \times 10^5$	0,017	"	0,03	294

EUGLENA GRACILIS

EXPERIMENTO: Diferentes concentraciones de RNA de levadura en la preincubación.

RNA g/ml	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Media	Desv. tipica.	%	Media corre- gida.	Desv. tipica.	%	Error tipico. (±)
0,25	204	188	182	191	11	5,94	191	11	5,94	6
0,5	181	206	216	201	18	8,97	201	18	8,97	10
0,62	228	217	214	219	7	3,36	219	7	3,36	4
1,0	189	185	215	196	16	8,30	196	16	8,30	9
1,25	243	226	260	243	17	7,00	243	17	7,00	9
2,5	244	219	208	223	18	8,25	223	18	8,25	10
3,48	268	-215	285	256	36	14,26	276	12	4,35	7
4,97	358	343	-425	375	43	11,63	350	10	3,03	5
7,44	401	-279	376	352	64	18,31	388	17	4,55	9
12,34	420	397	457	424	30	7,13	424	30	7,13	17
17,2	297	233	-361	297	64	21,55	265	45	17,08	25
24,4	367	335	346	349	16	4,65	349	16	4,65	9
47,6	294	280	283	285	7	2,58	285	7	2,58	4
69,8	281	-412	251	314	85	27,21	266	21	7,97	12

DIFERENTES CONCENTRACIONES DE PG EN LA PREINCUBACION
(*Euglena gracilis*)

Medio de incubación: NaCl, 35 mM.

(Células) = $7,5 \times 10^5$ /ml.

(³H-DNA) = 0,704 µg/volumen de incubación.

(PG) = variable experimental.

Tiempo de preincubación: 15 minutos.

Actividad específica: $2,74 \times 10^6$ dpm/µg (352 µg/ml, 2 µl).

Eficiencia: 5% (patrón, 4,96%).

Volumen de incubación: variable según diluciones.

Alicuotas: 0,5 ml.

Lavados: 2 x 5 ml con medio de incubación.

RESULTADOS: Para el cálculo de ω debe seguirse el procedimiento que se detalla en la tabla adjunta

$\frac{\mu\text{g PG}}{V \text{ inc.}}$	$\frac{\text{DNA}^*}{V \text{ inc.}}$	V inc. (ml)	$\overline{\text{cpm}}$	$\overline{\text{dpm}}$	$\frac{\text{cells.}}{\text{ml}}$	$\frac{\mu\text{g}^*}{\text{cel. incorp.}}$	$\frac{\mu\text{g}}{\text{cel. puestos}}$	ω %	ω correg.	P/D*
1,0	0,704	2,002	7977	15954	$7,5 \times 10^5$	0,155	0,469	0,33	0,33	1,42
1,25	"	2,005	7060	141200	"	0,140	"	0,30	0,30	1,80
2,0	"	2,002	10250	205000	"	0,202	"	0,43	0,43	2,6
2,50	"	2,005	9152	183040	"	0,180	"	0,38	0,38	3,55
5,0	"	"	8745	174900	"	0,171	"	0,36	0,36	7,1
7,0	"	2,007	10602	210040	"	0,204	"	0,43	0,43	9,94
10,0	"	2,01	9098	181960	$7,46 \times 10^5$	0,180	"	0,88	0,39	14,2
15,0	"	2,015	11368	227380	$7,44 \times 10^5$	0,222	"	0,47	0,48	21,3
20,0	"	2,02	9728	194560	$7,43 \times 10^5$	0,103	"	0,41	0,42	28,4
25,0	"	2,025	8365	167300	$7,40 \times 10^5$	0,170	"	0,36	0,36	35,5
35,0	"	2,035	9653	193060	$7,36 \times 10^5$	0,193	"	0,41	0,42	49,7
50,0	"	2,050	7886	157730	$7,30 \times 10^5$	0,162	"	0,34	0,36	71
100,0	"	2,100	8578	171560	$7,14 \times 10^5$	0,184	"	0,39	0,41	142
200,0	"	2,200	8256	165120	$6,90 \times 10^5$	0,195	"	0,42	0,44	204

EUGLENA GRACILIS

EXPERIMENTO: Diferentes concentraciones de poliglutámico en la preincubación.

(PG) (ug/ml)	Y ₁	Y ₂	Y ₃	Media	Desv. típica.	%	Media corré- gida.	Desv. típica.	%	Error típico. (+)
0,5	83436	67059	88834	79776	11339	14,21	79776	11339	14,21	6546
0,67	76045	61253	74507	70601	8132	11,52	70601	8132	11,52	4695
1,0	102185	92490	112843	102506	10180	9,93	102506	10180	9,93	5877
1,25	91684	91362	91523	91523	161	0,18	91523	161	0,18	93
2,5	92290	74179	95880	87449	11632	13,30	87449	11632	13,30	6715
3,5	109790	96485	111808	106027	8325	7,85	106027	8325	7,85	4806
4,9	87067	87692	98160	90973	6231	6,85	90973	6231	6,85	3597
7,4	111980	114936	114130	113682	1528	1,34	113682	1528	1,34	882
9,9	106093	82969	192781	97281	12504	12,85	97281	12504	12,85	7219
12,3	-100679	76576	73685	83646	14821	17,72	75130	2044	2,72	1180
17,2	100305	88366	100931	96534	7080	7,33	96534	7080	7,33	4087
24,4	83289	78469	74847	78863	4235	5,37	78868	4235	5,37	2445
47,6	96649	78919	81775	85781	9519	11,10	85781	9519	11,10	5495
90,9	89099	-54587	76018	73234	17428	23,79	82558	9248	11,20	5338