

LA    DIFERENCIACION    EPIGENETICA  
DE   LA    CELULA    CRISTALINIANA

TESIS QUE PARA EL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTA EL LICENCIADO  
ANTONIO PIÑERO BUSTAMANTE EN LA  
FACULTAD DE MEDICINA DE SEVILLA

SEVILLA - 1975.-

R. 9. 939



TD  
P/14

DON JOSE MARIA GENIS GALVEZ CATEDRATICO DE ANATOMIA  
DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD DE SE-  
VILLA

CERTIFICA:

Que D. Antonio Piñero Bustamante Licen-  
ciado en Medicina y Cirugía en la Facultad de Medici-  
na de Sevilla, ha realizado bajo mi dirección el pre-  
sente trabajo titulado "LA DIFERENCIACION EPIGENETI-  
CA DE LA CELULA CRISTALINIANA", el cual presenta como  
Tesis para optar al grado de Doctor.

Y para que así conste expido el presente  
certificado.



EL CATEDRATICO

Fdo. José Maria Genis Galvez

Sevilla

Octubre de 1975

A MIS PADRES

## INDICE

Agradecimiento

SUMARIO

PARTE I : INTRODUCCION Y CONCEPTOS

PARTE II : EL CONCEPTO ACTUAL DE DIFERENCIACION

- A. Génesis de la forma celular.
- B. Bioquímica de la diferenciación celular.
- C. Inmunología de la diferenciación.

PARTE III: ESTUDIO DE UN SISTEMA BIOLÓGICO EN DIFERENCIACION:  
EL CRISTALINO, ESTADO ACTUAL Y PROPOSITOS.

- A. Desarrollo del cristalino.
- B. Secuencia celular de diferenciación morfológica.

PARTE IV : MATERIAL Y METODOS

- I. Técnicas preparativas.
  - 1. Obtención del material.
  - 2. Conservación y tratamiento del material.
  - 3. Ultracentrifugación preparativa.
  - 4. Preparación de antisueros.

## II. Técnicas analíticas

1. Determinación cuantitativa de proteínas totales.
2. Determinación de grupos -SH.
3. Determinación de la actividad LDH.
4. Caracterización química de los ribosomas.
5. Electroforesis e Inmuno-electroforesis.
6. Isoenzimas de la LDH.

## PARTE V : RESULTADOS.

1. Cantidad y tipo de proteínas estructurales.
2. Grupos -SH libres.
3. Actividad e isoenzimas de la LDH
4. Análisis de los ribosomas.

## PARTE VI : DISCUSION.

## AGRADECIMIENTO

- Al Prof. GENIS GALVEZ que sin duda alguna ha sido el artifice principal de este trabajo y que sin su ayuda y sin el cariño que ha demostrado, aún me encontraría perdido en sus esbozos.
  
- Al Dr. Francisco Malagón en el que siempre he tenido el -- consejo, la orientación y como no, la amistad.
  
- A todos aquellos que de una manera directa o quizás indi-- recta me han ayudado en el trabajo del laboratorio.
  
- A mi Padre el Prof. Piñero Carrión, por haber creado en mí el afán de superación y la disciplina en el trabajo.

## S U M A R I O

Se ha revisado el concepto de diferenciación celular. En primer lugar, se confronta con los de morfogénesis y crecimiento. Posteriormente se pasa revista a las ideas actuales sobre el problema, concretamente al concepto "diferenciación como actividad epigenética".

Se propone un modelo de estudio en el cristalino. Se analizan los cuatro grados de diferenciación de las células cristalinas con respecto a su contenido en proteínas, LDH y grupos -SH.

También se aíslan los ribosomas del órgano y se procede a su análisis químico e inmunológico. Los resultados muestran unas diferencias químicas correlativas a la diferenciación morfológicas; y se comprueba inmunológicamente la presencia de alfa cristalina en los ribosomas. La significación de los resultados se discute en términos con su relación con el proceso ontogénico de inducción del cristalino por la retina.

Se concluye discutiendo la correlación entre cambios macromoleculares y cambios morfológicos.

## PARTE I. INTRODUCCION Y CONCEPTOS

La diferenciación es el proceso por el cual un tipo dado de célula se transforma en otro. La amplitud de esta definición debe necesariamente restringirse en el terreno que nos ocupa, como ya veremos más adelante.

Hemos, en primer lugar, de hacer hincapié en el hecho - de que definimos la diferenciación como un proceso celular, - que afecta única y exclusivamente a la célula.

Una diferenciación "orgánica" sería una morfogénesis, - concepto que, por razones de claridad, separaremos ya de ante mano de nuestra discusión.

Una distinción importante, y necesaria, es la de separar de nuestra discusión toda alusión a las diferenciaciones "patológicas". Estas reciben sus nombres concretos en Histopatología, tales como metaplasia, anaplasia, displasia, etc. No nosotros restringimos nuestro estudio al proceso de diferenciación normal de una célula.

La segunda restricción consiste en considerar la diferenciación como un proceso ontogénico, no filogénico.



Es habitual en los tratados de Zoología hablar de organismos y órganos más "diferenciados", como término comparativo para designar la evolución filogénica alcanzada. No es tal -- nuestro propósito; por otra parte, la aplicación del término "diferenciación" aplicado a la morfología comparada predispono, a nuestro entender, a tener "in mente" prejuicios nacidos de la superada teoría recapitulativa de HAECKEL. Además, al -- igual que la consideración de la diferenciación "patológica, -- haría que nuestro estudio se diluyera demasiado, y en un te-- rreno francamente difícil expuesto a errores de concepción.

Aún hemos de restringir más el concepto de diferencia-- ción arriba expuesto. Esta tercera restricción es la más im-- portante, pues su aceptación implica la de las dos anteriores.

Consiste en que sólo consideraremos como diferenciación el proceso de transformación celular regido por el propio sis-- tema genético de la célula, en la medida que el ambiente lo -- permita o lo regule. Pero dado que el ambiente en que está in-- mersa la célula en diferenciación es habitualmente otro con-- junto de células con guarniciones genéticas homólogas, perte-- necientes al mismo organismo, la causa de la diferenciación -- radicaría en último término en el genoma del individuo, que -- para WAGNER y MITCHELL (1964) (65) representaría una "norma -- de reacción".

Esta última restricción nos exige un comentario más amplio. En primer lugar, veremos que esta exigencia satisface - las dos anteriores. En efecto: si la diferenciación es un proceso controlado genéticamente, ha de ser por:

- a) Necesidad celular, ya que la célula es - la unidad biológica de manifestación genética.
- b) Necesidad ontogénica, y no filogénica, - pues no poseemos elementos de experien--cia suficientes para afirmar que dos especies diferentes tengan un determinado número de genes absolutamente iguales u homólogos que influyan en la diferencia--ción de una misma estirpe celular;
- c) Necesidad fisiológica, ya que una dife--renciación patológica exige la presencia de elementos ajenos al genoma.

Esta última condición, sin embargo, se - refiere a elementos introducidos en el - curso de la diferenciación una vez iniciada, esto es, a la manifestación anormal de un gen o genes, sin que pretendamos re

ferirnos a la manifestación de un gen --  
anormal o mutante que si bien desde un --  
punto de vista clínico el médico puede --  
considerarla enfermedad, como biólogo ha  
de ver en ello una mera anomalía.

Llegamos de esta manera a redefinir la diferenciación --  
como el proceso de transformación celular que ocurre en el de  
sarrollo entogénico normal y que está genéticamente determinado  
do.

Aún hemos de confrontar el concepto de "diferenciación"  
con los otros dos procesos entogénicos fundamentales: La mor-  
fogénesis y el crecimiento.

¿Son en realidad procesos diferentes?. Esta es una cuesti  
ción largamente debatida desde hace mucho tiempo por los bió-  
logos del desarrollo. Morfogénesis es, según indica su etimo-  
logía, la génesis de la forma. La forma del individuo es la inte  
gración armónica de las formas de sus órganos, y los órgano  
nos son complejos multicelulares.

De esta manera reconocemos en la forma, grados diversos  
de complejidad. El grado mínimo sería la forma celular; suce-  
sivamente, le seguirían el tejido, el órgano y el individuo.

Dejándonos llevar por esta concepción en gradiente, según la intensidad de la integración alcanzada, veríamos que entre morfogénesis y diferenciación sólo existiría una diferencia cuantitativa. Si morfogénesis es el origen de la forma de tejidos, órganos e individuo, diferenciación sería la génesis de la forma celular. Naturalmente, esto no es cierto. La morfogénesis a nivel celular es sólo un aspecto de la diferenciación. Esta exige, además, cambios funcionales, bioquímicos, inmunológicos, etc., no siempre detectables por el simple análisis morfológico, como se detecta una morfogénesis.

Cuestión aparte es la interdependencia de estos procesos, que la diferenciación sea condición previa para la morfogénesis o viceversa, son hechos que abundan en la experiencia embriológica. Ello no obsta para que se trate de dos procesos totalmente diferentes. La forma de un órgano no es más que éso; la diferenciación de la célula, por el contrario, introduce el término "función" en el desarrollo ontogénico; y la función representa un grado de complejidad diferente.

La independencia de estos dos procesos enunciados hasta aquí con el crecimiento es bien notoria. Una célula diferenciada puede crecer o no, sin alterar, su proceso diferenciativo; o un órgano puede hacerlo sin alterar para nada su patrón morfológico.

No obstante, debe quedar claro que los tres procesos mencionados se separan meramente a efectos de estudio; en la discusión previa no hemos pretendido preconcebir que sus causas y mecanismos íntimos sean radicalmente diferentes. La separación es algo, pues, que tiene un poco de verdad y otro poco de arbitrariedad. La unidad absoluta del individuo debe quedar siempre por encima de todas estas consideraciones.

Tras estas conceptuación previa, vamos a abordar el problema de la diferenciación desde dentro.

Ya en el detallado análisis que VON BAER hizo en el siglo pasado del desarrollo del embrión de pollo (VON BAER, 1832) (3), nos encontramos con claras alusiones al fenómeno de la diferenciación. Efectivamente, dicho autor sienta los conceptos de las tres hojas germinales y de la diferenciación de sus células. Los detallados análisis posteriores, referidos a los clásicos animales de experimentación en Embriología (pollo, tritón, salamandra, erizo de mar), así como al hombre, no hacen más que generalizar este concepto, viéndose acelerado dicho proceso por el gran auge que a fin de siglo tomó la Histología. Buena prueba de ello es la monumental "Histogénesis -- del Sistema Nervioso en el hombre y en los vertebrados" de RAMON Y CAJAL (1899) (49).

Las décadas siguientes ven la aparición de dos nuevos -

cuerpos de doctrina sobre los que se fundamentan nuestros actuales conceptos del problema. En primer lugar, la teoría genética que, propuesta por MENDEL (42) y por otra parte, el desarrollo de la Embriología Experimental a partir de H. SPEMANN (1938) (57).

Veamos por separado qué importan ambas para la discusión del fenómeno que nos ocupa.

La teoría genética mendeliana propone que los caracteres heredados se deben a la presencia en las células del organismo de unos factores llamados genes, que pasan a la descendencia según unas determinadas leyes, que en conjunto vienen a significar que:

- a) Estos factores son independientes unos de otros, al menos en principio.
- b) El número de genes que posee una especie viva es constante para la misma, recibiendo cada individuo una mitad del número total por parte de cada uno de sus dos progenitores.
- c) El conjunto de genes de un individuo se llama genotipo, mientras que el conjunto de caracteres somáticos morfológicos, bioquímicos, inmunológicos, etc., se conoce como fenotipo. El fenotipo se produciría a --

partir de la acción conjugada del genotipo y del ambiente.

- d) Los genes están materialmente reunidos en varios grupos, conocidos como grupos de ligamiento. Dentro de cada uno, los genes están agrupados linealmente. Estos grupos de ligamiento radican en las estructuras celulares llamadas cromosomas.

La primera cuestión nacida de la teoría genética clásica con respecto a la diferenciación es obvia: dos células del mismo individuo, pero diferenciadas en sentido distinto, ¿poseen los mismos genes?; la respuesta de la moderna Biología es que por todos los individuos, parece que sí. De aquí podría desprenderse que la diferenciación, pues, no estaría genéticamente determinada, ya que de célula a célula no varía la carga genética; esto nos llevaría al absurdo de admitir que ninguno de nuestros caracteres somáticos es heredado. La salida a este último dilema consiste en suponer que, en dos células del mismo individuo, de diferenciación desigual, lo que ocurre es que difieren en la cantidad y clase de genes que están activos en un momento dado. Hemos de admitir que esta diferencia, a su vez, está también genéticamente controlada. Los modernos estudios genéticos realizados en microorganismos, tales como la teoría de la inducción enzimática, parecen confirmar brillantemente estas ideas y no faltan ejemplos relativos

a organismos superiores, que tendremos ocasión de tratar.

Así las cosas, parece evidente que la diferenciación se realiza gracias a la actividad genética "Diferencial" de unas células con respecto a otras. Pero el ¿cómo? sigue siendo una pregunta fundamental de la biología moderna del desarrollo, y aunque parece en vías de solución, hemos de reconocer que la respuesta está aún envuelta en la mayor oscuridad.

Siendo este concepto de "actividad genética diferencial" la aportación de la Genética clásica al conocimiento de los mecanismos del desarrollo, veamos seguidamente la evolución de la Embriología experimental.

Las experiencias de SPEMANN sobre huevos de anfibios -- (SPEMANN, 1938) (57) permitieron conocer los mecanismos básicos de interacción entre las partes del animal en desarrollo. Este investigador sintetizó sus experiencias en los conceptos de inducción y organización embrionaria, sentando así las bases para la comprensión causal del fenómeno diferenciativo.

En consecuencia, la idea de que la actividad de los genes causara el fenómeno de la inducción embrionaria surgió rápidamente. Un grupo de investigadores; entre ellos: HOLTSFETER (1935) (24) y WADDINGTON (1936) (64), etc., empezó a trabajar en la búsqueda de "sustancias inductoras" a las que se pu



diera atribuir un efecto de tal clase. Esta búsqueda no iba del todo de acuerdo con el parecer de SPEMANN (1.938) (57) - cuyo vitalismo, como señala WADINGTON, se oponía a la idea de un tal "atomismo ontogénico" (WADINGTON, 1961) (62).

En principio no pareció encontrarse nada positivo en dicho camino; este último autor refiere que incluso el azul de metileno se le encontraron propiedades inductoras. No obstante, se fue acumulando evidencia sobre la naturaleza química o molecular del inductor. El problema continúa en pie hoy, y a decir verdad, un tanto más complejo.

Lo que estas dos tendencias de investigación han rendido a la biología del desarrollo, podría de manera aforística resumirse así: "La diferenciación embrionaria es un proceso - producido por la actividad diferencial de los genes; ésta está regida por influencias físico químicas a su vez genéticamente preformadas".

Con estas ideas se llega a la "edad contemporánea" de la Biología del desarrollo. Esta fase está caracterizada por una serie de líneas concretas de investigación: estructura — primaria del gen, estructura molecular de las proteínas, actividad primaria del gen, organización de la misma, y más recientemente, regulación de la misma. Todas estas líneas poseen en

común el carácter de analizar, observar y experimentar el comportamiento de las macromoléculas biológicas, y de ahí que su conjunto sea hoy conocido con el nombre de "Biología molecu--lar".

Fue el trascendental descubrimiento sobre la naturaleza del principio transformador del neumococo, que resultó ser el DNA, el que abrió camino a las citadas líneas de investigación. Mencionaremos a continuación algunos de los pasos más --notorios que se han dado en estos últimos años:

En primer lugar, la hipótesis de algunos autores sobre la relación entre RNA y síntesis de proteína, brillantemente confirmada por experimentos "in vitro" con posterioridad; la elucidación de la estructura del DNA por WATSON (1965) (66), la investigación exhaustiva sobre la estructura proteica primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria llevada a cabo por INGRAN (1963) (30), PERUTZ (1962) (46), etc., centrando de un modo particular su investigación sobre las hemoglobinas y la mioglobina; el reconocimiento de tres especies molecular y --funcionalmente diferentes de RNA; el "Código Genético", por --los equipos de KORNBERG (1965) (34) y NIREMBERG (1963) (43); la genética del bacteriófago BENZER (1966) (6); la genética de E.coli; el modelo operon de JACOB y MONOD (1959) (31) y otros muchos que hacen que entre los biólogos actuales exista una --especie de optimismo "molecular" análogo al optimismo bacte--riológico de principio de siglo (WATSON, 1965) (66).

Lo cierto es que estas cadenas ininterrumpidas de descubrimientos han hecho que el fenómeno de la diferenciación se vea hoy con una mayor profundidad y precisión que en épocas anteriores. Trataremos de compendiarlo en el capítulo siguiente.

## PARTE II. EL CONCEPTO ACTUAL DE DIFERENCIACION

El estudio comparativo de los tejidos vivos se ha venido haciendo clásicamente según cuatro diferentes puntos de vista: morfológico, bioquímico, inmunológico y funcional. Estas cuatro aproximaciones han hecho que hoy día se disponga de una gran cantidad de datos sobre la biología comparada de los diversos tejidos, lo cual hemos visto que es una consecuencia del proceso diferenciativo de sus células.

Pero existe paralelamente un cúmulo de evidencia a favor de que estas cuatro "manifestaciones" de la vida de la célula: forma, función, antigenicidad y metabolismo, puede reducirse a una sola: todas ellas serían consecuencia de la actividad biológica de las proteínas que la célula sintetizara. Naturalmente, no todos los procesos vivos pueden hoy explicarse en esos términos; lo que ocurre es que precisamente aquellos que hoy se conocen con mayor profundidad, tienen su explicación en la intervención de proteínas de manera decisiva y específica.

Discutiremos ahora desde dicho punto de vista la determinación de la forma, metabolismo e inmunología de la célula viva.

A) GENESIS DE LA FORMA CELULAR.-

La forma celular es naturalmente algo más que la suma de las formas de sus orgánulos. Posiblemente, la forma de una célula aislada estén parte determinada por la disposición general de su retículo endoplásmico, y dentro de él, de los orgánulos celulares. Ahora bien, el medio ambiente de la célula --medio interno de los animales superiores-- ha de suponerse -- que ejerce una influencia decisiva sobre la forma celular "in vivo". Por otra parte, una célula dada, en un tejido posee una morfología, determinada en gran parte por la de las células adyacentes. Esto hace que nos veamos obligados a admitir una -- cierta "reactividad" de la superficie celular respecto a lo que la rodea.

A algunos agregados artificiales de células, que carecen de un patrón morfogénético, hacen que sus elementos adopten -- hasta cierto punto una forma aleatoria, únicamente determinada por fuerzas fisico-químicas tales como viscosidad, carga eléctrica, tensión superficial, etc., que bien pueden encontrarse también en la célula muerta. Estos agregados "aleatorios" adoptan una configuración semejante a la de las espumas (HEILBRUNN, 1956) (23).

En otras ocasiones, el agregado artificial se dispone según un patrón morfogenético más ordenado, y entonces se reconoce que un elemento específicamente "vivo" toma parte en el proceso.

Podría en algunos casos tratarse de la formación de desmosomas; en otros, de una "anisotropía" hipotética de la superficie celular; en otros casos se postula una reactividad de tipo inmunológico. Todos estos mecanismos propuestos, y muchos otros no citados, poseen en común el que postulan siempre una "reactividad" hipotética de la superficie celular, explicable posiblemente en términos de actividad macromolecular: proteínas y lipoproteínas superficiales y enzimas en el interior de la célula. Con todo, la determinación de la forma celular en conjunto, es un problema demasiado complejo como para ser simplificado hasta ese extremo. Ya citamos arriba que pueden influir la disposición general del retículo endoplásmico y de los orgánulos, la polarización funcional de la célula como -- por ejemplo, en los epitelios secretores con su polo vascular y su polo funcional, y la existencia y disposición de los estromas, etc....

No obstante, el más profundo conocimiento que hoy se -- tiene sobre otros problemas morfogenéticos más simple hace -- que la teoría macromolecular de la determinación de la forma pueda ser hoy considerada como una hipótesis de trabajo muy aceptable.

A un nivel de complejidad inferior, nos encontramos el problema de la determinación estructural de los orgánulos celulares. En éstos, la naturaleza macromolecular "salta a la vista". Las técnicas de ultracentrifugación preparativa, que más adelante detallaremos, han permitido disponer de cantidades razonables de estos orgánulos, con un apreciable grado de integridad y homogeneidad.

De esta manera se ha llegado a conocer la estructura íntima de las mitocondrias, del retículo endoplásmico, de los ribosomas, de los lisosomas y complejo de Golgi, de los coroplastos, etc. En todos estos estudios se ha demostrado que el armazón de estos orgánulos es de naturaleza proteica; es más, estudios inmunológicos realizados sobre estas bases han permitido detectar antígenos proteicos cuyos antisueros presentan reacción cruzada con los homólogos de otras especies, lo que indica un patrón común de construcción, que veremos más adelante y que en biología moderna se considera como un patrón común de información (WADDINGTON, 1962) (63).

No obstante, no podemos ver todavía las macromoléculas proteicas como las determinantes integrales de la forma; las podemos ver como "causa material", pero no como "causa eficiente". No podemos afirmar que la estructura de un número limitado de proteínas pueda determinar la de un complejo macro-

molecular; por tanto, tenemos que suponer la existencia de mecanismos reguladores que dirijan el proceso de construcción de estos orgánulos a partir de sus proteínas estructurales.

La morfogénesis de las formas de vida más simples es más accesible al estudio causal. Así, en el virus del mosaico del tabaco (VMT), ha sido analizada extensamente la proteína de cubierta, llegándose a la conclusión de que su síntesis está dirigida por un solo gen (CASPAR, 1963) (10). Aislada es ta proteína, y reagregada bajo determinadas condiciones, en ausencia del principio infectante, RNA, adopta espontáneamente formas bacilares completamente indistinguibles del virus infectivo. Esto significa que en la estructura de la proteína de cubierta va contenida toda la información necesaria para la construcción de la forma viral. Este hecho, en términos virológicos, se expresa diciendo que el VMT posee una morfopoyesis de primer orden. (KELLENBERGER, 1966) (33).

De igual manera, diversos adenovirus poseen una forma icosaédrica que al parecer está informada únicamente por dos tipos de proteínas (HORNE y col., 1959) (25), una con sime---tría senaria y otra con simetría quinaría. Ahora bien, en este caso la cuestión debe ser más compleja, pues sus proteínas no se reagregan en icosaedros una vez aisladas, lo cual significa que la formación de la partícula viral, además de la in-



formación vehiculada por ambas proteínas, requiere información adicional de tipo regulador. Por ello los adenovirus serían morfopoyéticos de segundo orden.

Donde este segundo orden esta claro, es sin duda en los bacteriófagos de la serie T-par, y concretamente, en el T-4. La morfología de estos virus es más compleja= constan de una cabeza en forma de icosaedro prolado, una cela en forma cilíndrica y una placa de base situada en el extremo base de la cola o extremo libre, en cuya periferia se insertan una serie de filamentos.

Los estudios genéticos en este fago (WOOD y EDGAR,1967) (67) permiten reconocer un tipo fundamental de morfogénesis - para cada una de estas estructuras; se pueden conseguir mutantes sin filamentos, etc., lo cual reduce a un primer orden la morfogénesis aislada de estas estructuras. Pero también existen mutantes que, siendo capaces de sintetizar las estructuras citadas, fracasan en la agrupación de todas ellas para formar una partícula vírica normal. Esto nos lleva a la conclusión - de que en el virus salvaje tiene que existir una información referente al modo de agregación de las estructuras virales. Además, la información requerida ha de ser múltiple, no única, pues estos mutantes se pueden producir actuando sobre ~~diver~~

Los locis del genoma del bacteriófago. Hasta el presente se conocen más de 20 genes encargados del proceso morfogenético del bacteriófago, y su lugar en el cromosoma del mismo está perfectamente determinado por experimentos de recombinación. Pensemos ahora que si se necesita este respetable acúmulo de información para la morfogénesis de uno de los seres vivos más simples, es lógico pensar que para una complicada célula de mamífero se necesitará mucho más, y de un orden morfopoyético muy alto. Esto no excluye que la información requerida pueda ir en forma de proteínas, pero su estudio se hace lógicamente mucho más complejo.

Resumiendo, podemos decir que la forma de la célula está determinada por serie de informaciones a diversos niveles de complejidad.

La actual doctrina de la actividad genética dice que toda información necesaria para un ser vivo está expresada en forma de una secuencia de nucleótidos de su DNA, y que por intermedio del RNA se manifiesta en forma de proteínas (WATSON, 1965) (66). Pero la aplicación de este esquema a los problemas de la morfogénesis celular dista aún mucho de estar perfectamente establecida. Como dijimos más arriba, puede considerarse como una hipótesis de trabajo, pero nada más.

B) BIOQUIMICA DE LA DIFERENCIACION CELULAR.-

La oscuridad que hemos visto extenderse en el terreno - de la determinación de la forma, no lo hace, afortunadamente, en lo que a la bioquímica celular se refiere. Aun cuando muchas pautas metabólicas permanecen sin esclarecer, una gran - mayoría de las mismas se conocen incluso hasta el nivel de la cinética química de sus reacciones en particular. Este espectacular avance de la bioquímica ha tenido para el biólogo del desarrollo, interés primordial en los siguientes aspectos:

- a.- Metabolismo celular y enzimología.
- b.- Estructura y configuración de las proteínas.
- c.- Estructura y configuración de los ácidos nucleicos.
- d.- Dinámica de la síntesis proteica y función biológica de los ácidos nucleicos.

Desde un principio se le ha dado a la célula diferencia da determinadas propiedades bioquímicas que la distinguen de otros tipos celulares. Así, las células de la serie eritropoyética son capaces de sintetizar hemoglobina, mientras que -- las células beta del páncreas pueden producir insulina. De es ta manera se observa cómo las células diferenciadas se distin guen por los productos de su actividad, lo cual corresponde, de manera general, a diferencias metabólicas.

Existe actualmente una gran cantidad de datos sobre estas diferencias entre tejido y tejido (WAGNER y MITCHELL, 1964) (65). Es por lo tanto un rasgo típico de la diferenciación celular la adaptación del metabolismo a las necesidades de esa misma diferenciación; el control bioquímico del metabolismo - tendrá un papel decisivo, pues, en la determinación de ésta.

La actividad metabólica celular está dirigida por los - enzimas, y la naturaleza de éstos es proteínica. Quizá la primera relación trascendente entre la genética y la bioquímica celular fue la hipótesis "un gen, un enzima" de BEADLE (BEADLE y TANTUM, 1941) (5). Esta teoría pretende que el producto de la actividad de un gen es una proteína con actividad enzimática y con un determinado papel en el metabolismo celular.

A esta hipótesis se llegó por vía de diversos hechos; por ejemplo, la variación del color de determinadas plantas, debida a la presencia o ausencia de ciertas antocianinas, es debida a la presencia o ausencia de síntesis por parte de sus correspondientes enzimas (LAWRENCE, 1950) (35); también, el estudio de mutantes efectivos en bacterias, que requerían para su crecimiento metabolitos que no podían sintetizar para su crecimiento por carecer de los enzimas correspondientes; y entre otros muchos, quizá haya sido el más importante el conocimiento de los errores innatos del metabolismo en el hombre, que, comenzando por GARROD (GARROD, 1923) (18), el cual sostu-

vo al respecto unas hipótesis verdaderamente precursoras, ha culminado en determinar, casi para todos ellos, cuál es la "lesión bioquímica" fundamental, que siempre resulta ser un defecto enzimático.

Este acúmulo de evidencia venía a poner de manifiesto -- que el control del metabolismo es ejercido por el genoma a -- través de la síntesis de enzimas; por tanto, si entre las células del organismo adulto existen diferencias metabólicas según sea su diferenciación, la hipótesis más simple es pensar que sus genomas, en principios exactamente iguales, "funcionan" de manera distinta, de acuerdo con la diferenciación que ha seguido cada una de ellas.

La hipótesis "un gen, un enzima" ha sido brillantemente superada, pero no rebatida. Decimos superada porque se ha generalizado a los términos "un gen, una proteína, con o sin actividad enzimática". Otra vez aquí la genética humana ha tenido un importante papel, y precisamente en el estudio de la estructura, configuración y mutantes de las hemoglobinas, así -- como el estudio genético de las hemoglobinopatías. Por primera vez quedó demostrado que la síntesis de una proteína estructural, no enzimática, está genéticamente determinada (INGRAN, 1963) (30).

En el camino inverso, los estudios realizados sobre mecanismo y dinámica de la síntesis proteica han confirmado brillantemente dicha generalización.

Queda claro, pues, que el proceso diferenciativo, en el terreno bioquímico, que aparece según diferencias metabólicas, puede expresarse en términos de "síntesis diferencial de proteínas causada por afectividad diferencial de los genes" (WATSON, 1965) (66).

Como más adelante veremos, la regulación y el control de la actividad genética puede dar una base explicativa al fenómeno de actividad diferencial de los genes en el proceso ontogénico.

Queda en pie ahora una importante cuestión, que es la naturaleza química de los inductores. Por ahora no se le ha encontrado solución; se expresan hipótesis diversas, y la más generalizada dice que probablemente se trate de un RNA mensajero (m-RNA) (WADDINGTON, 1962) (63).

En resumen, la diferenciación bioquímica, y por tanto, la funcional, está ligada a la síntesis selectiva de algunas enzimas y proteínas, y a la represión de la síntesis de otras macromoléculas.

C) INMUNOLOGIA DE LA DIFERENCIACION.

La metodología inmunológica es hoy día uno de los instrumentos más precisos para el conocimiento de la diferenciación. En el curso de la ontogénesis, las células van creando sucesivamente sus antígenos estructurales (CLAYTON, 1954) (12); (VAN DOORENMAALEN, 1964) (15).

Pero parte de las aplicaciones técnicas, el desarrollo inmunológico de las células ofrece unas particularidades que no pueden ser pasadas por alto en un estudio de la diferenciación.

La teoría de la selección clonal de BURNET (BURNET, 1959), afirma que en el período ontogénico hacen su aparición aquellos antígenos propios a los cuales el organismo adulto habrá de ser inmunotolerante. Por ello, al estudiar la diferenciación se hace preciso el conocimiento exacto de los antígenos de las diversas clonas celulares, con lo cual se tendrá una idea de la significación y singularidad biológica de la célula en estudio.

El desarrollo antigénico de la célula puede también expresarse en términos de actividad genética. Que las cualidades antigénicas de una célula son heredadas, está fuera de toda discusión. El ejemplo de los grupos sanguíneos de los hematíes es, aparte de otros muchos, uno de los más significativos.

Pero hay que hacer la salvedad de que los términos "antígeno" y "proteína" no son sinónimos. Una proteína posee -- por lo general calidad antigénica, que puede ser única o múltiple, según sea la cantidad de determinantes antigénicos que posea su molécula. Pero es un hecho bien conocido que determinadas sustancias poseen también esa propiedad sin ser proteína. Nos referimos concretamente a los polisacáridos, a los lípidos complejos y a aquellas moléculas pequeñas conocidas como "haptenos", sin exceptuar los ácidos nucleicos.

No obstante, todos ellos, aparte de los haptenos artificiales, no son sino productos del metabolismo de la célula, y por tanto, de su actividad enzimática o sintetizadora de proteínas; en su determinismo entran, pues, las macromoléculas proteicas sintetizadas por el sistema genético. Por ello, el desarrollo antigénico de la célula se haría conforme a los mismos o parecidos mecanismos que la diferenciación metabólica.

Hemos visto hasta ahora como puede explicarse la diferenciación como una actividad genética controlada y dirigida. Conviene ahora discutir de qué manera puede ejercerse este -- control.

Un buen ejemplo de control genético ontogénico, es sin duda la evolución embrionaria de la síntesis de hemoglobina.



Esta proteína, como se sabe, consta de cuatro subunidades -- iguales dos a dos. Según la naturaleza de estos dos tipos de subunidades, tendremos los diversos tipos de hemoglobina. Hasta ahora se consideran normales las hemoglobinas HbA, HbA<sub>2</sub> y HbF, y según parece, dos tipos de proteína embrionaria conocidas como Hb Gewers 1 y Hb Gewers 2. La constitución de la HbA, es alfa<sub>2</sub> beta<sub>2</sub>, lo cual significa que posee dos cadenas alfa y dos cadenas beta en su molécula.

La de la HbA<sub>2</sub> es alfa<sub>2</sub> delta<sub>2</sub>, y la de la HbF es alfa<sub>2</sub> gamma<sub>2</sub>.

El estudio de los diversos mutantes encontrados en la clínica humana indica que existe un gen para cada tipo de cadena (INGRAN) (1963) (30). Durante la vida embrionaria predominan o existen los tipos Gewers, durante la fetal, la supremacía corresponde a la HbF. Desde el momento del nacimiento se va haciendo más abundante la HbA, hasta que pronto reemplaza por completo a la F. Esto indica que en un momento dado el gen Hb gamma deja paulatinamente de actuar, y al mismo tiempo empieza la actividad del gen Hb<sup>beta</sup>. En una hemoglobinopatía humana, la talasemia beta, dicho gen es incapaz de sintetizar la cadena correspondiente. En consecuencia, el organismo continúa la síntesis de cadenas gammas para formar HbF, que persiste a todo lo largo de la vida del individuo. Este ejemplo expuesto indica la existencia de un mecanismo de control sobre la síntesis

sis de las subunidades hemoglobínicas. La naturaleza y puesta en marcha de este mecanismo no se conoce aún.

En el *E. coli* JACOB Y MONOD han señalado la existencia de un mecanismo de regulación genética para los enzimas encargados del metabolismo de la lactosa (JACOB y MONOD, (1.959) (31). En primer lugar, los experimentos de recombinación genética indicaron que los tres genes implicados en el metabolismo de la lactosa que eran:

- Galactosido-permeasa
- Beta-galactosidasa y
- Transacetilasa,

son adyacentes al cromosoma. En medio de cultivos desprovistos de lactosa, la producción de estos enzimas es mínima, del orden de cinco a diez moléculas de enzima por célula. La adición de lactosa al medio hace que la producción se incremente varios miles de veces.

Este hecho se expresa diciendo que los tres enzimas considerados son "adaptativos", es decir, su producción es facultativa con respecto a la presencia o ausencia de lactosa, que obra como un inductor. El término "adaptativo" se opone a "constitutivo", que está reservado a aquellos enzimas que pueden ser sintetizados independientemente de la presencia o ausencia

cia de su sustrato.

Posteriormente fue aislado un mutante de E.coli que representaba la particularidad de que en él la producción de -- los enzimas del metabolismo de la lactosa era constitutiva.

El análisis genético fino de este mutante, que fue uno de los logros más brillantes de tipo experimental a nivel de la biología molecular, demostró que tal "mutante" era en realidad una desaparición (delección) de la región inmediatamente adyacente a los genes considerados. De tal hecho se dedujo que esa región era fundamental para regular el funcionamiento de los tres genes. Desde entonces se conoce con el nombre de "operador", y el conjunto del operador y los tres genes es -- por él dirigidos, como "operon". Los tres genes encargados de la síntesis de enzima se les conoce también como "genes estructurales".

Se planteaba a continuación el problema de la naturaleza de los agentes que regulaban la actividad del operador. Esto -- fue solucionado por el aislamiento de nuevos mutantes. Uno de ellos hacía que la síntesis de enzima no obedeciera al influjo inductor de ninguna manera, lo cual significaba que las células eran completamente incapaces de sintetizar enzima, y recibió el nombre de "super-reprimido". El lugar de esta mutación estaba muy alejado en el mapa cromosómico del "operon" donde actuaba, el cual, por otra parte, era perfectamente normal. Otro mutante importante era un constitutivo sin delección ni mutación en el locus operador, y en el que la alteración radicaba en el mismo lugar que la mutación descrita anteriormente. A este gen

se le conoció con el nombre de "regulador" del operon, de tal manera que sintetizaría una molécula tal que al combinarse -- con el operador bloquearía la actividad de los estructurales. El producto de la actividad del regulador se conoce con el nombre de "represor".

Si el represor entra en contacto con la molécula inductora, en este caso la lactosa, su configuración estérica queda alterada de tal manera que no puede combinarse con el operador, bloqueando la actividad de los estructurales.

Este modelo de regulación genética ha sido comprobado en otros muchos grupos de genes en los microorganismos, y al parecer es aplicable a muchísimos más.

Naturalmente, decir que este esquema es válido en las células de organismos superiores es ya más discutible y hasta el presente no comprobado. No obstante, se hace enormemente sugestivo cuando consideramos la regulación por servomecanismo (feedback) de las secreciones endocrinas, digestivas, etc.: y pasando al terreno que nos ocupa, la inducción embrionaria podría tener lugar gracias a un mecanismo parecido.

Queda por señalar que dentro del contexto de la teoría de la actividad genética selectiva como mecanismo de la diferenciación, poseemos una cierta evidencia morfológica y en or-

ganismos superiores. En las glándulas salivares existen, en los dípteros, cromosomas gigantes formados por miles de filamentos de DNA, que reciben el nombre de cromosomas politónicos. Cuando una cierta zona de éstos entran en actividad aparecen en la misma una serie de expansiones conocidas con el nombre inglés de "puffa". Que estos "puffa" son los lugares de más activa transcripción de DNA a RNA queda demostrado desde el momento en que son la zona de más activa incorporación de uridina triratiada. En el momento y en el lugar en que aparecen un puff se evidencia por autorradiografía una activísima incorporación del precursor radioactivo.

En el desarrollo embrionario de estos animales se observa la aparición y desaparición de determinados puff específicos de cada momento del desarrollo, y siguiendo un patrón fijo para todos los animales de una misma especie. Esto viene a poner de manifiesto que existe una actividad genética de cada momento del desarrollo.

Hemos visto hasta aquí, pues, con qué se cuenta hoy día para explicar el fenómeno de la diferenciación.

Mejor dicho, qué ideas nos guían en nuestra aproximación al problema, ya que muchas de ellas se pasan de meras hipótesis.

PARTE III. ESTUDIO DE UN SISTEMA BIOLÓGICO EN  
DIFERENCIACION: EL CRISTALINO.  
ESTADO ACTUAL Y PROPOSITOS.

La elección de un sistema biológico para realizar un estudio sobre la diferenciación celular es una cuestión de gran importancia. No todas las líneas de diferenciación celular que observamos en el organismo son adecuadas para ser estudiadas con un criterio epigenético. Por otra parte, la mayoría de los sistemas "aptos" presentan a su vez dificultades particulares de cada caso.

Supongamos, por ejemplo, los tejidos llamados "lábilés"; médula ósea roja, epidermis y elementos nobles de las líneas germinales. En principio, estos tres sistemas son idóneos como ninguno para un estudio de este tipo. Su ciclo diferenciativo es muy corto, se da en el animal adulto y además tenemos en un momento dado todos los representantes de la estirpe. Ahora -- bien: la médula ósea, por ejemplo, presenta una heterogeneidad celular tal que hace muy difícil el aislamiento de tipos celulares "puros" o estirpes celulares. Por otra parte, su íntima relación con la sangre dificulta el análisis bioquímico de cada serie, ya que abundan los elementos sanguíneos contaminantes.

En la epidermis no encontramos esta heterogeneidad así como tampoco hay contaminación sanguínea; pero resulta casi imposible separar los distintos grados de diferenciación celular para someterlos a un análisis por separado. Y casi lo mismo puede decirse de las líneas gametogénicas.

Un sistema que sorprendentemente carece de estos inconvenientes es el cristalino del ojo. Su peculiarísima situación permite obviar estas desventajas.

- A) En primer lugar, es un cultivo puro de células. Todas ellas pertenecen a la misma línea diferenciativa que va desde la célula cúbica ectodérmica e indiferenciada (célula epitelial), a través de una serie de esta dos intermedios sistematizables, hasta una fibra celular anucleada que representa el máximo grado de diferenciación de la serie. En su desarrollo no recibe elementos celulares extraños; todos los que tienen derivan de la primitiva placoda cristalina.
- B) El cristalino no posee vascularización. Su nutrición se realiza a través del humor acuoso, siendo el epitelio cristalino una típica membrana de transporte activo. Su metabolismo

es, contrariamente a lo que se cree, muy intenso, y a nivel del mismo epitelio, SIPPEL refiere datos que van a favor de suponer un intenso metabolismo oxidativo. (SIPPEL, 1965) (53).

- C) El proceso de diferenciación del cristalino es muy parecido en todos los vertebrados, facilitándose así el estudio experimental.
- D) El estudio de este órgano es en general de gran interés, puesto que posee cualidades realmente singulares:
- I) Con respecto al contenido proteico por unidad de peso fresco, es el órgano de mayor concentración del organismo; en nuestro laboratorio hemos conseguido cifras que oscilan entre los 150 y los 300 mg. de proteína por gramo de tejido fresco.
- II) Desde el punto de vista inmunológico es de notar que su antigenicidad es completamente organoespecífica (UNLENHUTH, 1903) (60); hay antígenos propios de cristalino, individuales. Presentan reacción cruzada todos los cristali-



nos de vertebrado, y es antigénico para el propio individuo. Esto significa que las células cristaliniánas constituyen un "clon prohibido" para el propio individuo.

Este hecho no es exclusivo del cristalino, pues otros tejidos oculares presentan también antígenos organoespecíficos. Estos existen particularmente en la córnea y en la uvea anterior; - precisamente en ésta se da una enfermedad, la oftalmía simpática, una de cuyas múltiples teorías patogénicas postula un mecanismo de sensibilización del organismo frente a sus propios antígenos oculares (DUKE-ELDER, 1947) (16).

Creemos, pues, que el cristalino es un órgano ideal para realizar un estudio sobre la diferenciación, y nos lo hemos planteado en los siguientes términos: determinar si existen diferencias bioquímicas correlativas a la diferenciación morfológica del órgano. Al propio tiempo, obtener datos relativos al envejecimiento de dicho órgano.

Vamos a continuación a describir someramente el desarrollo y la secuencia de diferenciación morfológica en el pollo, - que es el animal de experimentación en el que vamos a realizar nuestro estudio.

### A) DESARROLLO DEL CRISTALINO

El cristalino nace de una inducción que la vesícula óptica realiza sobre el ectoblasto. En estadios muy precoces del desarrollo, las vésiculas ópticas se destacan lateralmente del prosencéfalo y entran en contacto con el ectoblasto cefálico. Este contacto es al parecer necesario para la producción del cristalino, según ha demostrado Mc KEEHAN, y depende de reacciones químicas que se establecen entre superficies inductora y reactante (Mc KEEHAN, 1951) (40). Estas reacciones producirían un reagrupamiento o síntesis de macromoléculas -- que hace que las células del ectoblasto inducido adopten la -- configuración morfológica de placoda.

La mayor parte del ectoblasto en el embrión precoz posee capacidad para producir cristalino bajo la influencia inductora de la retina; no obstante, esta capacidad se va perdiendo a medida que avanza el desarrollo. A partir de la edad de ocho somitos, el ectoblasto truncal ya no lo produce; el dorso pierde su capacidad a los 11 somitos; el ectoblasto cefálico y la región presuntiva corneal lo conservan hasta el cuarto o quinto día de incubación, (WADDINGTON y COHEN) (1936) (64).

Por su parte, la retina posee capacidad inductora desde el período presomítico hasta el estadio de 31 somitos, estando presente esta capacidad tanto en la capa sensorial como

en la pigmentaria.

La placoda cristaliniana, de acuerdo con ROMANOFF, 1960) (51), se produce mediante un aumento de la densidad celular - en la región inducida más que un verdadero aumento del número de células. En esta región se asiste a una elongación del -- cuerpo celular y del núcleo, así como una estratificación de éstos; todo ello hace que el conjunto adopte una configuración parecida a la de un epitelio pseudoestratificado. La formación de la placoda óptica se realiza en edades comprendidas entre 10 y 20 somitos.

Cuando el embrión posee de 20 a 25 somitos comienza una invaginación simultánea de la vesícula óptica y de la placoda cristaliniana; hasta qué punto son interdependiente ambos procesos no se conoce con exactitud. De esta manera la placoda - cristaliniana pasa a ser vesícula cristaliniana. El orificio por el que comunica con el exterior se cierra a los 35 ó 36 somitos (62-74 h).

El cristalino va tomando la forma de una bolsa celular hueca aplanada ligeramente en sentido lateral, por lo que en lo sucesivo distinguiremos en ella dos paredes: medial y lateral.

A medida que progresa la invaginación del cristalino, la pared medial se va haciendo más gruesa, por aumento del nú

mero de células y elongación de las mismas, proyectándose hacia de la cavidad cristaliniana, hasta que la llega a obliterar. Los núcleos de las células elongadas forman una línea -- situada a medio camino entre los bordes de la pared medial. La superficie más profunda de ésta se va aplanando progresivamente.

Las células de la pared medial van haciéndose cada -- vez más fibrosas, y hacia el cuarto día de incubación han -- llenado completamente la luz de la cavidad cristaliniana.

En este punto el cristalino no tiene ya forma esférica, siendo su diámetro ecuatorial unas dos veces mayor que -- el axial (ROMANOFF, 1960) (51).

Las fibras (células) de la pared medial adoptan al -- principio un empaquetamiento hexagonal al corte transversal, posteriormente van adquiriendo una configuración en "hojas -- de cebolla" y el empaquetamiento pasa a ser cuadrangular. Es -- te proceso comienza en la periferia y continúa hacia el centro. (RABL, 1889). (48).

La pared lateral conserva su grosor inicial, siendo -- por tanto un epitelio cúbico monoestratificado. No obstante, el grosor aumenta a nivel de la zona ecuatorial ("annular pad" de los anglosajones). En la porción más gruesa de ésta, los núcleos se disponen en dos filas, mientras que el resto del

epitelio sólo posee una.

Los núcleos de la porción más central del órgano (núcleo lenticular), comienzan a degenerar hacia el octavo día, desapareciendo después.

#### B) SECUENCIA CELULAR DE DIFERENCIACION MORFOLOGICA

A lo largo del párrafo anterior hemos visto como en el cristalino pueden distinguirse cuatro tipos celulares fundamentales. Figura 1

- I) La célula epitelial, cúbica, indiferenciada y que recuerda al ectoblasto primitivo;
- II) La célula del "annular pad" o ecuatorial, que comienza su elongación y diferenciación.
- III) La célula fibrilar de la porción periférica de la pared medial, o cortex (célula cortical) y
- IV) La fibra nuclear central, anucleada y diferenciada al máximo.

Estos cuatro tipos celulares corresponden a cuatro fases en que un poco arbitrariamente clasificamos el proceso diferenciativo del cristalino. Decimos arbitrariamente porque dentro de cada uno sólo podemos definir claramente la célula típica, siendo la transición hacia los tipos celulares

adyacentes insensible.

Cuestión importante es si realmente estas fases o tipos celulares corresponden a una verdadera secuencia diferenciativa, o bien si son unicamente el reflejo del influjo inductor, que, dada la posición anatómica del cristalino, llegaría hipotéticamente a unas zonas con más intensidad que a otras. La respuesta nos viene dada al considerar el crecimiento postnatal del órgano.

El crecimiento postnatal se realiza a expensas de un aumento del número de células y de un crecimiento individual de éstas, pero es evidentemente el primer factor, y no el segundo, el más importante. Ahora bien: salvo las células epiteliales, el resto de las células cristalinas carecen de capacidad mitótica. El aumento del número de células debe necesariamente hacerse a expensas de las mitosis que tienen lugar en el epitelio, cuya zona más periférica, lindante con el "annular pad", recibe el nombre, por parte de algunos autores, de "zona germinativa" (PAPACONSTANTINO, 1967) (45). Las células hijas van progresivamente desplazándose hacia la periferia, es decir, hacia la zona ecuatorial o "annular pad", región en la que necesariamente inician su diferenciación. Estas células nuevas "empujan", por así decirlo, a las corticales, que al pasar al centro van tomando características de nucleares. A lo largo de toda la vida o por lo menos en el -

animal joven, el crecimiento del cristalino tiene lugar debido a un continuo proceso diferenciativo que sufren las células que van surgiendo del epitelio germinal.

Esta concepción tropieza inmediatamente con una dificultad.

Si la diferenciación celular se mantiene durante toda la vida, o por lo menos en el animal joven, ¿persiste acaso también el influjo inductor de la retina?

No poseemos todavía elementos de juicio suficientes para dar una respuesta clara a este problema. Algunos experimentos parecen indicar que la retina pierde definitivamente su capacidad inductora a la edad de 31 somitos, pero también hay evidencia de que en determinadas condiciones la puede recuperar (ALEXANDER, 1937) (1).

Respecto a este problema, STEWART y PAPAConstantinou, (1967) (58) han recogido la idea primitiva de (REEDER y BELL, 1965) (50), demostrando la existencia en el cristalino de un m-RNA (ácido ribonucleico mensajero) de vida media muy larga, ya que la síntesis de la gamma cristalina bovina (una de las proteínas estructurales) continúa en el órgano adulto inalterada al tratar el sistema con actinomicina D, la cual

es un inhibidor específico de la síntesis de ácidos nucleicos, y entre ellos, nuevos m-RNA. Al existir estos m-RNA establece sería posible que la célula en diferenciación recibiera la información necesaria para la síntesis de proteínas estructurales sin el concurso inductor retiniano. A un mecanismo parecido podría obedecer la regeneración volffiana del cristalino de anfibio.

La inducción embrionaria de la retina podría ser el -- factor que suscitara la creación de éstos m-RNA estables, y -- éstos a su vez permitirían la continuación de la diferenciación "per se".

Sabemos que una vez iniciado este proceso, el cristalino puede ser transplantado a la cavidad celómica, donde continúa perfectamente su desarrollo, o bien a la vesícula óptica. (Mc KEEHAN, 1954) (41) (GENIS GALVEZ, 1964)(19), aparte completamente de la retina.

Si verdaderamente los datos citados por STEWART y PAPA CONSTANTINOU responden al verdadero mecanismo desencadenante de la inducción embrionaria del cristalino, es decir, a la -- creación de un m-RNA estable portador de una información duradera, hemos de admitir que el fenómeno inductor está ligado a la síntesis de proteína, ya que ese es el papel del m-RNA. Con respecto a ello SIRLIN y BRAHMA han demostrado que el crista-



lino del embrión de *Xenopus levis* muestra una activa incorporación de leucina marcada simultáneamente al fenómeno de la inducción; y que todo mecanismo destinado a hacer fracasar esta inducción produce un cese total de la incorporación del aminoácido. La inducción embrionaria del cristalino parece, según los datos actualmente disponibles, estar ligada al comienzo de una activa síntesis proteica (SIRLIN y BRAHMA, 1959) - (54).

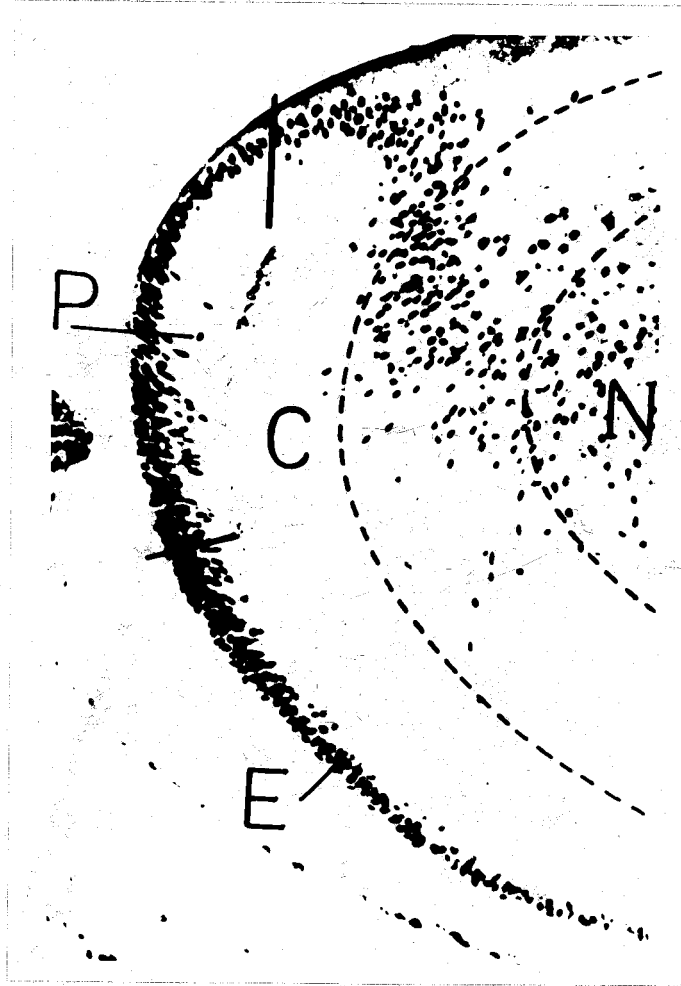
El fenómeno de la diferenciación postinducción, que como antes hemos dicho continúa toda la vida, debe estar ligado también a fenómenos de síntesis proteica diferencial: distintos tipos morfológicos de células presentarán también una diferente actividad epigenética.

Con objeto de evidenciarlo, nos propusimos una serie de experimentos tendentes a determinar las diferencias bioquímicas entre la serie de células morfológicamente distintas.

En este trabajo se han realizado análisis sobre cantidad y tipo de proteínas estructurales, actividad de la lactio deshidrogenasa (LDH) y grupos -SH libres. Con estos marcadores químicos se ha intentado establecer una correlación entre grado de diferenciación morfológica y grado de diferenciación bioquímica. Parte de los resultados que aquí se van a discutir están ya publicados (GENIS GALVEZ y Col. 1968) (20), pero

los repetiremos por el interés que presentan en el contexto general. Al mismo tiempo se presentan datos originales sobre actividad LDH, grupos -SH libres y proteínas solubles del -- cristalino.

FIGURA 1



PARTE IV:      MATERIAL Y METODOS

Todos estos estudios han sido realizados en el cristalino del pollo de seis semanas, mientras no se especifique lo contrario. Los animales pertenecían a la raza White Leghorn.

A) Técnicas preparativas.

1. Obtención del material:

Se procede a la enucleación de los ojos de las cabezas de pollo, que no han de llevar sacrificados más de una hora. Se extirpa con tijeras el polo anterior del ojo en bloque, acto seguido el polo anterior se disecciona bajo microscopio y estereoscópico. Se libera el cristalino con mucho cuidado del ligamento secular, teniendo mucho cuidado en no dañar la cápsula del órgano. Una vez obtenidos los cristalinos de esta forma, se destinan a :

- a) Cristalinos enteros para estudios "in toto", preparación de antisueros o centrifugación fraccionada, cuyas técnicas se detallarán más adelante.
- b) Disección de partes. Bajo la lupa estereoscópica, los cristalinos se someten a la siguiente disección: con aguja de tungsteno se practica una incisión circular a lo largo del ecuador del órgano. La porción anterior de la cápsula así aislada se retira, quedando adherida a ella la región epitelial del cristalino, que se reti

ra y se guarda.

La región ecuatorial (annular pad) se aísla a - continuación junto con el resto de la cápsula, - que posteriormente se eliminará. Seguidamente se disecan las fibras corticales periféricas de las centrales, tomándose aquellas y despreciando se éstas; queda por fin aislado el núcleo del - órgano, que se recoge también además de las -- otras zonas disecadas. Una muestra de cada zona se toma para realizar un control histológico de la pureza y homogeneidad del material obtenido.

## 2. Conservación y tratamiento del material:

La temperatura y el medio en que se llevan a cabo estas operaciones son de la mayor importancia para la marcha de los análisis ulteriores.

Una vez aislado el polo anterior del ojo se coloca sobre solución fisiológica fría, cuya temperatura no exceda en ningún momento de 6° C. En este mismo medio tienen lugar las restantes operaciones de disección.

Los materiales aislados se recogen por separado en solución salina fría, manteniéndose en el frigorífico hasta que llegue el momento de la homogenización.

A continuación se procede a su pesada y se recogen los materiales sobre homogenizadores de vidrio. Se les añade solución salina o solución salina tamponada (fosfato 0,05 M pH -- 7,2; NaCl 0,85%) suficiente para hacer una relación constante peso/volumen para los cinco materiales distintos que se han -- obtenido por disección. Esta relación suele ser de 1:1, 1:3 y 1:9 para estudios de electroforesis y determinación de grupos --SH; 1:200 para el ensayo de la actividad de la LDH y 1:500 -- para la determinación de la cantidad de proteínas.

Seguidamente se procede a la homogenización mecánica -- mediante un rotor de 600 rpm. Todas las operaciones se llevan a cabo en frío.

El homogenizado se somete a centrifugación a 17.000 g. durante 15 minutos a 4° C, descartándose el precipitado insoluble.

El resto de las operaciones analíticas se suele llevar a cabo inmediatamente; esto es imprescindible para el estudio de la LDH y sus isoenzimas. Si el material ha de ser almacenado, se hace en pequeños frascos, a -30° C.

### 3. Ultracentrifugación preparativa:

Mediante este procedimiento estamos en condicio-- nes de separar a escala preparativa las diversas fracciones --

Desarrollado por CLAUDE (1941) (11) ZAMENICK y KELLER - (1954) (68), SLAUTERBACK (1953) (42) y PALADE y SIEKEVITZ(1956) (44), entre otros, se ha convertido en uno de los métodos más difundidos para cualquier tipo de investigación citológica. Fue desarrollado a partir de las ideas para la ultracentrifugación analítica, con vistas a la utilización de las grandes fuerzas gravitacionales en escala preparativa.

Su fundamento consiste en ir sometiendo al homogenizado celular a campos gravitacionales muy intensos, de tal manera - que una partícula citoplasmática vea superada su tendencia a - la difusión por la fuerza centrífuga. Si el campo gravitatorio iguala a las fuerzas de difusión, la partícula considerada que da en equilibrio, situación conocida como "equilibrio de difusión", que se expresa por un número llamado "coeficiente de se dimentación" característico de cada partícula, ésta precipita al fondo del tubo.

La determinación de la constante de sedimentación es un método muy utilizado en la química analítica de las macromoléculas. En ultracentrifugación preparativa lo que nos interesa es crear un campo lo suficientemente fuerte como para que sedimenten las partículas que queramos.

La constante de sedimentación depende de factores tales como masa y volumen parcial específico de la partícula, tempe-

ratura y viscosidad del medio, y además factores dependientes de la centrifugación estérica de la partícula. Por ello nos interesa "estandarizar" a l máximo las condiciones materiales del experimento para que todos los resultados obtenidos sean equiparables.

La ultracentrifugación preparativa puede realizarse de dos maneras: bien por centrifugación fraccional o bien por centrifugación en gradientes de densidad. Este último método se emplea cada vez más dadas sus extraordinarias posibilidades analíticas, pero no pasaremos a describirlo por haber sido el primero de los dos el utilizado por nosotros.

La centrifugación fraccional es un método que se desarrolla en varias fases. En cada una se produce la sedimentación de las partículas de un determinado tamaño; las más pesadas precipitan en las primeras fases. Según las pautas tradicionales, estas fases son cuatro:

- a) Células enteras y núcleos celulares.
- b) Mitocondrias
- c) Microsomas
- d) Ribosomas.

A veces entre las fases b y c se intercala una quinta -



para el aislamiento de lisosomas; también se pueden intercalar fases para el aislamiento de vesículas sinápticas en estudios del sistema nervioso.

En realidad, un experimento de ultracentrifugación se diseña de acuerdo con la partícula citoplásmica que se quiere aislar. Conforme a ello varían el medio solvente y la pauta general de ultracentrifugación.

Para el aislamiento de núcleos en estado de gran pureza se requiere una homogenización completa y cuidadosa seguida de filtraciones del homogenado a través de cedazos especiales para eliminar las células íntegras y los tejidos conectivos y vasculares. Asimismo se requiere un medio que contenga sacarosa - 0,25 M y  $\text{CaCl}_2$  0,002 M.

El campo gravitatorio requerido es muy pequeño, de unas 500 a 800 g. dependiendo del tejido y durante 10 a 15 minutos (MATHIAS; 1966) (39).

El aislamiento de mitocondrias requiere campos gravitacionales del orden de 15.000 g. a 25.000 g. durante media hora. La obtención de preparaciones de gran pureza y homogeneidad implica la utilización de un medio sacarosa-citrato 0,44 M, y al igual que los núcleos, dos o tres re-precipitaciones.

Aislamiento de microsomas y ribosomas. Las experiencias

precuroras de CLAUDE (1941) (11) con esta técnica demostraron que existe una fracción sedimentable postmitocondrial que precipita con campos de  $10^5$  g. durante una hora. El propio autor denominó a estas partículas "microsomas".

Este autor y otros descubrieron la riqueza de esta fracción en RNA. Posteriormente, ZAMECNICK y KELLER (1954) (68) demostraron el fundamental papel que la fracción microsómica desempeñaba en la incorporación de  $N^{15}$  glicina en proteína.

SLAUTERBACK (1953) (55) comprobó con el microscopio electrónico que los microsomas estaban constituidos por un material membranoso en cuya superficie existían unas partículas electron-densas. Tres años más tarde, PALADE Y SIEKEVITZ (1956) (44) demostraron que el material que permanecía sedimentable tras el tratamiento de los microsomas con desoxicolate era un concentrado de las partículas densas de SLAUTERBACK.

A su vez, HULTIN (1955) (27), LITTEEFIELD y col. (1955) (36) y SIMKIN y WORK (1957) (52) comprobaron que esta última subfracción era la que más RNA contenía, y al mismo tiempo, la que incorporaba proteínas. Se dio a las partículas en cuestión el nombre de "ribosomas". A partir de entonces proliferaron los estudios sobre ribosomas, quedando establecido sin lugar a dudas su interesantísimo papel biológico. Sólo citaremos, y a efectos técnicos, que están compuesto por RNA y proteína en la

proporción de 0,6 a 1,7, y que el ión  $Mg^{++}$  tiene una importancia decisiva en el mantenimiento de su integridad estructural (LITTLEFIELD y col. 1955) (36); (HUXLEY y ZUBAY, 1960) (29).

Pasaremos ahora a describir cómo se realiza su aislamiento.

a) Homogenización del material.

El tejido, cristalino en nuestro caso, se homogeniza rápida y mecánicamente en un medio conteniendo 0,01 M KCl; 0,002 M  $MgCl_2$  y tamponado a pH 7,4 por tris(hidroximetil)amino-HCl, 0,01 M. (Medio tris- $Mg^{++}$  - $K^+$ ).

Este medio es conservador de los ribosomas, al tiempo - que totalmente inadecuado para el estudio de las demás partículas subcelulares.

Conseguida la homogenización, el tejido se filtra a través de mallas de acero inoxidable y de gasa para eliminar detritus celulares groseros. Todas estas operaciones se realizan en frío.

b) Aislamiento de fracciones no microsómicas.

El filtrado se lleva a los tubos de la centrifuga y se colocan en el rotor preenfriado a 0°C. Se realiza la primera centrifugación a 800 g. durante diez minutos, descartán

dose el precipitado. El sobrenadante pasa a la segunda centrifugación. Las sucesivas correcciones de volúmenes se realizan con el mismo medio (tris-Mg<sup>++</sup> -K<sup>+</sup>) que la homogenización. Se somete a 15000 g. durante media hora. El precipitado contiene la fracción mitocondrial bruta, que se descarta.

c) Aislamiento de microsomas y ribosomas.

El sobrenadante postmitocondrial se somete a 105.000 g. durante una hora, precipitando la fracción celular soluble. El precipitado se lava y se resuspende en tris-Mg<sup>++</sup> -K<sup>+</sup>) y vuelve a ser centrifugado durante una hora para su precipitación y purificación; esta fracción microsómica purificada se resuspende en un medio tris-Mg<sup>++</sup> -K<sup>+</sup> como el anterior, pero conteniendo desoxicolate sódico al 5%. En algunos experimentos en vez de este último preparado se utiliza el detergente conocido como triton X-100 (octil fenoxi polietoxietanol). La suspensión se somete a 105.000 g. durante tres horas, y el precipitado está constituido por ribosomas en bruto. Estos se resuspenden en tris-Mg<sup>++</sup> -K<sup>+</sup> sin desoxicolato sódico al 5% y se repite la operación para su purificación.

Los procedimientos analíticos para constatar la pureza de los ribosomas obtenidos se detallará más adelante.

#### 4. Preparación de antisueros.

Se emplearon con este fin conejos machos, — que fueron sometidos a la siguiente pauta de inmunización:

a) Antígeno: mezcla de antígeno bruto y coaduvante de Freund (Difco), en la proporción 3:2. Como antígenos bruto se emplearon bien extractos de cristalino soluuble o bien suspensión de ribosomas del mismo. En cada inuyección se emplearon 5 cmc.

b) Esta mezcla se reparte en cuatro inyecciounes subcutáneas, practicadas en las axilas e ingles de — los animales.

c) La inyección se repite una y dos semanas más tarde.

d) Una semana después de la última inyección se practica la sangría del conejo utilizando la vena margiunal de la oreja o bien buscando el paquete vasculo-nerviouso del cuello.

Los antisueros obtenidos se emplean en inmuuno-difusión e inmuno electroforesis.

## B) TECNICAS ANALITICAS

### 1. Determinación cuantitativa de proteínas - totales:

Se emplea el método de LOWRY y cols. (1951) (37).  
Mediante esta técnica las proteínas dan una reacción colorada que se lee a 750 nm, producida por:

a) Una reacción tipo biuret entre las proteínas y el ión  $\text{Cu}^{++}$  en medio alcalino.

Los resultados se comparan con una curva -  
standard preparada a partir de soluciones de proteínas del  
cristalino de concentración conocida.

### 2) Determinación de grupos -SH.

Para la determinación cuantitativa de éstos se  
emplea una variante de la reacción nitroprusiato, que se  
lee colorimetricamente, comprándose los resultados con una  
curva de standar preparada con concentraciones conocidas -  
de glutatión reducido. Los resultados se expresan en micro  
equivalentes, referidos a peso fresco, ml. de solución, o  
mg. de proteínas ; por falta de tiempo y material no se pu  
dieron montar técnicas de determinación más precisa y espe-  
cífica.

### 3, Determinación de la actividad de la LDH:

Se utilizó el método de KORNBERG (1955)(34) se fundamentan en la disminución de absorbancia a 340 mm. que experimentan las soluciones de NADH al ser transformadas en NAD por acción de enzima en presencia de su - substrato, ácido pirúvico.

La existencia de formas moleculares múlti-- ples de LDH (isoenzima) hace que la actividad enzimática presente una distribución bimodal de intensidad con respecto a la concentración del substrato KAPLAN y CIOTTI - (1961) (32). Las isoenzimas anódicas presentan un máxi mo de actividad en concentraciones del orden de  $10^{-4}$  M. - mientras que las catódicas lo hacen al orden de  $10^{-3}$  M. A este hecho aludiremos en adelante como actividades en "- "bajo piruvato" y "alto piruvato", respectivamente.

El método consiste en observar expectrofoto- métricamente a 340 mm. la marcha de la reacción de un -- sistema cuyas c oncentraciones finales son :

NADH,  $9,10^{-4}$  M

Piruvato, "alto"  $6,6.10^{-3}$  M.

Piruvato "bajo"  $3,3.10^{-4}$  M.

Tampón fosfato ,01 M pH 7,4.

Extracto soluble de cristalino (enzima), al 1:200 p/v. 1:31,5 del volumen final.

La disminución en absorbancia debida a la actividad enzimática se registra graficamente. De acuerdo con esta gráfica se calcula la actividad, que se expresan en - U.I.; una unidad internacional es la actividad enzimática que transforma un micromol de NAD en un minuto, en las condiciones óptimas de pH y temperatura. La actividad se expresa referida a ml., mg. de proteínas o g. de tejido fresco.

#### 4. Caracterización química de los ribosomas:

El no haber podido realizar observaciones microscópicas de las partículas aisladas como ribosomas, así como la imposibilidad de efectuar con ellos estudios dinámicos de incorporación de isótopos, han hecho que tengamos que recurrir a la identificación química de los ribosomas.

Otras fracciones subcelulares, como las mitocondrias, pueden ser caracterizadas de acuerdo con enzimas a ellas ligadas; en éste caso se emplean con éxito - los sistemas reductores del verde janus, succinico- y málico-deshidrogenasa, citrocromo-oxidasa, etc, Pero en el caso de los ribosomas cuando son aislados de la fracción microsómica, los enzimas "marcadores" más conspicuos de



esta fracción, como la glucosa-6- fosfatasa, son solubilizadas por acción del desoxicolato. La actividad enzimática que algunos autores asignan a la partícula ribosómica (ribonucleasa latente o enzimas incorporadores de aminoácidos) no han estado a nuestro alcance técnico.

Por ello hemos seguido el criterio expresado por LITTLE FIELD y col. (1955) (36), DE DUVE y col (1955) (17) TISSIERES y WATSON (1958) (59) de considerar como ribosómica aquella partícula con una constante de sedimentación comprendida entre 60 S y 100 S y cuya composición química sea RNA y proteina en una razón que oscile entre 0,7 y 1,3.

Por lo tanto, hemos planteado la determinación analítica de los ribosomas en los siguientes términos:

- a) De acuerdo con las características de la centrifugación y del rotor (velocidad angular e índice de rendimiento), para la sedimentación de partículas que oscilen entre 60 S y 100 S se necesita un tiempo mínimo de 120 minutos y un máximo de 180 minutos, con un campo gravitacional de 105.000 g. (correspondiente a las 40.00 rpm. de la centrífuga - Spinco L y con rotor tipo 50 Ti), haciendo descartado, naturalmente, todas las partículas más rápidamente sedimentables en las centrifugaciones anteriores.

- b) El sedimento obtenido y destinado a fines analíticos se desprende de las paredes del tubo, pasándose y resuspendiéndose en 2 ml. de solución 0,85 M Na Cl y 0,005 M Mg Cl<sub>2</sub> (medio Mg<sup>++</sup>-salino) y de acuerdo con la técnica seguida por TISSIERES y WATSON (1958) (59) para ribosomas de E.coli. Se resuspende por homogenización.
- c) El contenido en proteínas se determina por la técnica arriba mencionada de LOWRY y col. (1951) (37).
- d) El contenido de RNA se determina por espectrofotometría según el método descrito por HOTCHKISS (1957) (26). Consiste en seguir a 260 nm la marcha de la hidrolisis enzimática del RNA. A medida que se vayan liberando nucleótidos aumenta la absorbancia y cuando la hidrolisis es completa, el valor de aquella representa un incremento del 33% sobre la extinción debida a los ácidos nucleicos nativos.

Para estos estudios, la suspensión de ribosomas fue diluida 100 veces.

La ribonucleasa fue suministrada por el laboratorio P.E.V Y.A., donde se nos aseguró que se encontraba libre de DNAasa (se midió esta actividad por viscosimetría). El enzima proce--

día de páncreas bovino.

El propio HOTCHKISS señala las limitaciones de esta técnica. En primer lugar, la correlación entre incremento de absorbancia y 33% de extinción del RNA nativo. En segundo lugar, el valor asignado de 1,0 unidades de absorbancia a una concentración de 45 gamma por ml., tampoco es universalmente válido. Ambos valores dependen de la preparación de RNA de que se trate.

No obstante, el margen de error que estas dos limitaciones introducen es aceptable a efectos de un estudio como el nuestro. Además la sencillez y la elegancia de la técnica hicieron que fuera rápidamente asimilada por nosotros.

##### 5. Electroforesis e Inmunolectroforesis:

a) Electroforesis en almidón: Se realiza sobre un gel de almidón hidrolizado Connaught, preparado según SMITHIES (1955) (55), y en un medio tris-discontinuo según POULIK (1957) (47).

Este medio consiste en preparar el gel con tampón tris-citrato 0,08 M pH 8,65, siendo el tampón de las cubetas borato-MaOH 0,2 M pH 8,65; se realiza la electroforesis con un campo eléctrico de 7,5 V/cm en cámara frigorífica durante toda la noche.

Este método se ha empleado para el análisis cualitativo de las proteínas del cristalino en sus diversas partes, así como para el estudio de las isoenzimas de la LDH.

- b) Inmunoelectroforesis: Realizada según GRABAR y WILLIAMS (1953) (22); en tampón veronal 0,1 M pH 8,6, a 6 V/cm. durante 45 minutos. Se utilizaron como antígenos diversos tipos de extracto soluble del cristalino o sus partes y suspensión de ribosomas de cristalino total. Los antisueros empleados en el desarrollo de la imagen inmunoelectroforética fueron indistintamente suero anticristalino total y suero antiribosoma de cristalino.

#### 6. Isoenzimas de la LDH:

Tras la electroforesis en almidón según se describió arriba, el gel se escinde en dos valvas, una de las cuales se tiñe con negro de almidón para evidenciar las proteínas.

La otra se introduce en un medio incubador según HUNTER y MARKERT (1957) (28), preparado inmediatamente antes, y cuyas concentraciones finales son:

Lactate sódico	0,05	M
CO <sub>3</sub> Na <sub>2</sub>	0,02	M
NAD	4,10 <sup>-4</sup>	M
NOT (nitrotetrazolio azul de )	0,3	mg/ml
PMS (fenazin metosulfato)	20	microgramos/ml
CNK	0,01	M

El medio va amortiguado por tris-HCl 0,05 M pH 7,4.

La incubación se realiza a 37° C en estufa; por acción del enzima se forma NADH que reduce la sal de tetrazolio, -- precipitando fermaazán del color azul-violeta en los lugares donde hay actividad enzimática.

PARTE V. RESULTADOS

1. Cantidad y tipos de proteínas estructurales.

Se observa el aumento progresivo de la relación contenido proteico/peso fresco a medida que avanzamos en la secuencia de diferenciación, es decir, desde el epitelio al núcleo. Este último alcanza la asombrosa cantidad de 312 mg. de proteína por gramo de tejido fresco, por término medio (CUADRO I). Hemos de tener en cuenta, no obstante, que el error de pesada es necesariamente mucho mayor en los epitelios y zonas ecuatoriales, debido al grado de imbibición por agua. Como carecemos actualmente de datos sobre peso seco y volumetría de las diferentes partes del cristalino, no podemos determinar el alcance de tal error, que con todo no creemos que sea muy significativo. Es de magnitud despreciable en lo que se refiere a cristalino total, núcleo y córtex.

En cuanto al tipo de proteínas estructurales, los datos que presentamos han sido ya publicados por GENIS- GALVEZ y col. (1968) (20). Estos datos son los siguientes (figura 2 ( )):

- a) En el cristalino total del pollo de seis semanas están representados los tres tipos de proteínas estructurales: alfa, beta y delta. (El nombre de beta cristalina se les dá a un heterogéneo grupo de proteínas de muy diferentes movilidades. El que se las conozca con un nombre en común se debe a que en la inmunoelectroforesis aparecen como una gran línea - extendiéndose de ánodo a cátodo, lo que indica su homogeneidad antigénica.
  
- c) En el córtex nos encontramos las tres, pero - la delta cristalina en mucho menos cantidad - que en el núcleo.
  
- d) En la zona ecuatorial (annular pad) están representadas alfa y beta pero nada de delta.
  
- d) En el epitelio hay también alfa y beta, pero en cantidades muy pequeñas.

## 2.- Grupos - SH libres.

Aquí la secuencia de diferenciación morfológica - corresponde a una disminución progresiva en el contenido de

estos grupos (CUADRO II).

### 3. Actividad e isoenzimas de LDH.

Comprobamos aquí una relación directa entre diferenciación morfológica y actividad bajo-piruvato, o inversa entre aquella y actividad alto-piruvato. Este resultado está de acuerdo con lo que se observa en las isoenzimas LDH, ya publicadas por GENIS-GALVEZ y cols. (1967)(21): predominio de las catódicas (4 y 5) en las regiones menos diferenciadas (epitelio y anular pad) y de las anódicas - (1 y 2) en núcleo y cortex. (CUADRO III y IV) (Figura 3).

### 4. Análisis de los ribosomas.

a) Análisis químico: la relación RNA/proteína viene a ser de 0,7 (0,9: 1,3), dato que junto a las características de ultracentrifugación, hace que tengamos la certeza de que se trata de partículas ribosómicas. (CUADRO V).

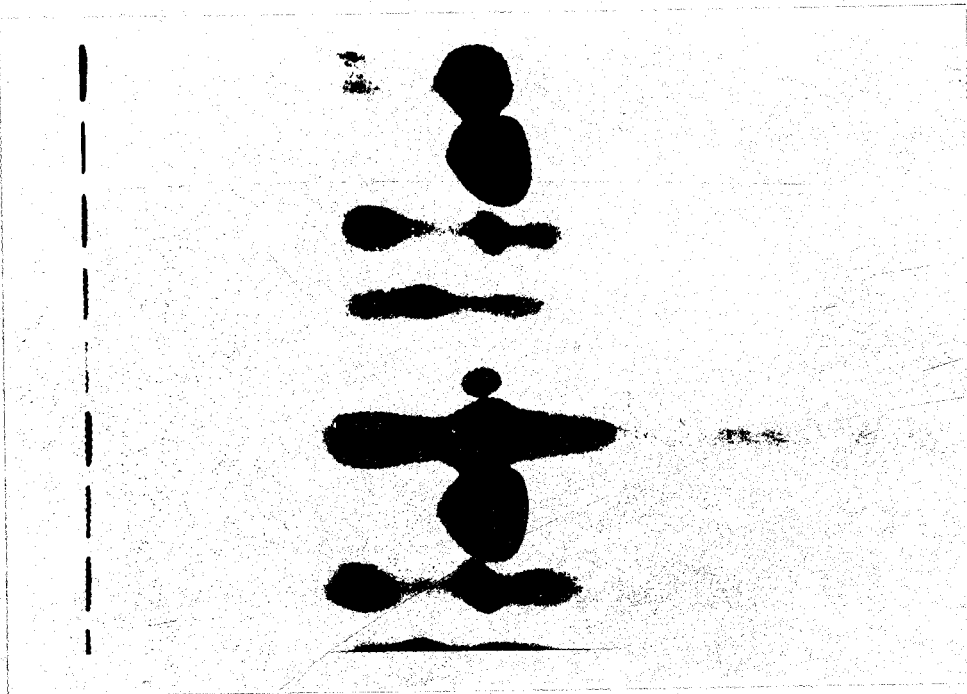
El peso medio de un sedimento ribosómico en seco viene a ser de unos 5 mg., obtenidos a partir de unos 5 g. por término medio de tejido cristaliniano, representado, por lo tan



to, el 1 por mil de peso húmedo del órgano. Esta cantidad es bastante menor que la encontrada por PALADE y SIEKEVITZ (1956) -- (44) para el sedimento ribosómico del hígado (6,5 por mil).

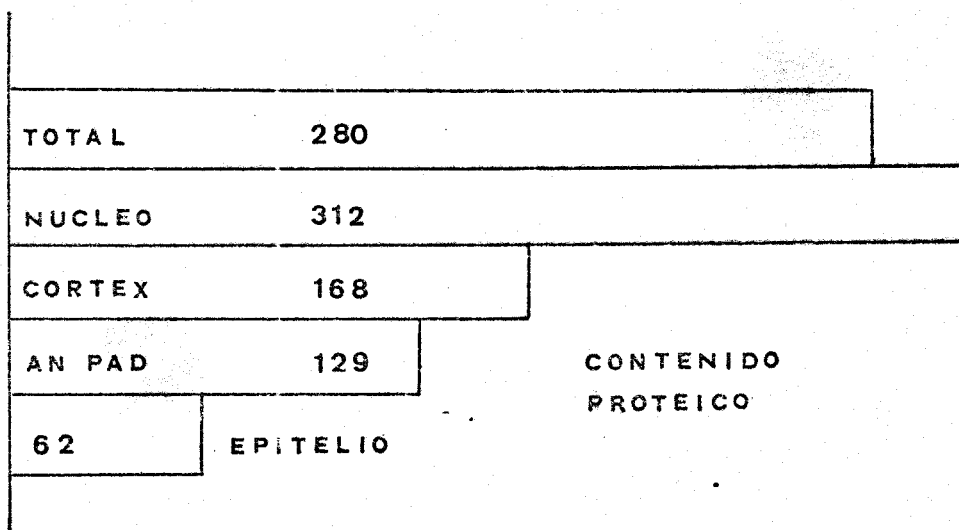
- b) Análisis inmunolectroforético: Tanto con suero anticristalino como con suero antibiosoma, la unmunoelectroferesis del material ribosómico presenta una banda de precipitación típicamente de alfa cristalina. (Fgi. 4 ).

FIGURA 2



HISTOGRAMA

(CUADRO I)



C U A D R O I

RESULTADOS: PROTEINAS TOTALES

	mg/g.	dispersión standard.
EPITELIO	62	± 12
ANNULAR PAD	129	± 10
CORTEX	168	± 15,6
NUCLEO	312	± 21,7
TOTAL	280	± 19,9

Técnica..... LOWRY (1951) (37)

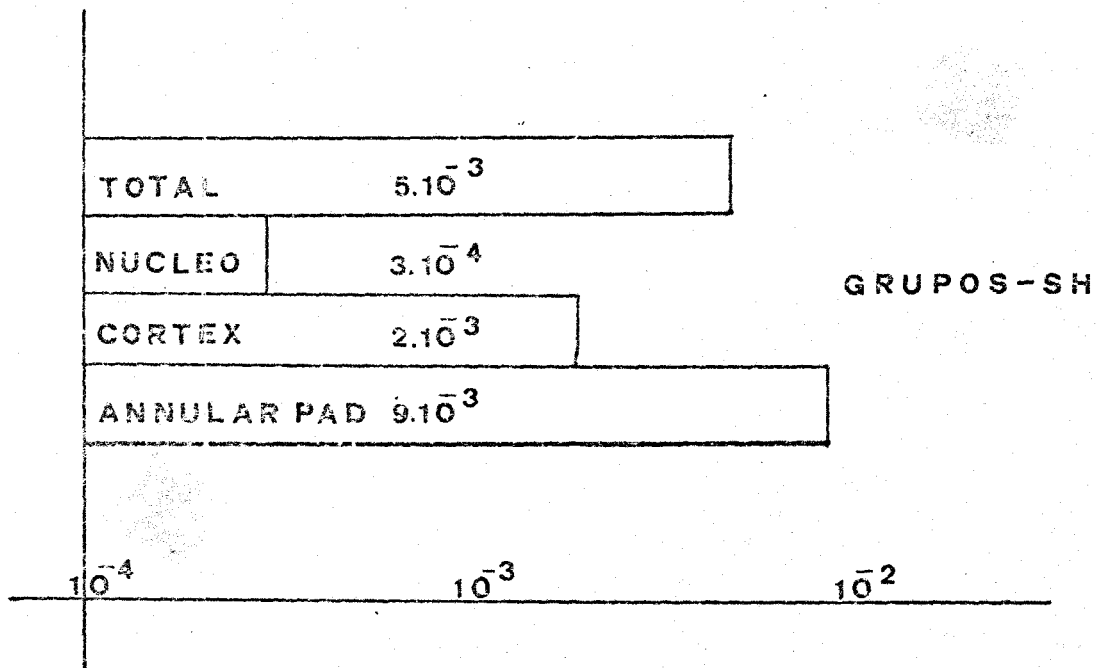
Expresados en..... mg. de proteína por  
gramo de peso fresco.

Nº de observaciones..... 21

En la tabla se expresan los valores medios y su dispersión.

HISTOGRAMA

CUADRO II



C U A D R O II

RESULTADOS:	GRUPOS - SH	
	Microequivalentes por mg. proteína.	Dispersión standard.
	-3	-4
<u>ANNULAR PAD</u>	<u>9.10</u>	<u>5.10</u>
<u>CORTEX</u>	<u>3.10<sup>-4</sup></u>	<u>9.10<sup>-5</sup></u>
<u>TOTAL</u>	<u>3.10<sup>-4</sup></u>	<u>9.10<sup>-5</sup></u>

Técnica..... Nitroprusiato.  
Expresado en ..... Microequivalente por  
mg. proteína.  
Nº de observaciones..... 4

Se expresan los valores medios y su dispersión.

HISTOGRAMA

CUADRO III

TOTAL	24.1
NUCLEO	25.2
CORTEX	29.3
AN PAD	28.8
EPITELIO	13.6

ACTIVIDAD LDH

PIRUVATO  $3.310^{-4}$  M

C U A D R O III

RESULTADOS:	ACTIVIDAD LDH	(bajopiruvato)
	UU.II./g.	dispersión standard.
EPITELIO	13,6	$\pm$ 5,6
ANNULAR PAD	28,8	$\pm$ 9,7
CORTEX	29,3	$\pm$ 8,4
NUCLEO	25,2	$\pm$ 6,0
TOTAL	24,1	$\pm$ 6,3

Técnica.....KORNEBERG (1955) (34) Piruvato  
 $3.3.10^{-4}$  M.

Expresado en..... UU.II.por g. de peso fresco.

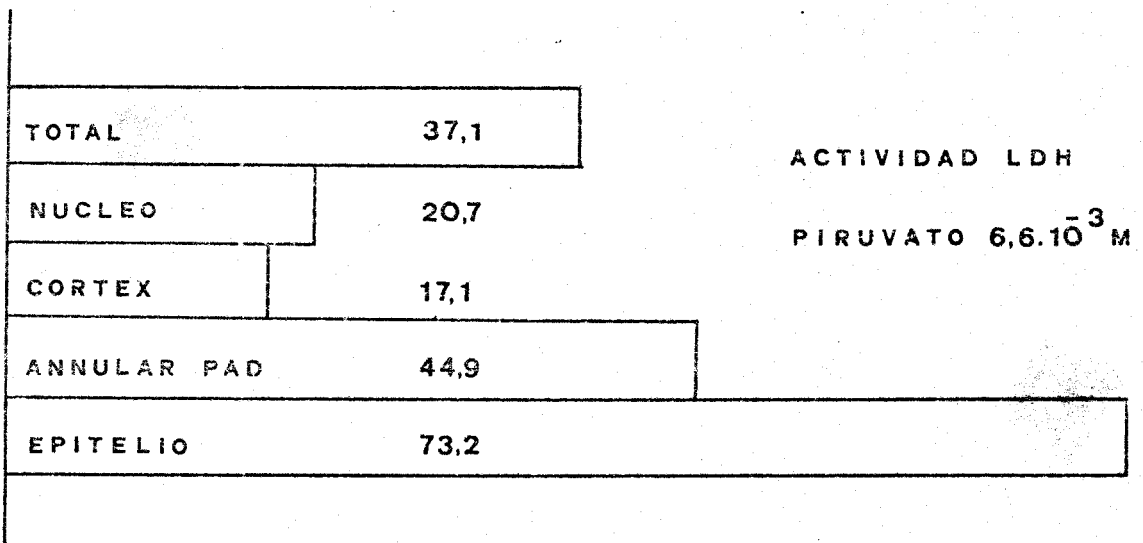
Nº de observaciones....12

Se expresan los valores medios y su dispersión.



HISTOGRAMA

CUADRO IV



C U A D R O IV

RESULTADOS:	ACTIVIDAD LDH (alto piruvato)	
	UU.II./g	Dispersión standard.
EPITELIO	73,2	± 12,0
ANNULAR PAD	44,9	± 10,2
CORTEX	17,1	± 7,7
NUCLEO	20,7	± 5,9
TOTAL	37,1	± 7,5

Técnica.....KORNBERG (1955) (34) Piruvato.

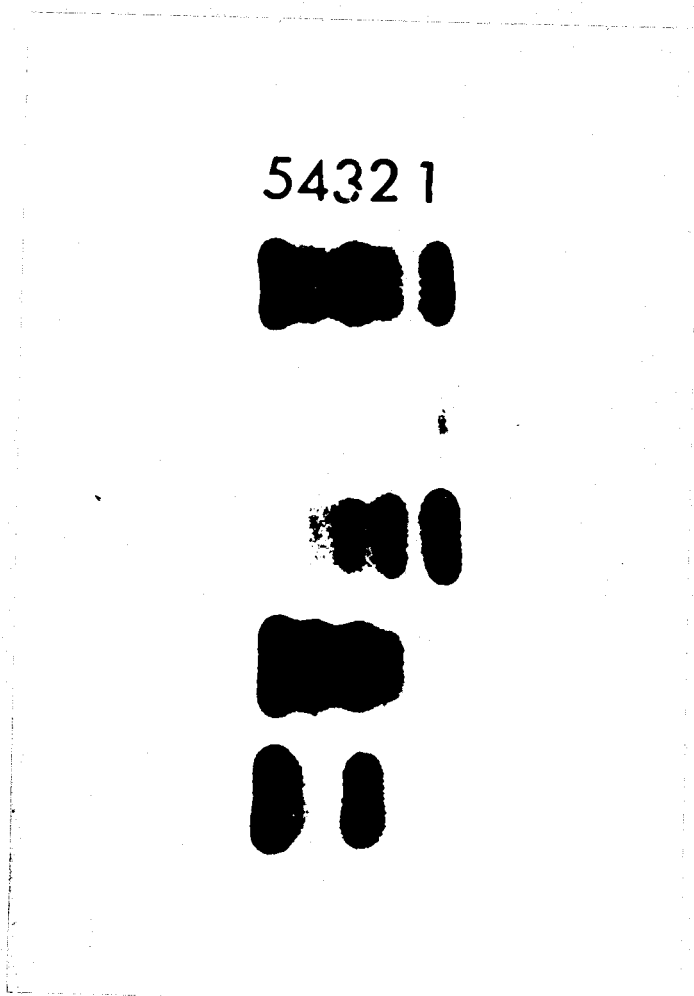
$6,6 \cdot 10^{-3}$  M.

Expresados en.....UU.II. por gramo de peso fresco.

Nº de observaciones 12

Se expresan los valores medios y su dispersión.

FIGURA 3



C U A D R O V

RESULTADOS: DATOS ANALITICOS DE RIBOSOMAS

Nº de observaciones.....	9
Peso medio de un pellet (sedimento).....	5,0 mg.
Contenido medio de un pellet en RNA.....	36 % (peso)
Contenido medio de un pellet en proteínas....	52 % (peso)
Relación RNA/proteínas.....	0,7 (ap. por exceso)

Acción de la ribonucleasa.

Experiencia UC-5

Sistema: suspensión ribosómica en 2 ml. de Mg<sup>++</sup>-salino, diluida al 1/1000, (3ml.) + 0,05 ml de solución de ribonucleasa de concentración 0,1 mg/ml en agua destilada.

Lectura a 260 mm., Beckman DB; referencia, 3 ml. de Mg<sup>++</sup>-salino + 0,05 ml. de solución de ribonucleasa.

C U R V A (CUADRO V)

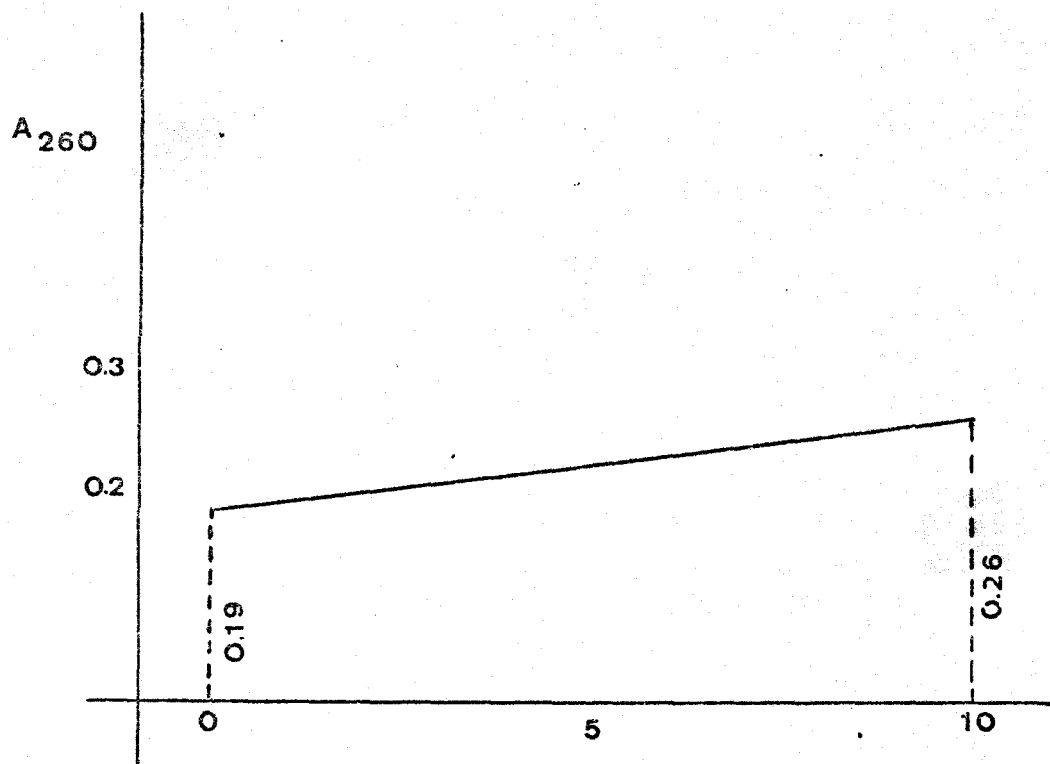
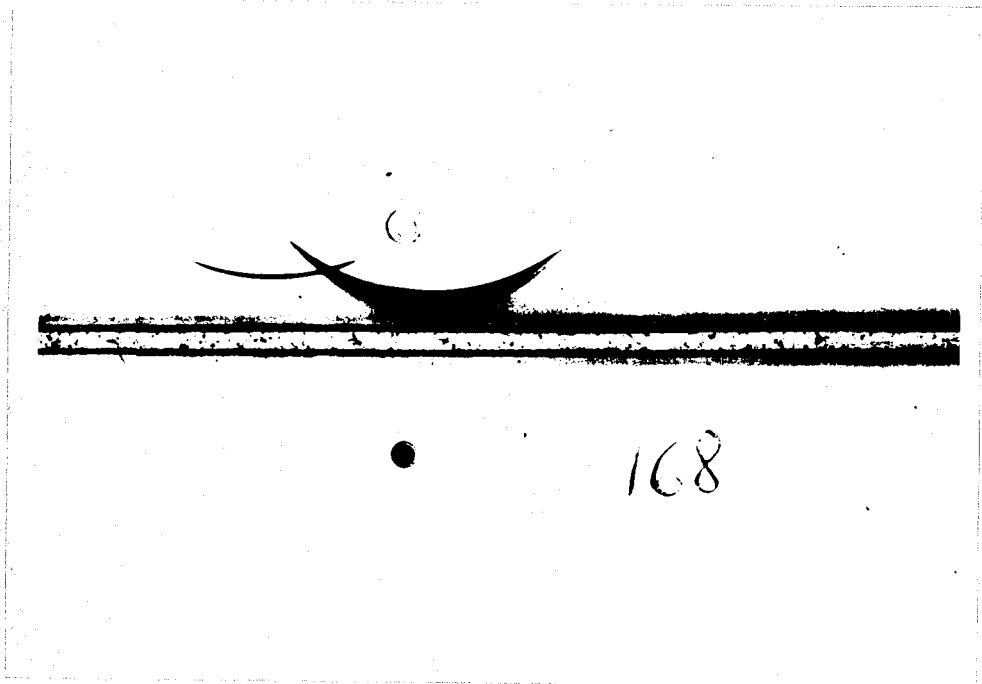


FIGURA 4



## PARTE VI : DISCUSION

Aunque la extensión de nuestros resultados se limita a un número reducido de observaciones y por lo tanto, no poseemos base estadística suficiente como para sacar conclusiones definitivas, creemos que no deja de ser algo sugestivo. Efectivamente, cada análisis realizado sobre las cuatro distintas partes evidencia una gradación en los resultados. En el caso de la LDH y de los grupos -SH esta secuencia es por lo general de mayor a menor; no así en las proteínas estructurales del cristalino, pero sin embargo obedecen también a un patrón de distribución fundamental de las diversas proteínas en cada uno de los estadios de la diferenciación celular.

Vamos a sistematizar esta discusión tratando por separado los problemas que se nos han planteado.

### I. Variaciones individuales.

El método seguido por nosotros nos impide detectar variaciones individuales. Ahora bien: el analizar simultáneamente cantidades de cristalino o sus partes, que oscilan normalmente entre 20 y 40 hace que el resultado sea la media estadística aritmética de dicha población de cristalino.

Un parámetro estadístico que nos indicaría la posible existencia de variaciones individuales sería la desviación o dispersión típica, que no estamos en condiciones de determinar según nuestra metódica.

No obstante, podemos calcular un estimado de la desviación típica. Como cada resultado representa la media de una muestra tomada al azar de la población total de cristalino de pollo de seis semanas, el conjunto de datos referentes a un mismo análisis no es más que la distribución estadística de medias de muestras tomadas aleatoriamente. La desviación típica que hemos hallado para cada análisis representa la dispersión de las medias, lo que en estadística se conoce como error típico de la media - (BOLIVAR, 1952) ( 7 ) . Y se puede demostrar que el error típico de la media es:

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



En esta ecuación conocemos dos términos; estamos en condiciones pues, de calcular el tercero, que es "sigma", la dispersión típica de la población total. Si resolvemos esta ecuación para cada uno de los resultados que hemos obtenido, obtendríamos valores variables. En el caso de  $-SH$  y LDH, los valores son grandes; en las proteínas, estos valores serían pequeños. Estos resultados, pueden entonces indicar dos cosas:

O que verdaderamente existen diferencias individuales para actividad LDH y grupos  $-SH$ , o que hay una gran magnitud de error experimental.

Nosotros lo atribuimos a la segunda posibilidad. Por otra parte, hemos aplicado un poco arbitrariamente la teoría de muestreo gaussiana a muestras pequeñas. De todas maneras, la evidencia nos viene por vía de los resultados de otros autores, que no encuentran en el cristalino diferencias individuales significativas.

En cuanto a nuestro error experimental creemos no obstante que las cifras de actividad LDH y grupos  $-SH$  conservan un valor si son consideradas en términos relativos.

II. ¿Obedecen estos cambios moleculares observados a la secuencia de diferenciación postnatal, o bien son debidos a la actividad inductora de la retina en el periodo embrionario?.

Con esta pregunta nos planteamos la cuestión de que si los cambios moleculares son preformados en el momento de la inducción o forman parte intrínseca del proceso diferenciativo postnatal. Vamos a discutirla por separado para cada conjunto de resultados.

#### A) DIFERENCIACION Y PROTEINAS DEL CRISTALINO:

Vamos en primer lugar a recordar datos relativos a la diferenciación embrionaria. En cuanto a las proteínas del cristalino, ZWAAN (1963) (69) ha determinado por inmunofluorescencia que la primera proteína que hace su aparición es la delta-cristalina. Las últimas en aparecer son las betas. El proceso de inducción embrionaria no es superponible a la gradación que nosotros hemos observado. En ésta, la delta-cristalina corresponde a la célula más diferenciada, mientras que la alfa y la beta corresponden a las células más jóvenes.

Estos dos hechos, no obstante, podrían interpretarse conjuntamente. Las células de la precoz vesícula cristaliniiana, que sintetizan delta-cristalina, en el órgano adulto formarán parte del núcleo debido al crecimiento; y en el núcleo encontramos efectivamente esta proteína. Ahora bien: la delta-cristalina experimenta un "turn over" metabólico, y para que nosotros la encontremos en el núcleo adulto, debe necesariamente existir una síntesis activa de cristalina delta. Datos de PAPA

CONSTANTINOU (1967) (45) confirman esta hipótesis; por tanto, no podemos admitir que la síntesis de la delta-cristalina sea debida a la actividad particular de esas células que se han transformado en fibras nucleares, sino más bien, cuando la célula cortical se vaya transformando en fibra nuclear ha de poner en marcha la síntesis de esta proteína.

Además, si admitiéramos la teoría de las células primitivas, tendrían que aparecer en el núcleo también las alfa y beta-cristalinas, pues cuando comienza en el embrión la síntesis de éstas, el cristalino tiene un número total de células menor que el núcleo adulto. Esto indica que en el embrión de 14 días (fecha de aparición de la beta cristalina), las células que son epiteliales o ecuatoriales, en el órgano adulto son corticales o nucleares.

Con respecto a estos datos, pues, la inducción embrionaria y la diferenciación zonal que se observa en cuanto a las proteínas, nos parecen fenómenos diferentes. Esto no quiere decir que reconozcamos una causalidad distinta. Volveremos no obstante a tratar este tema a propósito de los ribosomas del cristalino.

## B) DIFERENCIACION Y ACTIVIDAD LDH:

Si consideramos los resultados obtenidos, la correlación entre diferenciación y actividad LDH es bastante más neta. La actividad alto-piruvato aumenta en sentido núcleo-epitelio y la actividad bajo-piruvato disminuye en ese sentido; en el patrón isoenzimático confirmamos estos resultados.

En cristalinos de más edad, la diferencia está mucho más acentuada; según hemos tenido ocasión de comprobar (GENIS GALVEZ y col. 1967) (21): aparición de bandas adicionales anódicas en las zonas diferenciadas y restricción a la zona catódica en las zonas indiferenciadas. En el trabajo mencionado se discute la relación que algunos autores (CAHN y col. 1962) (9) -- han postulado entre el espectro isoenzimático y el consumo de oxígeno .

También aquí aparece una dicordancia entre el desarrollo embrionario y la diferenciación postembrionaria. La actividad en el cristalino embrionario es predominantemente catódica (MAISEL y col. 1965) (38). En los momentos perinatales y en la primera semana de vida, la situación cambia drásticamente para -- dar el patrón que hemos descrito en el cristalino de seis semanas, la cual se perpetúa toda la vida. Hemos de distinguir, -- pues, dos serie de fenómenos diferentes: uno correspondiente al

desarrollo embrionario, en el cual la actividad alto-piruvato es máxima, y otro, correspondiente a la diferenciación postembrionaria de las células del órgano, caracterizada por el viraje de predominio de la LDH 5 (alto) a LDH 1 (bajo), a medida que avanza la diferenciación.

### C) DIFERENCIACION Y GRUPOS -SH:

Los datos relativos a grupos -SH muestran un predominio de éstos en las zonas indiferenciadas sobre las diferenciadas. Por tanto, podemos considerar que la diferenciación zonal corre paralela a una disminución de los grupos mercaptos-presentes en la fracción soluble de la célula.

Estos grupos -SH libres están presentes en el cristalino en forma de glutación reducido a restos de disteína en las proteínas solubles.

ZWAAN (1966) (70) postula que el desarrollo embrionario corre paralelo a un aumento en grupos -SH, que él atribuye a la riqueza en estos grupos de la delta-cristalina. Nosotros no hemos tenido ocasión de comprobarlo directamente, pero a la vista de los resultados no podríamos aceptar tal punto de vista; pues estando la delta-cristalina casi restringida al núcleo, es en esta zona donde menos grupos -SH libres hemos encontrado.

Al carecer de otros datos nos limitamos a la exposición -- del hecho sin entrar en su discusión.

#### D) DIFERENCIACION Y RIBOSOMAS:

A nuestro juicio, el dato más interesante que se -- ha obtenido en este estudio es la presencia de una reacción de alfa-cristalina en la inmunolectro-foresis de los ribosomas -- del cristalino.

Naturalmente, ante una reacción tan inesperada, la postu- ra lógica consiste en dudar de la validez y veracidad del re- sultado por suponer que existió contaminación del material ribo- sómico con la fracción celular soluble.

Ahora bien:

a. El protocolo de ultracentrifugación seguido por nosotros elimina la posibilidad de contaminación. Téngase en -- cuenta que la fracción microsómica se lava dos veces y la ribo- sómica otras dos, quedando aislado el precipitado de la frac- ción celular soluble en el primero de estos cuatro lavados.

b. Si existiera contaminación por parte de las pro- teínas solubles, hubieran aparecido en la imagen inmunolectro- forética las otras dos proteínas, delta y beta.

Descartando la posibilidad de contaminación, nos encontramos con el hecho de que alfa-cristalina esté en alguna manera ligada a los ribosomas. Y por ello por dos razones: el suero anticristalino forman un arco de precipitación correspondiente a alfa si se usa como antígeno suspensión de ribosomas y el suero antirribosoma precipita un arco alfa si se emplea extracto soluble de cristalino. La misma banda aparece empleando como antígenos extractos del epitelio o del anular pad.

Se ha demostrado, por estudios de microscopía electrónica, que la población disminuye hasta desaparecer en la célula cristaliniana diferenciada, encontrándose únicamente ribosomas en las zonas epitelial y ecuatorial. Esto hace pensar que es en estas dos zonas en la que existe una activa síntesis proteica, máxime cuando STEWART y PAPACONSTANTINO (1967) (58) han descrito la sensibilidad de las mismas a la actinomicina D.

A la vista de estos datos, no podemos dejar de pensar que la proteína sintetizada por los ribosomas de la zona epitelial y ecuatorial sea precisamente alfa, en cuyo caso ésta podría ser precursora de las demás; iría de acuerdo con el hecho de aparecer la proteína en cuestión como antígeno de la fracción ribosómica.

Ultimamente se ha hablado mucho de la estructura heteropolimérica de las proteínas del cristalino (CLAYTON y TRUMAN, -- 1967) (13). Esta hipótesis afirma que las proteínas del cristalino están constituidas por una serie de subunidades comunes, variando en cada una el número y la clase de los monómeros. Si se demostrara definitivamente esta hipótesis no nos sería muy difícil concebir a alfa-cristalina como proteína precursora.

Esto sería la prueba definitiva de que los fenómenos de inducción embrionaria y diferenciación postnatal son diferentes. Aquella comienza por la síntesis de delta-cristalina; ésta se iniciaría por la síntesis de alfa en la zona germinativa.

El que los ribosomas de un órgano estén ligados a alguna proteína estructural del mismo es un hecho comprobado por VOGT (1953) (61) en el hígado de rata; una revisión del problema ha sido publicada por ARCOS y Col. (1957) (2). En determinadas enterobacterias existe endotoxina ligada a los ribosomas (DANDEU) y Col. 1964) (14).

En los extensos análisis realizados por estos últimos autores sobre las propiedades de los antisueros antirribosoma, demuestran que hay tres clases de antígeno en esta partícula:

a. Común a todas las especies y ribosomas (sería el propio RNA).



b. Común a unas pocas especies.

c. Organoespecíficos.

Estos últimos serían de naturaleza proteica. No resulta difícil, pues, pensar que alfa-cristalina sea verdaderamente un antígeno de la categoría "organoespecíficos" de estos autores (BARBU y Col., 1961) (4).

Si recapitulamos lo hasta ahora discutido, así como los datos de otros autores, nos encontramos que en el cristalino - existe efectivamente una secuencia de diferenciación bioquímica correlativa a la diferenciación morfológica. El crecimiento postnatal del órgano se verifica a expensas de la actividad mitótica de su zona germinativa epitelial; sólo en ésta se aprecian mitosis y es capaz de incorporar timidina tritiada, que - es índice de la replicación de DNA. Las células hijas van desplazándose hacia la periferia, a la zona ecuatorial o annular, pad, donde comienza su diferenciación, aparecería aquí una sintesis de alfa-cristalina, y el patrón LDH iría virando progresivamente a predominio anódico. Esta zona es la más activa incorporadora de uridina tritiada, y la más sneisible a la actinomicina. Histoquímicamente se evidencia a su nivel multitud de actividades de todo tipo más que en cualquiera de las otras tres regiones. A medida que continúa la diferenciación se observa - desaparición de los ribosomas, franco predominio de las isoenzimas LDH anódicas y presencia de delta-cristalina. Ya es el padrón bioquímico típico de la célula cortical.

La incorporación de uridina tritiada es poco activa y no es inhibida por la actinomicina D. No hay incorporación de timidina. Y todos estos caracteres, exagerados, no los encontramos por fin en la fibra nuclear, término de la historia diferenciativa del cristalino..

La no concordancia de estos datos con los observados durante la inducción embrionaria ha cen pensar que los dos fenómenos obedecen a leyes distintas, aunque no estemos en condiciones, - repetimos, de decir que sean causalmente independientes. La teoría de los mensajeros estables, ya citada, podría, si fuera demostrada terminantemente, explicar algunos de los acontecimientos epigenéticos de la diferenciación del cristalino. Si la síntesis del alfa-cristalina depende de la función ribosómica de la zona germinativa, delta-cristalina se debería a la actividad de un mensajero estable informado de alguna manera durante el proceso inductivo, o a una forma de agregación específicamente nuclear de las hipotéticas subunidades.

La beta-cristalina procedería de la degradación de ambas, y de ahí sus múltiples formas moleculares.

Dejando aparte estos extremos especulativos, queremos decir únicamente como final que verdaderamente creemos, más que por nuestros limitados y cuestionables resultados, por lo de otros autores, que la diferenciación celular es un fenómeno complejo del cual la morfología no es más que una manifestación.

Correlativamente hay cambios bioquímicos a escala macromolecular que manifiestan una actividad epigenética específica para cada grado de la diferenciación.

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

- 1.- ALEXANDER, L.E.- An experimental study of the role of optic cup and overlying ectoderm in lens formation in the chick embryo.

J. Exptl. Zool. 75,41. 1937

- 2.-ARCOS, J.M.; ALVAREZ MORENO, C; CHORDI, A.; VAZQUEZ J.J.; MACARULLA, J.M. y SANTIAGO; E.- Análisis antigénico de fracciones subcelulares hepáticas.

Rev. Esp. Fisiol. 23,167. 1967

- 3.- BAER, K.E. von.- "Ueber entwicklungsgeschichte - der thiere; beobachtung und reflexion".

Bornträger. Könisberg. 1832

- 4.- BARBU, E.; PANIJEL, J. y QUASH, G.- Caractérisation immunochimique des ribosomes.

Ann. Inst. Pasteur 100,725. 1961.

- 5.- BEADLE= G.W. y TANTUM. E. L.- Genetic control of biochemical reactions in neurospora.

Proc.Nat. Acad. Sci. 27,499. 1941

6.- BENZER, S.- Fine structure of a genetic region in bacteriophage.

Proc. Nat. Acad. Sci. 413444. 1965

7.- BOLIVAR IZQUIERDO, I.- "Curso práctico de biometria y genética"

Labor. Barcelona. 1952

8.- BURNET, F.M.- "Clonal selection theory of acquired immunity".

Cambridge and Vanderbilt University press.

Cambridge. 1952

9.- CAHN, R.D.; KAPLAN, N.O.; LEVINE, L. y ZWILLING, E.- Nature and development of lactic dehydrogenases.

Science, 136,962. 1962.

10.- CASPAR, D.L.D.- "Assembly and stability of the tobacco mosaic virus particle"; in advances in protein chemistry.

Ed.C.B. Andinsen, M.L. Anson and J.T. Edsall.

Academic press. 1963

- 11.- CLAUDE, A.- Particulare components of cytoplasm.  
Symp. on Quant. Biol. 9.263. 1941
  
- 12.- CLAYTON, R.M.- Localization of embryonic antigens by  
antisera labelled with fluorescent dyes.  
Nature. 174, 1059. 1954.
  
- 13.- CLAYTON, R.M. y TRUMAN, D.E.S.- Molecular structure  
and antigenicity of lens proteins.  
Nature, 214, 1201. 1967.
  
- 14.- DANDEU, J.P.; QUASH, G. y BARBU, E.- Présence d'endoto-  
xine dans les préparations de rivosomes et antigéni-  
cité des acides nucléiques.  
C.R. Acad. Sci. Paris. 258.3932 1964.
  
- 15.- DOORENMAALEN, W.J.- "Detection de molecules par l'immu-  
nochimie en méthodes nouvelles en embryologie".  
Ed. E. Wolf. Horman. Paris 1964
  
- 16.- DUKE-ELDER, S.- "Text-book of Ophthalmology".  
T. III Kimpton. Londres 1947

17.- DE DUVE, C.; PRESSMAN, B.C.; GIANETTO, R.; WATTIAUX, R.  
y APPELMANS, F.- Tissue fractionation studies. 6.  
Intracellular distribution patterns of enzymes in —  
rat-liver tissue.  
Biochem. J., 60, 604, 1955

18.- GARROD, A.E.- "Inborn errors of metabolism".  
Oxford Univ. Press 2ª ed. Oxford 1923.

19.- GENIS GALVEZ, J.M.- Quelques aspects de la différencia  
tion et détermination du cristallin.  
Bull. Assoc. Anatomistes. XLIX reunión. Madrid.

20.- GENIS GALVEZ, J.M.; CASTRO, J.M. de y BATTANERE.-  
Lens soluble proteins: Correlation with the Cytolo-  
gical differentiation in the young adult organ of -  
the chick.  
Nature 217, 652, 1968

21.- GENIS GALVEZ, J.M.; MAISEL, H. y BATTANER, E.-  
Un modelo de correlacion morfobioquímica: el patron  
de isoenzimas LDH en las distintas partes del cris-  
talino durante la diferenciación del organo.  
An. Desarr. XIV. 55. 1967.

22.- GRABAR, P. y WILLIAMS, C.A.- Méthode permettant l'étude de conjugée des propriétés électrophorétiques et immuno-chimiques d'un mélange de protéines. Application au serum sanguin.

Biochim. Biophys. Acta 10, 193, 1953.

23.- HEILBRUNN, L.V.- "The dynamics of living protoplasm".

Academic Press, New York, 1956

24.- HOLTZFETER, J.- Morphologische beinglussun von urode-lenktederm bei xenoplastischer transplantation,

Arch. Entwicklungsmechn. Organ. 133, 367, 1955

25.- HORNE, R.W.; BRENNER, S.; WATERSON, A.P. y WILDY, P. J.- The icosahedral form of an adenovirus.

J. Mol. Biol. 1, 84, 1959

26.- HOTCHKISS, R.D.- "Methods in enzymology".

Ed. S.P. Colowick and N.O. Kaplan, T. III. 105, 708

Academic Press, New York, 1957



27.- HULTIN, T.- The incorporation in vivo of labeled amino acids into subfractions of liver cytoplasm fractions.

Exptl. Cell, Res. Suppl. 3, 210. 1955

28.- HUNTER, R.L. y MARKERT, C.L.- Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels.

Science 125, 1294. 1957

29.- HUXLEY, H.E. y ZUBAY, G.- Electron microscope observations on the structure of microsomal particles from *Escherichia coli*.

J. Mol. Biol. 2, 10. 1960

30.- INGRAN, V.M.- "The hemoglobins in genetics and evolution".

Columbia University Press. New York. 1963

31.- JACOB, F. y MOMOD, J.- Sur le système de répression - assurant l'immunité chez les bactéries lysogènes.

C.R. Acad. Sci. Paris. 248, 3219. 1959.

- 32.- KAPLAN, N.O. y CIOTTI, M.M.- Evolution and differentiation of dehydrogenases.  
Ann. New York. Acad. Sc. 94, 701, 1961;
- 33.- KELLENBERGER, E.- The genetic control of the shape of a virus.  
Sci. American. 215, 632, 1966
- 34.- KORNBERG, A.- "Methods in enzymology".  
Ed. S.P. Colowick and N.O. Kaplan, T.I. 67, 441.  
Academic. Press. 1955
- 35.- LAWRENCE, W.J.C.- Genetic control of bioplant genetics-flower colours.  
Biochem. Soc. Symp. Cambridge 4, 3 1960
- 36.- LITTLEFIELD, J.W.; KELLER, E.B.; GROSS, J. y ZAMECNICK, P.C.p Studies on cytoplasmic ribonucleo-protein particles from the liver of the rat. Plate I.  
J. Biol. Chem. 217, 111, 1955
- 37.- LOWRY, O.; ROSEBROUGH, N.; FARR, A.L. y RANDALL, R.J.- Protein measurement with the folin phenol reagent.  
J. Biol. Chem. 193, 265, 1951

- 38.- MAISEL, H.; KERRIGAN, M. y SYNER, F.- The ontogeny of lactate dehydrogenase in chick lens.  
Invest. Opth. 4, 502. 1965
- 39.- MATHIAS, A.P.- Separation of subcellular particles.  
Brit. Med. Bull. 22, 2-146. 1966
- 40.- Mc KEEHAN, M.S.- Cytological aspects of embryonic lens induction in the chick.  
J. Exp. Zool. 117, 31. 1951
- 41.- Mc KEEHAN, M.S.- A quantitative study of self-differentiation of transplanted lens primordia in the chick.  
J. Exp. Zool. 126, 157. 1954.
- 42.- MENDEL, G.- Versuch über planzen-hybriden (experiments in plant-hybridization)  
Harvard University Press. Cambridge. 1960
- 43.- NIBENBERG, M.W.- The genetic Code: II  
Sci. American. 190, 80. 1963

44.- PALADE,G.E.; y SIEKEVITZ, P.- Liver microsomes.

J. Biophys. Biochem. Cytol. 2,171, 1956.

45.- PAPA-CONSTANTINOU, J.- Molecular aspects of lens cell differentiation.

Science 156,338. 1967

46.- PERUTZ, M.F.- Protein and nucleic acids: structure and function.

American Elsevier Publishing company Inc. 1962

47.- POULIK, M.D.- Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers.

Nature 180,1477. 1957

48.- RABL, C.- Ueber den bau und die entwicklung der linse. II: Reptilien und vögel.

Ztschr. Wissensch. Zool. 65,257. 1889.

49.- RAMON Y CAJAL.- Histogenesis del sistema nervioso del hombre y en los vertebrados.

2º Vol. Librerias de Nicolás Moya, Madrid.

1899-1904.

56.- SMITHIES, O.- Zone electrophoresis in starch gels:  
Group variations in the serum proteins of normal  
human adults.

Biochem. J. 61, 629. 1955

57.- SPEMANN, H.- "Embryonic development and induction".

Yale University Press. 1938

58.- STEWART, J. A. y PAPACONSTANTINOU, J.- Stabilization  
of mRNA templates in bovine lens epithelial cells.

J. Mol. Biol. 29, 357. 1967.

59.- TISSIERES, A. y WATSON, J. D.- Ribonucleoprotein par-  
ticles from escherichia coli.

Nature 182, 778. 1958.

60.- UHLENHUTH, P. T.- Zur lehre von den unterscheidungen  
verschiedener eiweissarten mit hilfe spezifischer  
sera.

Festschr. zum 60. Geburtstag. R. Koch p. 49

Fiescher, Jena 1903.

61.- VOGT, R.- Distribution of tissue-specific antigens in  
centrifugal fractions of rat liver.

Nature 182, 1807. 1958.

62.- WADDINGTON, C.H.- "The nature of life".

Allen and Unwin. Londres 1961

63.- WADDINGTON, C.H.- "New patterns in genetics and development":

Columbia University Press. New York, 1962

64.- WADDINGTON, C.H. y COHEN, A.- Experiments on the development of the head of the chick embryo.

J. Exptl. Biol. 13, 219. 1936

65.- WAGNER, R.P. y MITCHELL, H.K.- "Genetics and metabolism".

John Wiley and sons Inc. New York, 1964

66.- WATSON, J.D.- "Molecular biology of the gene".

W.A. Benjamin, Inc. New York, 1965

67.- WOOD, W.B. y EDGAR, R.S.- Building a bacterial virus.

Sci. American 217, 1- 60. 1967.

68.- ZAMECNICK, P.C. y KELLER, E.B.- Relation between phosphate energy donors and incorporation of labeled amino acids into proteins.

J. Biol. Chem. 209, 237. 1954.

69.- ZWAAN, J.- Immunochemical analysis of the eye lens during development.

Academisch Proefschrift (Thesis), University of Amsterdam, Holland. 1963.

70.- ZWAAN, J.- Sulphydryl groups of the lens proteins of the chicken in embryonic and adult stages.

Expl. Eye Res. 5, 267, 1966.

---