

201  
39



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"Aspectos Fisiológicos, Bioquímicos y Genéticos en la  
diferenciación celular en organismos inferiores.  
Dictyostelium discoideum"

TRABAJO MONOGRAFICO  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO  
P R E S E N T A :  
ROSARIO FRIAS MENDIVIL



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**INDICE**

pág.

INDICE.....	3
-------------	---

## CAPITULO I

INTRODUCCION.....	7
1.1. Características generales de Acrasiogymnomycotina.....	9
1.2. Desarrollo de <u>D. discoideum</u> .....	11
Fase vegetativa.....	11
Interfase.....	13
Preagregación.....	13
Agregación.....	16
Post-agregación.....	17
Preculminación.....	17
Culminación.....	17
1.3. Reproducción	
Reproducción asexual.....	18
Reproducción sexual.....	19

## CAPITULO II

FACTORES QUE REGULAN LA DIFERENCIACION.....	22
---	----

pág.

2.1. Distribución celular.....	22
2.2. Capacidad de regeneración celular en el pseudoplasmodio.....	26
2.3. Respuesta de las células al AMPc.....	31
2.4. Inducción del GMPc por el AMPc.....	38
2.5. El GMPc en la respuesta celular.....	42
2.6. Efecto de la disgregación celular en el proceso de diferenciación.....	44
2.7. Otras señales que inducen la diferenciación.....	46
2.8. Relación entre el AMPc, el GMPc y la fosfodiesterasa extracelular del AMPc.....	48
2.9. Fosfodiesterasa del AMPc y su inhibidor específico.....	54

### CAPITULO III

AGREGACION Y MIGRACION.....	60
3.1. Proceso de agregación.....	60
3.2. Diferenciación de varios tipos celulares durante la agregación	62
3.3. Factores físicos que afectan la agregación y migración.....	66
3.4. Factores químicos que afectan la agregación.....	69
3.5. Sitios de afinidad al AMPc que intervienen en la agregación...	74
3.6. Proteínas que intervienen en la agregación.....	78

## CAPITULO IV

PROTEINAS.....	81
4.1. La regulación de la síntesis de proteínas en la diferenciación	81
4.2. Glicoproteínas que intervienen en el desarrollo de <u>D. discoi--</u> <u>deum</u> .....	84
4.3. Enzimas características del desarrollo.....	88
4.4. Enzimas del metabolismo de carbohidratos.....	91
4.5. Liberación de proteasas.....	94
4.6. Proteínas de la capa de la espora.....	95
4.7. Fosforilación de proteínas dependiente del AMPc.....	97

## CAPITULO V

GENETICA DE <u>D. discoideum</u> .....	99
5.1. Recombinación parasexual.....	100
5.2. Recombinación sexual.....	104
5.3. Tiempo de los eventos del desarrollo de <u>D. discoideum</u> .....	109
5.4. Genética del estado de pseudoplasmodio.....	111
5.5. RNAm reguladores del desarrollo.....	114
5.6. Familias de genes en <u>D. discoideum</u> .....	116

pág

5.7. Un plásmido endógeno en <u>D. discoideum</u> .....	118
CONCLUSIONES.....	120
BIBLIOGRAFIA.....	125

## CAPITULO 1



Gracias al desarrollo de los métodos bioquímicos y biofísicos, es posible en la actualidad, más que especular, dar bases moleculares de la vida. El rápido desarrollo de la biología molecular ha traído como consecuencia, la necesidad de redefinir las ramas de la biología estableciendo los mecanismos del desarrollo celular. Una de estas ramas de la ciencia es principalmente la que concierne con la diferenciación.

Tradicionalmente, el término diferenciación es usado para denotar el proceso por el cual las células de un organismo multicelular llegan a ser funcional y estructuralmente diferentes durante la ontogenia (formación y desarrollo del organismo). Uno de los principales problemas de la biología es el estudio de los mecanismos de la diferenciación (Mohr y Sitté, 1971).

La existencia, así como la eficiente función y propagación de los organismos multicelulares, depende de la interacción coordinada de sus células especializadas para diferentes tareas.

Las peculiaridades bioquímicas y morfológicas que caracterizan los diferentes tipos celulares de un organismo son el resultado de la diferenciación celular. Esta diferenciación celular se lleva a cabo como una respuesta a señales del medio extracelular, las cuales son reconocidas y transformadas

dañ si las células contienen los receptores correspondientes y sistemas de transformación de la señal. En muchos de los casos la respuesta incluye complejos programas de expresión genética, cuya terminación es relativamente autónoma, y cuyo resultado es determinado por factores de regulación inherentes al tipo de células afectadas.

La diferenciación celular no esta restringida a organismos multicelulares, ya que procariotes y eucariotes unicelulares, responden también a señales de su medio ambiente, adaptándose gracias a que cambian sus patrones de expresión genética, con profundos cambios en sus estados de desarrollo; incluso algunos procariotes y eucariotes unicelulares forman agregados multicelulares durante distintas fases de su ciclo de vida, presentando una labor compartida entre células especializadas.

En todas las células existen similitudes básicas con respecto a los mecanismos de expresión genética, organización espacial y medios regulatorios que incluyen sistemas de transformación de la señal. Por esto es posible que en sistemas procariotes y eucariotes se comparen, sobre las bases moleculares, aspectos tan diversos como ciclo de división celular, adaptación metabólica y desarrollo de la síntesis de proteínas o nutrientes o señales hormonales, especialización celular, períodos cortos y largos de interacciones célula-célula o programas de expresión genética en células infectadas por virus. Igualmente sucede con la tumorigénesis en plantas y animales.

Algunas veces la diferenciación celular conduce a una especialización irreversible, que puede incluir pérdida de material genético o aún la

muerte celular, debida probablemente a cambios irreversibles de la función y patrón de proteínas celulares. Esto implica diferencias fundamentales en -- los mecanismos de la expresión del gene diferencial que conduce a la vida -- corta o larga.

Dentro de la vasta diversidad de organismos, existen aquellos que en globan información en forma particularmente simple de patrones de organiza-- ción, que estan de acuerdo con la esencia o arquetipo de ciertos procesos -- del desarrollo.

La representación ideal del tránsito del desorden espacial y tempo-- ral, a la organización tridimensional característica del proceso de desarro-- llo, ha sido estudiada en D. discoideum, hongo mucilaginoso que pertenece a la subdivisión Acrasiogymnomycotina. Así se ha estudiado el tipo de comunica-- ción entre las células, proceso que juega un papel importante en la morfogē-- nesis.

### 1.1. CARACTERISTICAS GENERALES DE ACRASIOGYMNOMYCOTINA.

División : Gymnomycota

Subdivisión : Acrasiogymnomycotina

Clase : Acrasiomycetes  
 Orden : Dictyosteliaceae  
 Género : Dictyostelium  
 Especie : discoideum

Son los llamados hongos mucilaginosos. Sus tallos consisten de células con pared y son un grupo de organismos raramente vistos, a causa de sus delicadas e inconspicuas fructificaciones efímeras y su fase somática microscópica. La unidad estructural de los Acrasiomycetos es una myxamiba uninucleada sin pared celular y haploide, cuya alimentación depende de la fagocitosis de bacterias. A este tipo de organismo pertenece D. discoideum.

Las amibas de este grupo de organismos, tienen la característica de agregarse y formar un pseudoplasmodio ( es un agregado de células pertenecientes a los hongos mucilaginosos ) que después dará origen a un cuerpo fructífero ( estructura especializada del hongo, la cual contiene esporas derivadas de un proceso asexual o sexual. ), en el cual las células no se fusionan y retienen su individualidad, cooperando como miembros de una comunidad bien organizada, hasta que la esporulación ocurra.

Los cuerpos fructíferos de los Acrasiomycetes, los llamados sorocarpos, varían desde los microscópicos como los del género Gultulinopsis, a las delicadas pero relativamente largas fructificaciones ramificadas de Polysphondylium, el cual puede alcanzar una longitud de un centímetro o más. El sorocarpo de algunas especies es simple, constando de una cabeza sencilla -

de esporas sobre la punta de un tallo. En otras especies son variables las ramificaciones, y la relación de las cabezas de esporas en la punta de cada ramificación.

Dictyostelium toma su nombre del hecho de que el tallo de su cuerpo fructífero multicelular parece como una red, formada de las paredes de las amibas vacuoladas de las cuales esta formado el tallo.

Las especies de Dictyostelium son comunes en el suelo, y pueden ser aisladas por extensión sobre agar no nutritivo junto con células de una adecuada bacteria que sirva de alimento, tal como Klebsiella aerogenes. La amiba de Dictyostelium coloniza la superficie del agar, fagocitando las bacterias que le sirven de alimento.

## 1.2. DESARROLLO DE D. discoideum.

La fase vegetativa de D. discoideum es fácilmente distinguible de la fase de desarrollo (diferenciación), la cual consta de varias etapas.

FASE VEGETATIVA.

Durante la fase vegetativa la amiba se mueve por medio de pseudópodos, los que se forman en cualquier parte de la superficie celular, e ingiere bacterias conforme se va moviendo. Cuando las bacterias, las cuales son incapaces de multiplicarse sobre un medio no nutritivo, han sido consumidas la amiba se agrega en forma de pseudoplasmodio multicelular, que posteriormente se diferenciará para formar cuerpos fructíferos o sorocarpos.

Cuando se trabaja en forma experimental, es importante que la bacteria que le sirve de alimento a D. discoideum no crezca muy rápidamente sobre el medio de cultivo, ya que se podría llevar a cabo la fermentación sobre la superficie del agar y cambiar el pH; por lo anterior, es importante alcanzar un balance de azúcar, peptona y amortiguador, lo que permitirá que la bacteria pueda crecer sin que el pH varíe más allá de  $\text{pH} = 6.0$  ( que es el pH óptimo ) y que tampoco se vea alterada la fuerza iónica ( Newell, Teller y Sussman, 1969 ). Una solución al problema anterior, es el uso de Klebsiella aerogenes, la cual produce pocos productos de fermentación ácidos.

Las amibas vegetativas son apolares, o sea la amiba no presenta distinción antero-posterior, por lo que no se observan movimientos unidireccionales hacia algún sitio en el que se encuentre algún estímulo. De esta manera las amibas vegetativas solamente incrementan su tamaño y se dividen. Su tiempo de generación varía de 2 a 3 horas, siendo las amibas independientes una de otra. No existe evidencia de algún orden espacial o temporal en la población.

## INTERFASE

Cuando el alimento se acaba, el crecimiento cesa y las células son menos móviles, ocurriendo la división celular menos frecuentemente ( ocasionalmente se observa ). Después de un período de 8 horas, conocido como interfase, una nueva forma de comportamiento se observa, si es que la densidad de las amibas en el medio es suficientemente alta. Se presenta entonces la fase de preagregación.

## PREAGREGACION

En esta etapa las células se mueven individualmente y se distribuyen al azar comenzando a liberar AMPc. Simultáneamente, en las células aparece una polaridad, desarrollando la amiba una porción anterior y otra posterior. Esta polaridad parece ser una condición necesaria para la efectiva respuesta quimiotáctica a la señal de AMPc.

La amiba se mueve hacia el centro de agregación en respuesta a la señal de AMPc y toma una forma elongada, cambiando también sus propiedades de superficie celular, resultando en la adherencia de una célula con otra.

( fig. 1 ).

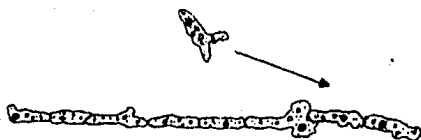


fig. 2. Desarrollo del sorocarpio de *D. discoideum*.

A-C Agregación  
D-H Migración  
I-N Culminación

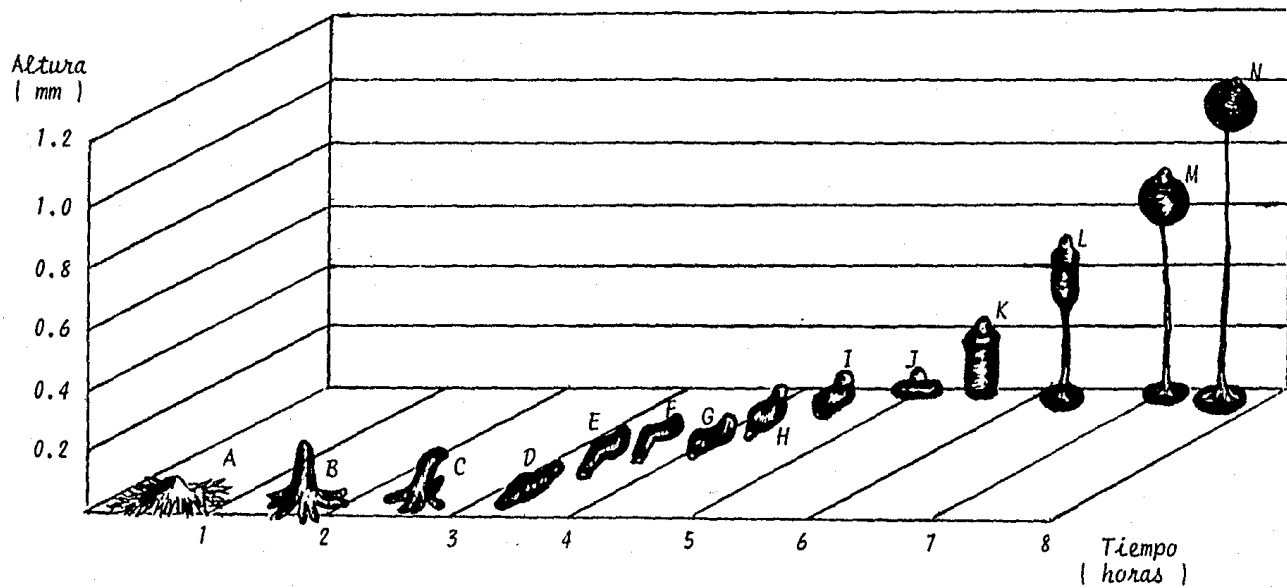




Fig. 1. Movimiento de las células. La flecha indica el movimiento.

Esta etapa comienza aproximadamente después de 8 horas de inanición y después de aproximadamente 2 horas más, se observa la formación de pseudo plasmodio ( ver fig. 2A. ) ( Sharpe, Treffry y Watts, 1982 ).

Parece que las amibas de D. discoideum en inanición tienen un circuito metabólico por el cual elaboran un sistema de transmisión de la señal entre las células. Aparentemente no existe distinción genética entre las células que están siendo simplemente distribuidas, con aquellas que sirven de centros de agregación.

Un aspecto importante de la transmisión de la señal es que la amiba entra en una fase de refracción, de no respuesta, por un período variable de 2 a 7 min., dependiendo del tiempo de desarrollo después de liberado el pulso de AMPc. Posteriormente el AMPc es rápidamente degradado por una fosfodiesterasa extracelular secretada por la amiba. Así se asegura la dinámica de propagación de la señal, con la posibilidad de la recurrencia de otra liberación de la señal. Quizá el período de refracción asegura de algún modo la propagación de la señal, y también parece ser que se establecen límites bien definidos, entre las amibas que marcan la agregación, con aquellas que simplemente se agregan ( Cohen y Roberston, 1971 ).

## AGREGACION

El movimiento de las amibas durante la agregación es en forma de ondas, que pueden ser círculos concentricos o espirales. Durante el proceso de la agregación, las amibas que se mueven en formas de " corrientes " ( forma de ondas ), se juntan para hacer contacto una con otra, formando una masa compacta de células apiladas, para formar un pseudoplasmodio que presenta un periodo de migración hacia la luz. La distancia de migración es de varios milímetros, a una velocidad aproximada de 2 mm/h. ( ver fig. 2A, 2B y 2C ).

En el estado temprano de migración hay poca diferencia visible entre las células que forman el pseudoplasmodio; pero posteriormente 2 tipos de células pueden ser distinguidas; un grupo de células posteriores pequeñas, con un aparente línea de demarcación con el otro grupo de células anteriores mas largas ( ver fig. 3 ). Las propiedades de tinción de ambos grupos de células también son diferentes; las células de la parte anterior toman con menos facilidad la hematoxilina que las células de la parte posterior.



Fig. 3. Pseudoplasmodio presentando 2 tipos de células.

Las células anteriores o pretallo, son destinadas a ser células tallo, mientras que las células posteriores o preesporas, son destinadas a -- ser esporas. La actividad metabólica de estos 2 tipos de células son diferentes.

#### POST-AGREGACION

La migración del pseudoplasmodio es de unas pocas horas. El final de la fase de migración está marcado por el redondeamiento y erección del - pseudoplasmodio, para formar una estructura cónica, la cual abriga el desarrollo posterior para la diferenciación dentro del tallo multicelular y el soroco ( que es una masa de esporas o esporangio ) ( ver fig. 2D, 2E, 2F, 2G, -- 2H ).

#### PRECULMINACION

Esta etapa se inicia cuando el agregado presenta la forma de " sombrero mexicano " ( ver fig. 2 J ) y el pseudoplasmodio deja de migrar.

#### CULMINACION

El sorocarpio se forma en el estado final del desarrollo ( ver fig. 2M, 2N ): El sorocarpio consiste de 4 tipos de células: aquellas que forman el disco basal ( también llamadas células de retaguardia ), células que permanecen en forma amiboidea, células del tallo multicelular y las células es

poras. La proporción entre las células tallo y esporas es de ( 1:2 ), siendo bastante constante sobre un rango considerable de tamaños.

Las células del tallo presentan una vaina formada por celulosa. Durante el estado final de la diferenciación, las células tallo mueren debido a la degeneración de su núcleo. Las esporas que son cilíndricas, germinan después de pocas horas cuando son colocadas sobre un medio fresco con bacterias; se presenta una especie de ranura a un lado de la espora y la amiba emerge.

El proceso de desarrollo total toma de 30 a 40 horas, y significa la transformación de una población desorganizada de amibas individuales, a una organización espacial diferenciada de cuerpos fructíferos.

### 1.3. REPRODUCCION

D. discoideum presenta 2 tipos fundamentales de reproducción: asexual y sexual.

#### REPRODUCCION ASEXUAL.

La reproducción asexual algunas veces llamada somática o vegetativa, no involucra la unión del núcleo, células sexuadas u órganos sexuados. Cuando

do la amiba se alimenta y crece, se divide llevando a cabo mitosis seguida por la citocinesis que finalmente resulta en la separación de 2 amibas uninucleadas. Las divisiones se suceden rápidamente y generalmente continúan tanto tiempo como el alimento está presente y las condiciones son favorables.

La citocinesis incluye aquellos eventos - aparte de la división nuclear ( ejemplo: mitosis, meiosis ) - que ocurren durante la división de una célula eucariótica. Tales eventos son la distribución del citoplasma - ( y organelos citoplasmáticos ) y la síntesis de nuevo material de la membrana celular.

Al transferir a la amiba a un medio fresco donde la bacteria que le sirve de alimento abunda, la fase somática de este organismo puede ser perpetuada indefinidamente bajo condiciones de laboratorio ( ver fig. 4 ).

La reproducción asexual es la más importante para la propagación de las especies, porque resulta en la producción de numerosos individuos, además de que el ciclo asexual se repite varias veces, mientras que el estado sexual se presenta pocas veces.

#### REPRODUCCION SEXUAL.

Es caracterizada por la unión de 2 núcleos. La amiba se agrega pa-

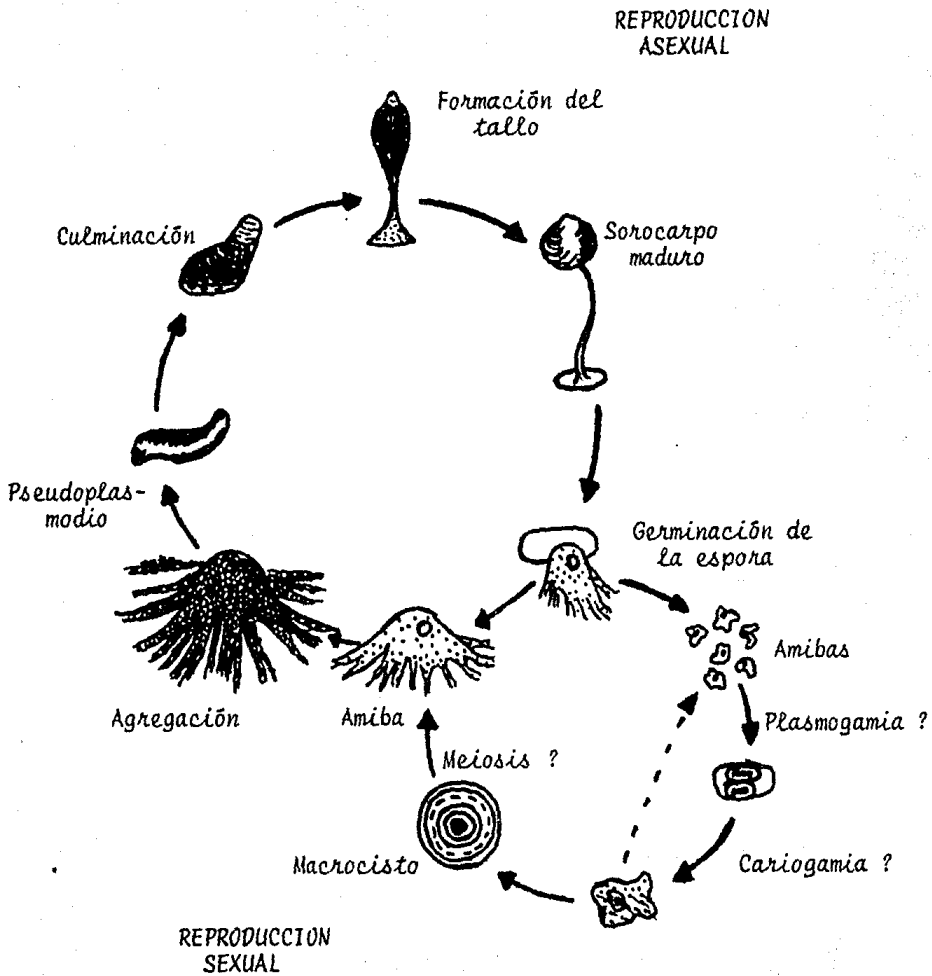


Fig. 4. Representación del ciclo asexual y sexual de *D. discoideum*.

Los signos de interrogación indican que no se sabe con certeza si se lleva a cabo ese evento.

ra formar grandes cúmulos de células. En el centro de esta población una célula gigante engloba a las amibas que se encuentran alrededor y secreta una pared gruesa, consistente de varias capas. Este es el macrocisto. La célula gigante es el primer binucleado, que posteriormente debido a la cariogamia ( la unión de 2 núcleos para formar uno ), se observa como una célula uninucleada ( ver fig. 4 ).

Durante el desarrollo del macrocisto, se forman estructuras parecidas a complejos sinaptonemales en los núcleos. Estos complejos son estructuras formadas por el apareamiento estrecho de cromosomas homólogos, que entran en sinapsis o se conjugan. El significado del complejo sinaptonemal es desconocido, pero se cree que tiene que ver en el alineamiento de los cromosomas homólogos y puede estar involucrado en su entrecruzamiento. La aparición posterior de varios núcleos indica que se lleva a cabo la meiosis con sucesivas divisiones mitóticas ( Erdos, Nickerson y Raper, 1972 ).

Los macrocistos germinan y liberan amibas que se multiplican, restableciendo la fase somática del hongo mucilaginoso y procede a la formación del sorocarpo, o a más macrocistos dependiendo de las condiciones que prevalezcan ( Erdos, Nickerson y Raper, 1973 ).

En los capítulos posteriores se revisarán con más detalle algunos de los aspectos más importantes que establecen la diferenciación celular en D. discoideum.

## CAPITULO II



## FACTORES QUE REGULAN LA DIFERENCIACIÓN CELULAR.

### 2.1. DISTRIBUCION CELULAR.

Va desde 1944 Bonner había propuesto que en el agregado celular, durante la diferenciación, las células que forman la parte anterior del agregado daban lugar a las células tallo, y aquellas células pertenecientes a la parte posterior, eran las que daban lugar a las esporas, por lo que sugirió que existía un polaridad en el agregado celular.

En la etapa de pseudoplasmodio se detectó esta polaridad celular, ya que durante la agregación, las células se mueven unidireccionalmente hacia los centros de agregación, o sea que existe una parte de la célula que es la que siempre se dirige a la fuente de agregación. Futrelle ( 1982 ) - observó que existe una distinción entre la parte anterior y la parte posterior del agregado. Trabajos anteriores habían indicado que la distribución era probablemente guiada por una respuesta quimiotáctica diferencial al AMPc ( Sternfeld y David, 1981 ).

Mac Williams y Bonner ( 1979 ) se habían preguntado, ¿ como una población no diferenciada de amibas, daba lugar a 2 poblaciones de células especializadas ?. Y así se propusieron 2 teorías:

1.- La diferenciación celular no se inicia hasta el momento en el que, en el agregado, se presenta una polaridad antero-posterior, por lo que la ameba dentro del agregado puede responder a alguna forma de "información posicional" y así llevarse a cabo la diferenciación hacia uno y otro tipo de células que constituyen el sorocarpo.

2.- La polaridad es una condición posterior a la diferenciación, - por lo que el factor posición no influye para determinar que tipo de células se formarán. La distribución de 2 tipos celulares conduce al establecimiento de la polaridad en el pseudoplasmodio, colocándose las células preta-lló en la parte anterior y las células preespora en la parte posterior.

Sharpe ( 1982 ) estudió los cambios que ocurren en las propiedades de la superficie de la membrana de D. discoideum, para así poder determinar si la diferenciación celular es anterior o posterior al establecimiento de la polaridad en el agregado celular.

Para saber si la diferenciación ha ocurrido, Sharpe tomó en cuenta las propiedades de superficie de las membranas de las células, y observó la heterogeneidad celular presente a diferentes tiempos, antes de la agregación y durante la agregación, utilizando la técnica de distribución contracorriente en un polímero.

Esta técnica de distribución contracorriente en un polímero se basa en la ley de Nernst, la cual establece que una sustancia se distribuye en-

tre 2 disolventes hasta que en el equilibrio se alcanza una relación constante de las actividades de la sustancia en las 2 capas, para una temperatura establecida.

Para la separación de las células se usaron soluciones de polietilenglicol ( polímero no iónico ) y dextran ( polímero no iónico, poliglucosa ramificada ), mezcladas a ciertas concentraciones, para así formar 2 fases acuosas inmiscibles ( Fisher y Derek, 1981 ): la de arriba rica en polietilenglicol y la de abajo rica en dextran; ambas fases son altamente hidratables y pueden ser amortiguables e isoosmóticas. La viscosidad de las 2 - fases puede ser marcadamente diferentes, sin que esto influya en la partición. Una fase no debe estar positivamente cargada con respecto a la otra, o sea que el potencial debe ser cero.

Células y organelos añadidos a tal sistema se distribuyen entre las 2 fases y la interfase horizontal. Dependiendo de la composición y concentración de los polímeros y sales presentes, la partición de las células parece depender, o de la carga de la membrana, o de las propiedades hidrofóbicas de la membrana celular.

Se puede obtener un índice de las propiedades de las células por medición de la distribución de las células entre las fases y la interfase. - Esto puede ser usado para seguir los cambios en las propiedades de las células durante la diferenciación celular. Si 2 tipos celulares son marcadamente diferentes, la distribución en contracorriente los separa, basada en las

propiedades de superficie celular. Este es un método sensible, ya que se llevan a cabo múltiples particiones, detectándose cambios sutiles en la superficie celular ( Derek, 1981 ).

Utilizando el método de distribución, Sharpe et al ( 1982 ), encontraron cambios en las propiedades de superficie celular durante la formación de los 2 tipos celulares que aparecen durante la agregación; las células preesporas y las células pretallo. Estos cambios pueden ser relacionados con cambios en la composición glicoproteica de la membrana celular, que ocurren durante el desarrollo temprano de D. discoideum ( Toda, Ono y Ochiai, 1980 ).

Sharpe et al. ( 1982 ), observaron que la distribución de las células, después de 8 horas de iniciada la inanición de las amibas, era extremadamente heterogenea, y que a las 10 horas las 2 poblaciones separadas de la amiba estaban agregándose, por lo que parece que la polaridad antero-posterior, no es requerida para que se inicie la diferenciación celular durante el desarrollo de D. discoideum, ni que se requiera de una información posicional.

Concurrentemente Sharpe et al. ( 1982 ), también encontraron que durante la fase estacionaria del desarrollo, a las 6 horas de iniciada la inanición, se llegaron a formar agregados en donde no se detectaron cambios en las propiedades de superficie celular. Por esto se dedujo que la agregación no es, en sí misma, el estímulo para iniciar la diferenciación.

Sternfeld y David ( 1981 ), más bien pensaron que esta distribución era guiada por la respuesta quimiotáctica diferencial al AMPc.

## 2.2. CAPACIDAD DE REGENERACION CELULAR EN EL PSEUPLASMODIO.

Un claro patrón de 2 tipos celulares es observado en el pseudoplasmodio de D. discoideum. La proporción de estos 2 tipos celulares permanece casi constante, conservándose una proporción de células anteriores y posteriores de aproximadamente 1:2 en un amplio rango de tamaños del pseudoplasmodio ( Parthier y Lerbs, 1982 ).

Raper ( 1940 ) y Bonner ( 1952 ), observaron que el pseudoplasmodio presentaba un patrón de regeneración. Si la proporción de las células era alterada en forma experimental, por ejemplo, si de un pseudoplasmodio se se para, ya sea la parte posterior o la anterior, se observa que las células -pretallo pasan a preespora o viceversa.

Los hechos anteriores condujeron a Sternfeld y David ( 1981 ) a hacer un estudio de esta regeneración, con lo que pudieron identificar una población distinta de las células posteriores, cuya localización fué a través de toda la región posterior.

Cuando se aísla el tejido posterior ( en forma experimental ), es--

tas células distintas a las células posteriores restauran la proporción normal antero-posterior del pseudoplasmodio, por lo que parecen estar involucradas en la regulación de la proporción ( Bonner, 1957; Mac Williams y Bonner, 1979; Williams et al., 1981 ).

Citológicamente estas células son similares a las células anteriores, y parecen ser las responsables de la regeneración del pseudoplasmodio. Por esto se les llamó células " anterior-like " ( o de tipo anterior ).

Estas células comprenden un poco más del 10% de la masa celular en desarrollo; se distribuyen a lo largo del eje antero-posterior, pero se encuentran más situadas en la porción ventral de la parte posterior del pseudoplasmodio, que en la dorsal.

Estas células se mantienen estables por largos períodos de migración y dan lugar a las células tallo en el cuerpo fructífero ( Sternfeld y David, 1982 ). La proporción de las células de " tipo anterior " , parece variar con la edad del pseudoplasmodio ( Takeuchi, 1977 ), tamaño del pseudoplasmodio e intensidad de iluminación usada para inducir la migración ( Frausworth y Loomis, 1976 ).

Sternfeld y David ( 1982 ), separaron la parte anterior del pseudoplasmodio y observaron que las células de " tipo anterior " de la parte posterior se distribuyeron hacia la parte anterior, para así diferenciarse en células tallo. En pseudoplasmodios con proporción normal de células pretallo

y preespora, las células de tipo anterior permanecen en la región posterior, pareciendo que su distribución hacia la parte anterior es inhibida por la presencia del tejido anterior, lo que se demostró al colocar estrechamente el tejido anterior con el posterior, pero sin que hubiera contacto. Puede inhibirse el patrón de regeneración y las células de " tipo anterior " no se distribuyen.

Va antes Sternfeld y David ( 1981 ), asumieron que las células de " tipo anterior " no se distribuyen ( no migran hacia la parte anterior ) - en los pseudoplasmodios con las proporciones normales de las células, debido a la influencia de un inhibidor presente en la región anterior. Cuando el inhibidor es eliminado por liberación de las células anteriores, las células de " tipo anterior " adquieren la habilidad de distribuirse. Las células de " tipo anterior " se tiñen con colorantes vitales de la misma manera que las células anteriores y no son quimiotácticamente sensibles al AMPc cuando existe la proporción normal de células en el agregado.

En ausencia del inhibidor secretado por las células anteriores, las células de " tipo anterior " desarrollan sensibilidad quimiotáctica al AMPc y su comportamiento de distribución es similar a las células anteriores.

Va que la distribución en el pseudoplasmodio es inhibida por un factor difusible producido por las células anteriores, esto sugiere que la producción del inhibidor decrece durante la formación del cuerpo fructífero, durante la diferenciación de las células pretallo a células tallo. Por es-

to, durante la culminación las células de " tipo anterior " se distribuyen en 2 grupos; uno principal que se distribuye hacia la región anterior, y el otro menor hacia la parte trasera del pseudoplasmodio, donde se localizan las células predisco basal.

En ausencia del inhibidor secretado por las células anteriores, la distribución de las células de " tipo anterior " es aparentemente guiada -- por el AMPc. Esto indica que las células predisco basal, así como las células anteriores, son una fuente de AMPc ( Sussman y Schindler, 1978 ). La mayoría de las células de " tipo anterior " permanecen como amibas no diferenciadas, localizadas en el ápice y base del soro ( Sternfeld y David, 1982 ).

La separación experimental de la región anterior causa la rápida re diferenciación de las células de " tipo anterior ". Existe la interconversión de células anteriores, de " tipo anterior " y células preespora, pero no es claro como se regulan las proporciones.

Se consideran 2 posibilidades generales:

1.- La posibilidad de que la conversión de:

a) " tipo anterior "  $\longleftrightarrow$  pretallo

b) preespora  $\longleftrightarrow$  " tipo anterior "

sean controladas por los mismos factores directamente acoplados a la pérdida de la región anterior ( ya sea porque experimentalmente se separe la re-



gión anterior, o porque por una larga migración del pseuplasmodio se pier--  
dan células ).

2.- La existencia de 2 mecanismos independientes que regulen la --  
conversión:

a) " tipo anterior "  $\longleftrightarrow$  pretallo  
y el otro:

b) preespora  $\longleftrightarrow$  " tipo anterior "

Si fuera así, este mecanismo permitiría alteraciones en las relati--  
vas proporciones de los 3 tipos celulares.

En tejidos sumergidos, Sternfeld y David ( 1981 ), y con algunas mu--  
tantes Mac Williams ( 1982 ), encontraron separadamente, que las proporcio--  
nes alteradas de los tejidos anterior y posterior, no fueron acompañadas --  
por cambios paralelos en la proporción de las células de " tipo anterior ".  
La concentración de las células de " tipo anterior " permaneció bastante ---  
constante, por lo que quizá 2 mecanismos independientes pueden estar involu--  
crados.

Parece que las células de " tipo anterior " juegan un importante pa--  
pel en la proporción de las células, así como en su habilidad de retener el  
movimiento amiboideo, ayudando de esta forma en el proceso de culminación,  
por elevación de la masa de la preespora a lo largo del tallo ( Sternfeld  
y David, 1982 ).

### 2.3. RESPUESTA DE LAS CELULAS AL AMPc.

Durante la adición de AMPc al agregado celular se inducen varias -- respuestas, tales como la entrada de  $Ca^{++}$ , un incremento de los niveles de GMPc, la metilación de proteínas y fosfolípidos, la acumulación de cadenas pesadas de miosina desfosforilada, la excreción de protones y la producción y liberación de AMPc ( Van Hasstert y Konijn, 1982 ).

Durante la migración de las células a la fuente de AMPc, la señal -- de AMPc es transmitida a través de todas las células, presentandose alteraciones conformacionales de los constituyentes de la membrana celular, aunque también es posible -- sin que todavía este comprobado -- que elementos -- del citoesqueleto estan involucrados como respuesta al AMPc para permitir -- la migración hacia la fuente de AMPc ( Parthier y Lerbs, 1982 ).

Junto con la respuesta de migración, se nota una inmediata caída en el pH extracelular en conexión con la liberación de protones. Asimismo se puede medir un rápido flujo dependiente del AMPc de iones  $Ca^{++}$  ( Wick, Malchow y Gerisch, 1978 ). Este catión es parcialmente liberado consistentemente con la periodicidad del movimiento celular y la producción de AMPc -- Parece ser que el  $Ca^{++}$  es necesario para activar la adenilato ciclasa, ya -- que la quelación del  $Ca^{++}$  con EDTA suprime la emisión de la señal sin que -- se afecte la quimiotaxis, la agregación celular y la sensibilidad de las células al AMPc externo. Aún no se sabe si el  $Ca^{++}$  ejerce su acción estimula

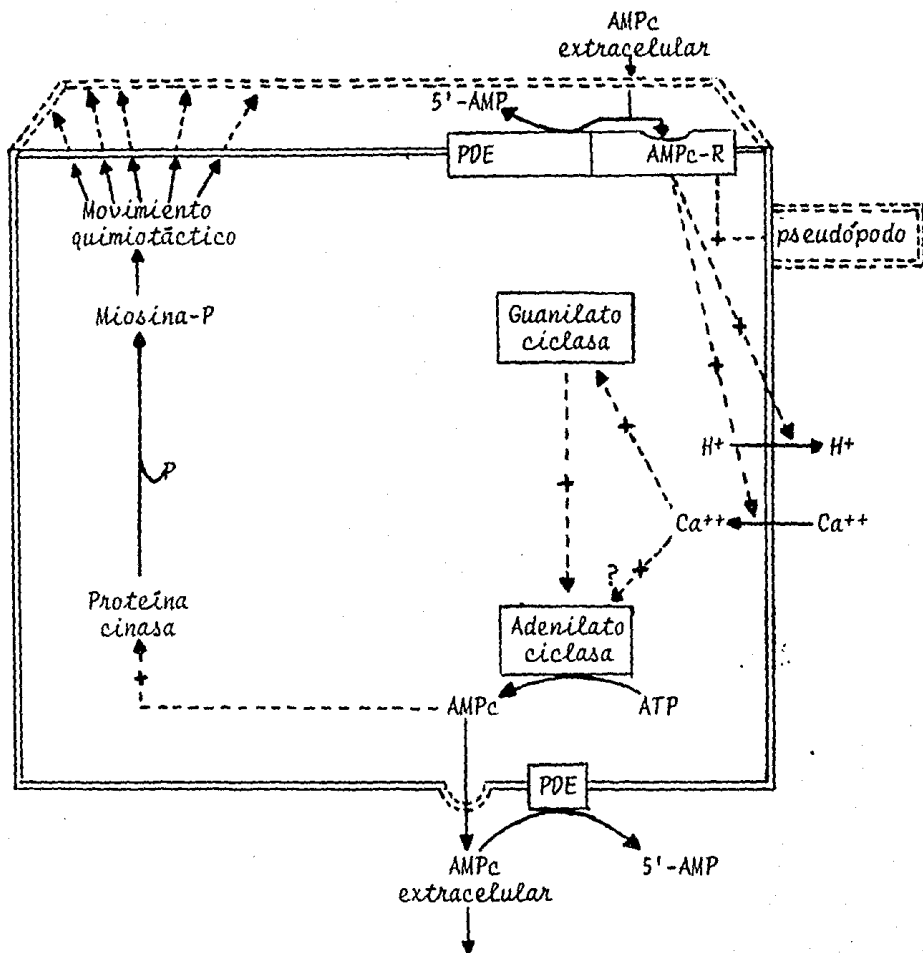


Fig. 5. ESQUEMA SOBRE LA TRANSFORMACION DE LA SEÑAL Y RESPUESTA CELULAR - DESPUES DE LA ADICION DE AMPc A D. discoideum.

----- Flujo de sustancias.

----- Efecto estimulatorio sobre el proceso y sobre la actividad de en

zimas.

PDE = Fosfodiesterasa.

AMPC-R = AMPC unido a proteína.

El AMPC extracelular en la amiba, puede ser unido como AMPC-R ( o parcialmente degradado a 5'-AMP por la PDE ), lo cual causa un efecto a corto plazo ( de pocos segundos ) sobre la liberación de  $H^+$ , entrada de  $Ca^{++}$  y la formación del pseudópodo. La adenilato ciclasa es activada vía  $Ca^{++}$  y se produce la activación de la guanilato ciclasa en los siguientes minutos, dando lugar a nueva formación de AMPC que probablemente provoque el movimiento quimiotáctico de las células. Este AMPC formado en el interior de la célula es expulsado y sirve para las células vecinas.

toria directamente sobre la adenilato ciclasa, o vía activación de la guanilato ciclasa o alguna reacción todavía desconocida ( Parthier y Lerbs, --- 1982 ) ( ver fig. 5 ).

La amplificación de la señal de AMPc externo por activación de la adenilato ciclasa y la propagación y transformación de la señal, conduce al movimiento quimiotáctico de las células. La transformación de la señal para inducir el movimiento termina en el aparato contractil de la célula. Su movimiento está mediado por actina y miosina.

Otra de las modificaciones en la estructura celular que se observan por la adición de AMPc es la metilación de proteínas y de fosfolípidos ( Ma to y Marin-Cao, 1979 ) y la fosforilación de una cadena pesada de miosina ( Rahmsdorf, 1979 ). Estas modificaciones están involucradas en el movimiento del  $Ca^{++}$  intracelular, que eventualmente conduce a la activación de la ATPasa dependiente de la actina y al incremento de contractibilidad. El movimiento de las células parece ser el resultado de 2 procesos: contracción general del citoplasma y dilatación local de la membrana de las células.

La producción de respuestas mediadas por el AMPc y la excreción de AMPc, revelaron que la transmisión de la respuesta es controlada por un proceso de adaptación ( Devreotes, Dustini y Steck, 1979 ; Dinauer, Steck y Devreotes, 1980 ) o sea, las células reaccionan a un incremento de la concentración de AMPc extracelular debido a que se ajustan a la concentración an-

terior; cuando en forma experimental se aplica un estímulo de AMPc y al minuto se aplica el mismo estímulo, no se observa respuesta, por lo que es necesario incrementar la concentración del siguiente estímulo para que vuelva a reaccionar. Como veremos más adelante, la adaptación a la respuesta transmitida es esencial durante la agregación celular en D. discoideus ( Tonichik y Devreotes, 1981).

La unión del AMPc a sus receptores de superficie celular ( Hender--son, 1975) conduce a una transitoria activación de la adenilato ciclasa, y a un incremento del AMPc intracelular, seguido prontamente de su secreción ( Dinauer, 1979 ). Cuando el AMPc intracelular ( producido por la célula ) es liberado, el AMPc extracelular se disocia de sus sitios de unión en pocos segundos ( Mullens y Newell, 1978 ); por lo tanto el AMPc intracelular rápidamente declina a valores bajos ( Dinauer, 1979 ). Aún cuando el estímulo de AMPc extracelular sea mantenido constantemente, la activación de la adenilato ciclasa es transitoria.

El mecanismo por el cual la amiba termina su respuesta al AMPc extracelular ha sido referido como adaptación. Este mecanismo presumiblemente -- sirve para prevenir a las células de responder indefinidamente a sus propias secreciones, las cuales podrían romper la respuesta intracelular. La adaptación parece reflejar el ajuste de la sensibilidad celular a la concentración ambiental de AMPc extracelular. En células adaptadas no existe respuesta al estímulo de AMPc cuando la concentración de éste es igual a la del estímulo de AMPc anterior, pero son capaces de responder a concentraciones mayores de

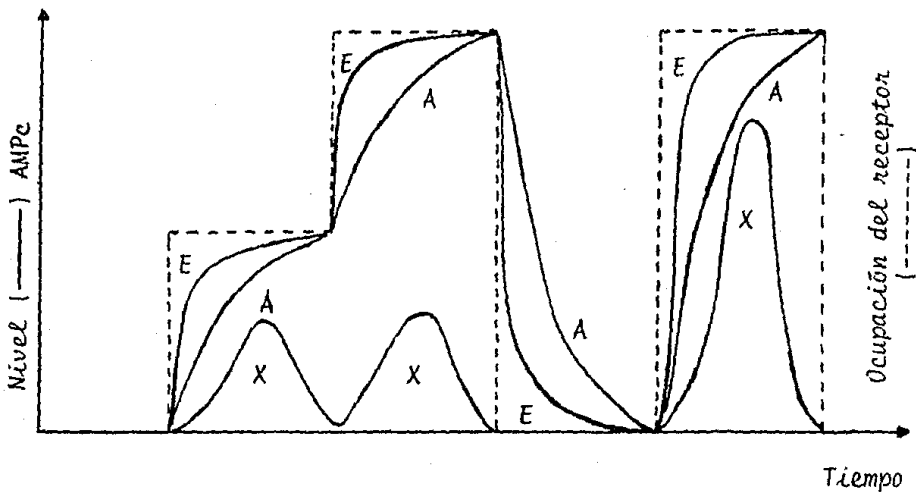
AMPC externo. La adaptación persiste en tanto el AMPc externo está presente, pero puede ser reversible por liberación del estímulo ( Dinauer et al. 1980 ). Esto explica por qué Devreotes y Steck ( 1979 ) observaron la desaparición de la transmisión de la respuesta aún en presencia de un estímulo constante y prolongado.

La respuesta a un incremento de AMPc extracelular en células adaptadas esta dado por el incremento neto en ocupación del receptor. El AMPc secretado por las células, en una serie de incrementos consecutivos de -- AMPc extracelular, es aproximadamente igual al que produce el estímulo de la concentración más alta en la serie ( Devreotes y Steck, 1979 ). A este fenómeno se le llama aditividad, por lo que la respuesta a los sucesivos - incrementos en los estímulos esta limitada por el nivel preexistente de adaptación.

La ocupación de los receptores de AMPc determina el nivel del proceso de excitación y el de adaptación. La adaptación se contrapone con la excitación. La excitación conduce a la activación de la adenilato ciclasa y la adaptación bloquea tal activación ( Dinauer, Steck y Devreotes, 1980 )

La célula se adapta a un estímulo constante después de varios minutos. La respuesta a la señal cesa a causa de un decremento en la sensibilidad celular. La regulación de la producción de AMPc en D. discoideum - presumiblemente involucra varios pasos entre la unión del AMPc a sus receptores de superficie y el proceso celular que directamente controla la acti

vación transitoria de la adenilato ciclasa. Por otro lado, la recuperación de la respuesta involucra un incremento progresivo en la sensibilidad de las células al AMPc. La desadaptación comienza tan pronto como el estímulo es liberado. La ocupación de receptores específicos en el nivel de adaptación se mantiene hasta que el estímulo es liberado.



E = excitación

A = adaptación

X = parámetro que determina la cantidad de adenilato ciclasa.

#### FLUJO DE LA SEÑAL DE AMPc

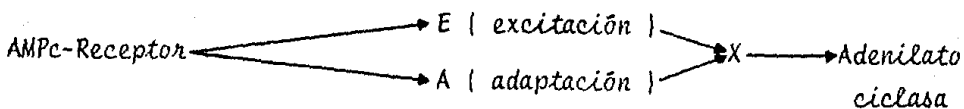


Fig. 6. El relativo exceso de excitación comparado con el de adaptación -



en cualquier instante, es reflejado en el valor de un parametro  $X$ , que determina la cantidad de adenilato ciclasa. Un incremento en la concentración de AMPc extracelular, incrementa el nivel de excitación y adaptación, elevándose sus niveles a una velocidad proporcional al incremento de ocupación del receptor, decaendo cuando los receptores estan vacios. ( Dinauer et al., 1980 ).

El nivel de adaptación cae lentamente; en cambio la excitación debe liberarse rápidamente antes que el nivel residual de adaptación, ya que la siguiente respuesta comienza.

La recuperación a la respuesta y el intervalo entre los 2 estímulos es reflejo del tiempo de desadaptación. Si durante el período de desadaptación se aplica un estímulo más grande, se podrían incrementar los niveles de excitación y adaptación, en una proporción más grande que el primero.

#### 2.4 INDUCCION DEL GMPc POR EL AMPc

En las siguientes 8 - 10 horas después de la inanición, las células amiboides de D. discoideum se vuelven menos sensibles al quimioatrayente de la fase vegetativa, el ácido fólico ( y/o pterina ( Parthier y Lebs, 1982) )

y en cambio más sensibles al AMPc, la sustancia química que regula la adhesión celular y la agregación durante el desarrollo temprano de la diferenciación ( Konijn et al., 1968; Pan et al., 1972; 1975; Varnun y Sall, 1981 )

Debido a que después de la inanición las células de D. discoideum forman complejos multicelulares y se diferencian en 2 tipos celulares ( pre esporas y pretallos ) se sugiere que la interacción celular ( la íntima asociación y la comunicación intercelular ) juega un importante papel en la diferenciación ( Okamoto, 1981 ).

La agregación celular es medida por quimiotaxis al AMPc ( Konijn et al., 1967 ). Las células agregadas probablemente detectan AMPc por medio de receptores de superficie celular ( Malchow y Gerish, 1979 ). La señal después de ser transformada, puede ser resíntetizada intracelularmente y liberada al medio, donde es disponible como una señal para otras células. De esta manera la señal es propagada por medio de las células como un sistema de retransmisión ( Parthier y Lerbs, 1982 ).

Landfear y Lodish ( 1980 ), revelaron que cuando los complejos multicelulares son disgregados experimentalmente, un número de cambios bioquímicos se inducen y las células no se diferencian; también observaron que estos cambios bioquímicos eran bloqueados al añadir AMPc, indicando que el AMPc revierte el efecto de la pérdida del contacto celular y promueve la diferenciación.

Gerisch ( 1975 ) y Wurster ( 1977 ), ya habían encontrado que cuando se suministraba AMPc en forma pulsada, a las células amiboides de D. discoideum, se estimulaba la agregación celular y que cuando estos pulsos de AMPc se suministraban a células diferenciadas, se inducían 2 incrementos sucesivos de GMPc observando que el segundo incremento de GMPc era acompañado de uno de AMPc, el cual se sabe es causado por la activación de la adenilato - ciclasa ( Ross y Gerisch, 1976 ). Las oscilaciones de AMPc se acompañaban de cambios periódicos de GMPc ( Wurster et al., 1977 ).

No se sabe si el segundo incremento de GMPc ( que es el más lento ) esta conectado al incremento de AMPc, pudiendo ser un agente causal o un efectual. El GMPc como agente causal podría ser responsable del incremento del AMPc y como agente efectual, podría ser que el GMPc fuera producido en respuesta a la liberación de AMPc ( Wurster, 1981 ).

Para observar el efecto de AMPc sobre la concentración de GMPc y la reacción celular, Wurster ( 1981 ) usó una mutante morfogénica, agip 53 - de D. discoideum, que no desarrolla las características de agregación, a menos que se trate con pulsos de AMPc por periodos de 2 a 4 horas ( Juliani y Kleiny, 1978 ).

Wurster ( 1981 ) observó la ausencia de un incremento agudo del AMPc intracelular, en respuesta a la aplicación de pulsos de AMPc extracelular, probablemente debido a un defecto en el receptor que media la activación de la adenilato ciclasa o a la adenilato ciclasa misma, o alguna de --

las reacciones entre el receptor de superficie celular y la adenilato ciclasa.

En células diferenciadas de agip 53, un pulso de AMPc produjo un incremento rápido en la concentración de GMPc, mientras que en células diferenciadas Ax-2 ( cepa de tipo salvaje de D. discoideum de la que se derivó agip 53 ) se observaron 2 sucesivos incrementos en la concentración de GMPc ( Wurster et al., 1977 ).

Si un defecto en el receptor que media la activación de la adenilato ciclasa puede impedir la producción de las señales de AMPc intracelular, entonces este no se libera al espacio extracelular y no se induce el desarrollo celular.

Ross y Newell ( 1981 ), encontraron que una mutante Stm F, que desarrolla gran agregación, mostró acumulación anormal de GMPc inducido por AMPc. Esto demostró el involucramiento del GMPc en la respuesta quimiotáctica.

Mato et al. ( 1977 ) y Wurster et al ( 1977 ), ya tenían evidencia de que el GMPc interviene en el sistema intracelular elevándose la concentración de GMPc dentro de los primeros 10 segundos de iniciada la estimulación con el AMPc en el agregado.

La activación de la adenilato ciclasa, parece ser causada por la -

guanilato ciclasa, primeramente activada como una respuesta a la adición de AMPc extracelular.

## 2.5 EL GMPc EN LA RESPUESTA CELULAR.

Mato et al., ( 1979 ), observaron que la estimulación quimiotáctica inducía un incremento de los niveles de GMPc a los 2 segundos; los niveles de GMPc alcanzaban un nivel máximo a los 10 segundos, y niveles de preestímulo eran recobrados cerca de los 30 segundos después de la estimulación.

Haastert y Heijden ( 1983 ), observaron el nivel máximo de GMPc a los 10 segundos de la estimulación. Cuando a tiempo 0 segundos aplicaban diferentes concentraciones de AMPc vieron acumulación de GMPc dependiente de la dosis de AMPc; sin embargo, a los 30 segundos la misma concentración de AMPc que produjo el máximo incremento nunca indujo una nueva acumulación de GMPc, al menos que esta concentración fuera más alta induciéndose una nueva acumulación de GMPc.

Para explicar lo anterior se consideró nuevamente el mecanismo de adaptación; los quimioatrayentes inducen una respuesta de excitación rápida y una respuesta de adaptación lenta; la acumulación de GMPc depende del balance de excitación y adaptación, y termina tan pronto como el nivel de adaptación excede el nivel de excitación ( Devreotes et al., 1979; Dinauer -

et al., 1980 ). El hecho de que las células nunca reaccionen a un estímulo inmediatamente, cuando la concentración de AMPc fué la misma que el primer estímulo y que las células respondan siempre al segundo estímulo, cuando la concentración es más alta que el primero excluye insensibilidad celular. - Esto esta de acuerdo con el mecanismo de adaptación, ya que es una respuesta del todo a del nada ( Haastert y Heijden, 1983 ).

La adaptación de la respuesta del GMPc mediada por el AMPc tiene 2 características en común con la excreción de AMPc mediada por el AMPc extracelular en D. discoideum ( Dinauer et al., 1980 ). Para ambas reacciones la magnitud de la respuesta y el nivel de adaptación son aditivos y ambos tienen similar velocidad constante de desadaptación.

La respuesta del GMPc siempre alcanza un nivel máximo a los 10 segundos después de la estimulación y niveles de preestímulo son observados - después de 20 segundos del nivel máximo. Mato et al. ( 1977 ) observaron - niveles de preestímulo hasta los 30 segundos después de la estimulación. - La respuesta del GMPc es independiente a la magnitud y duración del estímulo. Esto puede indicar que las alteraciones en el metabolismo del GMPc son iniciados por el AMPc, pero que el paso de las alteraciones son estímulos. - independientes ( Van Haastert y Van der Heijden, 1983 ),

Mato y Malchow ( 1978 ) mostraron que la respuesta del GMPc es producida por la activación de la guanilato ciclasa, más que por inhibición de una fosfodiesterasa intracelular. Van Haastert y Van der Heijden ( 1983 ),

describieron un probable proceso después de la adición del AMPc a la suspensión celular: en el espacio extracelular el AMPc es hidrolizado o es ligado a receptores de AMPc localizados sobre la superficie celular; la ocupación de receptores activa a la guanilato ciclasa produciendo un incremento de -- los niveles de GMPc. También se activa un proceso de adaptación por la ocupación de receptores que rápidamente ( 10 segundos ) termina. Así un incremento de los niveles de GMPc, causa que las células no respondan con un segundo estímulo de AMPc de la misma concentración del estímulo anterior. La hidrólisis de AMPc y su disociación de los receptores inicia la desadaptación. Las células gradualmente adquieren respuestas al AMPc.

## 2.6. EFECTO DE LA DISGREGACIÓN CELULAR EN EL PROCESO DE DIFERENCIACION.

Okamoto ( 1981 ) estudió el efecto que tiene la disgregación de las células en D. discoideum, cuando ya han formado el agregado celular durante la diferenciación en presencia de AMPc. Para la disgregación usó un medio que contenía glucosa, albúmina, AMPc y EDTA en un sistema de agitación. A pesar de la disgregación que ocurrió, el programa de diferenciación continuaba, observándose acumulación de un antígeno esporo-específico, por lo que las células preespora sí fueron formadas en este medio, sugiriendo que la formación de aglomerados no basta por sí misma para inducir la diferenciación.

Hay que hacer notar que existió una interacción previa por un corto tiempo en el medio con AMPc extracelular, y Okamoto observó que era necesario una previa interacción celular por un cierto tiempo, para la diferenciación posterior de las células disgregadas. Era probable que aquí fuera donde se iniciara la diferenciación y posteriormente esta pudiera proceder sin necesidad del contacto celular. En este medio, la presencia de AMPc fué necesaria para que se llevara a cabo la diferenciación. Por otra parte Kay - et al., ( 1977 ) trabajando con cultivos sumergidos de la cepa NC4 ( cepa de tipo salvaje ) observaron que la diferenciación celular se llevó a cabo aún sin añadir AMPc extracelular, y que la adición de AMPc extracelular solamente estimuló el proceso ( solamente el AMPc secretado por las células fué el requerido ). Posteriormente Kay ( 1982 ) trabajó con otra cepa de tipo salvaje ( V12M2 ), y mostró que estas eran capaz de diferenciarse en células preespora cuando se encontraban en una solución de sales con pulsos de AMPc. Por lo anterior Kay concluyó que el contacto célula-célula no era necesario, y que el AMPc era inductor de la formación de la espora.

Aún así, no se ha demostrado con precisión si el contacto célula-célula es, o no es necesario, para la diferenciación de D. discoideum. Lo -- que sí es evidente es que el AMPc es una molécula necesaria para que se lleve a cabo la diferenciación. Cuando aparece el antígeno se forma la espora y por lo tanto se lleva a cabo la diferenciación inducida por el AMPc.

Ishida ( 1980 ) encontró una mutante dev 1510, derivada de las célula



las NC4 de D. discoideum que es capaz de formar en su mayoría, células diferenciadas en esporas cuando se encuentran en un medio nutritivo a 21°C, y - en cambio, si en el estado temprano de la agregación se desarrolla sobre un medio pobre, con temperatura de incubación de 27°C, se para el desarrollo - antes de la formación del agregado y la mayoría de las células se diferencian en células tallo.

Posteriormente, Ishida ( 1982 ) trabajó con la misma mutante, pero en esta ocasión produjo cambios osmóticos en el medio de cultivo, más bien que cambios nutritivos, y observó que en los medios con baja fuerza iónica se formaban poblaciones homogéneas de células tallo.

Ishida sugirió por tanto, que cuando una sustancia involucrada en la formación de la espora se pierde en el agar ( baja fuerza iónica ), las células tienden a diferenciarse en células tallo y es posible que de algún modo la fuerza iónica alta prevenga la pérdida de esta sustancia.

## 2.7. OTRAS SEÑALES QUE INDUCEN LA DIFERENCIACION.

Ya hemos dicho que una de las señales que inducen la diferenciación es el AMPc, ya que este induce un número de productos de genes característicos ( Brachet y Pereira da Silva, 1975; Gersch et al., 1975 ).

Town y Gross ( 1978 ), Durston y Verk ( 1979 ) y Landfear y Lodish ( 1980 ), dicen que existen señales de AMPc que persisten en los estados -- multicelulares, donde sirven para inducir a un grupo de productos g $\acute{e}$ nicos.

Town et al. ( 1979 ) y Brookman et al. ( 1982 ), mostraron que la - formaci3n de c $\acute{e}$ lulas tallo es inducida por una combinaci3n de AMPc y una sus- tancia de bajo peso molecular ( factor inductor de la diferenciaci3n, DIF ). Debido a que el AMPc es un inductor inespec $\acute{i}$ fico para c $\acute{e}$ lulas tallo o espo- ras, DIF es el inductor espec $\acute{i}$ fico y Kay propuso que favorece la diferencia- ci3n de las c $\acute{e}$ lulas tallo, ya que cepas mutantes espor3genas ( que presen- tan mayor n $\acute{u}$ mero de c $\acute{e}$ lulas esporas ) fueron transformadas de c $\acute{e}$ lulas espo- ras a c $\acute{e}$ lulas tallo por preparaciones de DIF en presencia de AMPc.

La actividad de DIF no es detectable en c $\acute{e}$ lulas vegetativas; solo - se detecta durante el desarrollo temprano y parece acumularse en las c $\acute{e}$ lu- las con similar cin $\acute{e}$ tica a las enzimas post-agregativas como la glic3geno - fosforilasa y la enzima espec $\acute{i}$ fica de la preespora, UDP-galactosa polisac $\acute{a}$ - rido transferasa ( Brookman, 1982 ).

No se sabe si el AMPc induce DIF por activaci3n de alguna enzima -- preexistente, o por estimulaci3n de la s $\acute{i}$ ntesis de enzimas intermediarias - involucradas en la s $\acute{i}$ ntesis de DIF. Hay evidencia de que DIF es activo so- lamente en la v $\acute{i}$ a de diferenciaci3n del tallo, ya que no es requerido para la formaci3n de la espora. En el tiempo de acumulaci3n, cuando el patr3n - de c $\acute{e}$ lulas pretallo-preesporas esta siendo establecido, DIF puede ser un --

morfógeno difusible que dirige a las células dentro de la vía de las células pretallo, durante el establecimiento de este patrón.

Muy poco DIF es sintetizado o liberado por las células en ausencia de AMPc exógeno. Cuando el AMPc se añade a estas células, la activación de la fosfodiesterasa asociada a las células decrece, mientras que la glicógeno fosforilasa y la UDP-galactosa polisacárido transferasa se incrementa - ( Kay et al., 1979 ) junto con DIF, siendo ambas enzimas post-agregativas. Esto confirma la regulación de DIF con productos post-agregativos.

## 2.8. RELACION ENTRE EL AMPc, EL GMPc Y LA FOSFODIESTERASA EXTRACELULAR DEL AMPc.

Las células que presentan agregación competente reaccionan quimiotácticamente al AMPc ( Konijn et al., 1967 ) y las células en la fase vegetativa reaccionan quimiotácticamente al ácido fólico ( Pan et al., 1972 ). Ambos estímulos, resultan en una rápida y transitoria elevación de los niveles de GMPc intracelular ( Wurster et al., 1977 ).

Durante el período de transición de la fase vegetativa a la agregativa, la amiba de D. discoideum presenta cambios, tales como una elevación de la actividad de la adenilato ciclasa para la formación de AMPc ( Klein, 1976 ), de la fosfodiesterasa unida a la membrana que libera al AMPc unido

a sus receptores de superficie celular ( Malchow et al., 1972 ), y la observación de un decremento en la actividad de la fosfodiesterasa extracelular del AMPc, debido quizás a la secreción por las células de una glicoproteína específica inhibidora de esta enzima ( Ridiel et al., 1972 ). Pocas horas más tarde, nuevas actividades aparecen sobre la superficie celular, tales como sitios de contacto A ( csA ) ( que son receptores de la superficie celular involucrados en la agregación ( Beug et al., 1973 ) ), y receptores del AMPc ( Malchow y Gerisch, 1973 ).

Cuando las amibas preagregativas son tratadas con series de pulsos de AMPc, el tiempo de aparición de los csA, los receptores de AMPc y la fosfodiesterasa ligada a la membrana es acelerado ( Gerisch et al., 1975 ). La adenilato ciclasa es activada transitoriamente ( Ross et al., 1977 ) presentándose un incremento concomitante del AMPc intracelular ( Veh et al., 1978 ) o sea decrece el tiempo de interfase que es el tiempo desde el momento de la inanición hasta el momento en el que las células se vuelven sensibles al AMPc ( Klein y Darmon, 1977 ).

Mato et al. ( 1978 ) estudiaron la actividad de diferentes derivados del AMPc ( tales como 7-CH-AMPc y 3'-NH-AMPc ), observando que la quimiotaxis del receptor de AMPc, la acumulación del GMPc en la fase agregativa y la inducción de la fosfodiesterasa extracelular ( PDE ) en la fase post-vegetativa ( Van Haastert et al., 1981 ) eran idénticas para los diferentes derivados.

El receptor del AMPc parece ser un receptor de velocidad ( Van Haastert, 1981 ), lo que significa que la actividad del receptor es proporcional a la frecuencia de ocupación y no a la fracción de receptores ocupados ( Van Haastert, 1980 ). Esto puede explicar por qué la velocidad de disociación de los derivados del AMPc inducían más fosfodiesterasa que el AMPc en células post-vegetativas; y por qué tales derivados pueden incrementar los niveles de GMPc, sin que el AMPc logre niveles tan altos ( Van Haastert, Van der Mier y Konijn, 1981 ).

Van Haastert et al. ( 1982 ) estudiaron el papel del GMPc durante la inducción de la fosfodiesterasa, y observaron que la adición de quimioatrayentes tales como el AMPc, ácido fólico, pterina y derivados del AMPc a células post-vegetativas, inducían la acumulación del GMPc a los 10 segundos del estímulo, el cual fue similar en forma y secuencia a la inducción de la fosfodiesterasa ligada a la membrana celular.

Existe evidencia de que el GMPc tiene la función de mensajero en la inducción de la fosfodiesterasa del AMPc. Se sabe que el ácido fólico y el AMPc incrementan los niveles de GMPc e inducen la actividad de la fosfodiesterasa del AMPc, probablemente esta última es inducida por la unión del GMPc a un tipo de receptor.

Van Haastert et al. ( 1982 ) observaron que durante la inducción del GMPc, la concentración de la PDE inducida era 100 veces menor que la del GMPc y supusieron que esta diferencia se debía a que la ocupación del

receptor de superficie celular conducía a la producción de un segundo mensajero. Solamente pequeñas cantidades de este mensajero eran necesarias para completar la trasducción de la señal ( Strickland y Loeb, 1981 ).

En células agregándose, el AMPc induce varias respuestas y éstas -- tienen diferentes sensibilidades al AMPc. Van Haastert et al. ( 1982 ) pensaron que una proteína ligada al GMPc intracelular podría ser este segundo mensajero que funcionaría a muy bajas concentraciones. Probablemente el -- GMPc ejerza sus funciones por activación de proteínas que unen al GMPc intracelular.

Mato et al, ( 1979 ) mostraron que una de las proteínas que unen al GMPc también se unen al AMPc y otros nucleótidos, por lo que parece que la unión de esta proteína al GMPc no es específica. Las 2 proteínas que se unen específicamente al GMPc parecen ser diferentes en tamaño. Ya que el -- 50% de las proteínas de unión al GMPc ocupan una concentración de GMPc igual a  $1.4 \times 10^{-9}$  M y la concentración media basal de GMPc es aproximadamente de  $2 \times 10^{-7}$  M, entonces Van Haastert et al. ( 1982 ), pensaron en la existencia de 2 compartimientos del GMPc.

Un compartimiento I, que contiene todo el GMPc de las células sin -- estimular; y un compartimiento II que contiene las proteínas unidas al GMPc y el GMPc acumulado después de la estimulación quimiotáctica.

Las posibles funciones de la proteína unida al GMPc como mediadora

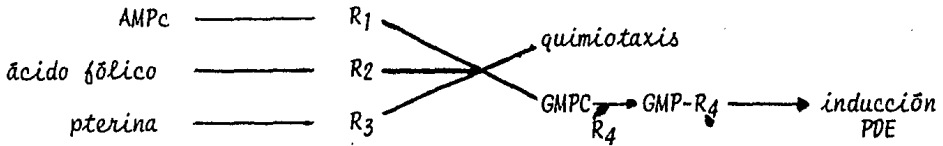
de la respuesta celular inducida por un quimioatrayente son: la inducción de PDE, respuesta al pH y quimiotaxis. Existen otras que no son únicamente mediadas por la proteína unida al GMPc, como son la adaptación, la transmisión de la señal y la metilación de proteínas, todas respuestas inducidas por el AMPc y la metilación de fosfolípidos inducida por GMPc.

La velocidad constante de disociación del GMPc y la proteína determina no solamente la velocidad a la cual esta información se pierde, sino también el periodo de tiempo después del cual nueva información puede ser almacenada.

Las oscilaciones autónomas del AMPc extracelular ocurren a una frecuencia de cerca de un pulso/5 min. ( Gerisch y Weck, 1975 ). Esto sugiere que cada uno de los pulsos de AMPc extracelular puede ser reconocido separadamente por la proteína unida al GMPc intracelular.

La relación entre la acumulación del GMPc y el GMPc unido a la proteína, está muy estrechamente correlacionada con la acumulación del GMPc y la magnitud de la inducción de PDE. Así, el GMPc en combinación con el GMPc unido a la proteína tiene exactamente la sensibilidad necesaria para enviar las señales quimiotácticas, lo cual sugiere la vía de transmisión siguiente:

## QUIMIOATRAVENTES



R = receptor

GMPC-R<sub>4</sub> = proteína unida al GMPC.

Existe evidencia que indica que el GMPC tiene una función de mensajero entre la activación de un receptor de superficie celular por un quimioatrayente y la inducción de PDE:

a) El ácido fólico y el AMPc incrementa los niveles de GMPC ( Mato et al., 1977; Wurster et al., 1977 ) e inducen PDE ( Bernstein et al., --- 1981 ).

b) El AMPc induce PDE y causa acumulación del GMPC, ambos dependiendo de la velocidad del receptor ( Van Haastert et al., 1981 ).

c) Existe una correlación casi igual entre el efecto de modificación química del ácido fólico o AMPc ( Van Haastert et al., 1981 ) sobre la acumulación del GMPC y la inducción de la fosfodiesterasa.

d) Existe una correlación de dosis-respuesta del incremento de los niveles del GMPC y la cantidad de PDE inducida, independientemente de la na



turalaleza del quimioatrayente por el cual esta acumulación del GMPc fue producida ( Van Haastert et al., 1982 ).

## 2.9. FOSFODIESTERASA DEL AMPc Y SU INHIBIDOR ESPECIFICO.

Se ha observado que durante la agregación las células de D. discoideum secretan 2 enzimas específicas para regular la ocupación de los receptores de AMPc. Una es una fosfodiesterasa del AMPc que permite liberar al AMPc de su receptor y otra es un inhibidor de esta fosfodiesterasa ( PDI ) que la bloquea.

Casi inmediatamente después de la adición del AMPc a células preagregativas, la actividad de la fosfodiesterasa ( PDE ) se incrementa dramáticamente, mientras que la actividad del inhibidor específico de la fosfodiesterasa ( PDI ), cesa de incrementarse y permanece en un nivel relativamente constante ( Tsaug y Caukell, 1977 ). Estas 2 actividades parecen estar reguladas en un modo recíproco por el AMPc exógeno. Veh et al. ( 1978 ) le dieron el nombre de sistema " ePD-PDI ", el cual parece responder simplemente a la presencia de AMPc, y puede ser regulado en condiciones donde el AMPc intracelular permanece relativamente estático, por lo que parece que el AMPc extracelular regula el sistema " ePD-PDI " y la diferenciación temprana.

Las células preagregativas son incapaces de continuar su desarrollo cuando son tratadas con altas concentraciones de AMPc, y en respuesta a un exceso del nucleótido, son capaces de producir exceso de fosfodiesterasa. El sistema AMPc-PD ( PD = PDI-PDE ) se sugiere como un sistema cuya función es mantener bajos niveles extracelulares de AMPc en la vecindad de las células agregándose, de tal modo que se incrementa la sensibilidad de las células a la señal pulsátil ( Shaffer, 1956; Alcantara et al., 1976 ).

Cuando la concentración de AMPc extracelular es alta, las células -- conservan la actividad de PDE a niveles altos por incremento de la velocidad de producción de la fosfodiesterasa, y detienen la producción del inhibidor de la fosfodiesterasa. Una vez que la concentración de AMPc cae más abajo de un cierto nivel umbral, el inhibidor es producido para inactivar -- la PDE, ya que también la PDE es capaz de destruir o reducir la intensidad de la señal pulsátil. Cuando la concentración de AMPc se reduce a niveles bajos, puede proceder la agregación eficientemente ( Tsaug y Coukell, -- 1977 ).

Town y Gross ( 1978 ) y Sampson et al, ( 1978 ) sugirieron que el -- AMPc actuaba como un mensajero, ya que concentraciones elevadas de AMPc intracelular regulan ciertas actividades celulares en células preagregativas, pero no parecen regular el sistema " PDE-PDI " , de ahí que probablemente -- otra molécula regule el sistema. Así se observó que a la adición de AMPc, se incrementan los niveles de GMPc, aunque no existía evidencia de que el GMPc estuviera involucrado directamente en el sistema " PDE-PDI ". Se ob--

servó que concentraciones milimolares de GMPc tenían un efecto dramático - en la actividad de la fosfodiesterasa.

Es por lo anterior que Lappano y Coukell ( 1982 ), estudiaron el efecto del GMPc sobre el sistema " PDE-PDI ". Ellos observaron que el sistema era fuertemente regulado por el GMPc exógeno, y ya que solamente concentraciones elevadas fueron efectivas, sospecharon que el GMPc podría ser difundido dentro de las células y actuar directamente sobre el sistema. - Ahora, si el AMPc o el folato incrementan los niveles de GMPc, entonces se formularon la hipótesis de que el AMPc exógeno o el folato regulan el sistema " PDE-PDI " por modulación del GMPc.

Para comprobar lo anterior, usaron cepas de una mutante deficiente en la agregación, HC 112; pulsos de AMPc a esta mutante incrementaron el nivel de GMPc y regularon el sistema " PDE-PDI ", mientras que pulsos de folato tuvieron poco o ningún efecto sobre el proceso. Así es que la falla del folato para inducir la actividad de PDE en esta mutante pudo ser debida a la inhabilidad de este compuesto para estimular niveles de GMPc, ya que esta mutante es deficiente en todas las respuestas celulares conocidas inducidas por el AMPc excepto el sistema " PDE-PDI ".

Gutsch y Robertson ( 1978 ) y Rossier et al. ( 1978 ) mostraron que el sistema " PDE-PDI ", mostraba su máxima regulación cuando se usaban con concentraciones altas de AMPc ( milimolar ) y en cambio, las otras respuestas celulares tienen sus respuestas óptimas en concentraciones bajas ( nanomo-

lar ) de AMPc.

*¿ Pueden estos 2 tipos de respuesta ser inducidos por la misma molécula intracelular ?.*

Lappano y Coukell ( 1982 ) creyeron que sí era posible, si varios - de los procesos celulares fueran controlados por 2 o más receptores de --- GMPc intracelular, diferentes mecanísticamente; por ejemplo: un receptor - (  $R_1$  ), el cual es excitable solamente por cambios en la concentración de - GMPc y otro (  $R_2$  ) , el cual simplemente responde a concentraciones altas de GMPc. Por esto se sugirió el siguiente modelo: el GMPc intracelular -- puede ser regulado en células preagregativas por el AMPc; después de la i- nanición, algunas células pueden comenzar a secretar pulsos de AMPc. Las células vecinas detectan estas señales y podrían responder al estímulo, in crementando periódica y transitoriamente el nivel de GMPc; así, cuando la concentración de GMPc excede el umbral de (  $R_1$  ), se presenta una respues- ta quimiotáctica y una activación/desactivación oscilatoria de la adenila- to ciclasa. El AMPc intracelular puede ser liberado mientras se retransmi- te la señal.

La estimulación del receptor (  $R_2$  ), por el GMPc puede elevar PDE y reducir PDI ( producción y secreción ), conduciendo a un incremento neto - en la actividad de PDE. Este sistema de regulación puede mantener niveles bajos de AMPc en el medio ambiente, y así asegurar que los receptores de - superficie detecten las señales como pulsos directos, optimizando la velo-

cidad de agregación celular.

Si la concentración de AMPc extracelular es mayor de 1  $\mu$ M ( niveles altos ), los receptores de superficie se saturan y las células son incapaces de orientarse para agregarse en " corrientes "; bajo estas condiciones las células podrían responder por elevación de GMPc y mantener niveles altos de estímulo. El proceso mediado por (  $R_1$  ) podría ser bloqueado pero la inducción de PDE vía (  $R_2$  ) podría ocurrir a una velocidad mayor. Los niveles extracelulares de AMPc son reducidos por el rápido incremento de la actividad de PDE, los receptores de superficie podrían ser liberados y la concentración de GMPc intracelular podría retornar a sus niveles basales; así las células son capaces una vez más, de detectar señales y pueden proceder a la agregación.

El incremento de GMPc por el AMPc y el folato probablemente es debido a la activación que media el receptor de una guanilato ciclasa ( Mato y Malchow, 1978; Ward y Brenner, 1977 ). Probablemente el decremento de GMPc pueda deberse a la acción enzimática de una fosfodiesterasa específica del GMPc intracelular ( Dicou y Brachet, 1980 ).

Los incrementos transitorios de GMPc inducidos por pulsos nanomolares de AMPc o folato, pueden ser generados por la activación y desactivación de estas 2 enzimas; y la elevación relativa del GMPc, producida por la alta concentración de AMPc induciendo a la activación de la guanilato ciclasa y la inactivación de la fosfodiesterasa específica del GMPc.

Un mecanismo que involucre un simple receptor, sería por cambios alostéricos del receptor ( Lappano y Coukell, 1982 ).

En resumen el sistema " PDE-PDI " regula la concentración de AMPc extracelular que se une a los sitios receptores de AMPc en la superficie celular. PDE tiene por función evitar que el AMPc permanezca unido a los receptores por largo tiempo, evitando la recepción de otras señales de AMPc, y PDI inhibe a PDE para asegurar que los receptores de AMPc puedan ser ocupados.

El sistema " PDE-PDI " parece ser regulado por el GMPc inducido por el AMPc exógeno. Un modelo de regulación del sistema es por la acción de 2 receptores; uno (  $R_1$  ), que actúa a bajas concentraciones de GMPc y que modula algunas de las respuestas intracelulares diferentes al sistema " PDE-PDI "; y otro receptor (  $R_2$  ), que actúa a altas concentraciones de GMPc y que modula la activación/desactivación oscilatoria del sistema " PDE-PDI ".

Cuando la concentración de GMPc excede la concentración umbral de  $R_1$ , actúa  $R_2$  y se produce PDE mientras se libera AMPc intracelular y el AMPc exógeno unido a los receptores se libera. Se retransmite la señal, PDI baja los niveles de PDE y los receptores pueden volver a ser ocupados por el AMPc, asegurándose así la transmisión de la señal para la agregación celular.

**CAPITULO 111**

## AGREGACION Y MIGRACION.

### 3.1. PROCESO DE AGREGACION.

Cuando la amiba vegetativa del hongo mucilaginosos ha agotado todo su alimento, y se encuentra sobre una superficie húmeda, comienza a agregarse. El proceso de agregación consiste en la reunión de las amibas cerca de un punto central, para formar una masa de cientos de miles de células llamada pseudoplasmodio. Este pseudoplasmodio puede migrar a través del medio en el que se encuentra, hasta encontrar el sitio más adecuado en cuanto a condiciones medio ambientales, y así empezar la formación del cuerpo fructífero; las condiciones medio ambientales se refieren al pH del medio, a la fuerza iónica, a la cantidad de humedad y de luz, cantidad de amonio en el medio etc.

El proceso de agregación es esencialmente un proceso de quimiotaxis, en el cual las células no solamente responden a la señal de AMPc, moviéndose hacia la fuente de donde proviene esta señal, sino que también presentan adherencia una célula con otra (Konijn et al., 1968). Este contacto de célula a célula parece que permite que se inicie el encendido de ciertas señales, que van a permitir la diferenciación de las células en el agregado, para culminar con la formación de un cuerpo fructífero, indispensable para



asegurar la sobrevivencia del organismo durante periodos desfavorables. - El hecho de que esto ocurra después de una larga y compleja serie de interacciones intercelulares, probablemente esta relacionada con la dificultad de dispersión de las esporas en un medio ambiente húmedo como lo es el suelo ( Robison, Butcher y Sutherland, 1971 ).

El desarrollo de D. discoideum se inicia al tiempo de la inanición, en la primera etapa llamada de interfase, agregándose después de aproximadamente 8 horas y formándose posteriormente el pseudoplasmodio.

Durante la post-agregación, - que se determina desde el momento en el que se formó el pseudoplasmodio, hasta el momento en el que el pseudoplasmodio termina de moverse, y el agregado presenta la forma de " sombrero mexicano " ( Tasaka y Takeuchi, 1983 ); llamado también estado de pre-culminación - el pseudoplasmodio puede moverse ( migrar ) por horas e in-clusive días, dependiendo de las condiciones medio ambientales ( Newell, - Telser y Sussman, 1969 ). Puede sin embargo, no observarse migración del pseudoplasmodio, y en este sitio comenzar enseguida la pre-culminación, pareciendo ser controlado este comportamiento por la cantidad de amonio presente en el medio ( Schindler y Sussman, 1977 ).

### 3.2. DIFERENCIACION DE VARIOS TIPOS CELULARES DURANTE LA AGREGACION.

La diferenciación de las células preespora comienza durante la agregación temprana ( Ferman y Garrod, 1977 ) y estas se han podido identificar gracias a tinciones inmunohistoquímicas usando suero antiespora, en las células agregándose ( Hamaguchi, 1972 ). Así, el patrón de células pretallo y preespora se establece durante la preagregación, a la vez que durante la migración del pseudoplasmodio ( Takeuchi et al., 1978 ).

También se han encontrado células que presentan características de tinción como las que presentan las células pretallo en la región posterior del pseudoplasmodio. A estas células se les llamó células de " retaguardia " ( diferentes a las células de " tipo anterior " ) y se consideran las precursoras de las células disco ( Bonner, 1967 ).

Hayashi y Takeuchi ( 1981 ), estudiaron las proporciones y localización de los diferentes tipos células en la formación del cuerpo fructífero. Encontraron que no existe intercambio de células espora a tallo, o viceversa, cuando se han marcado las células durante el estado vegetativo y se han examinado en el estado de culminación. ( Esto se observó en condiciones de tipo salvaje ).

También observaron que existe división celular durante el desarrollo tanto antes de la agregación como en el agregado. En el pseudoplasmodio in

móvil se detectó máxima síntesis de DNA para células preespora sin que observaran división para las células pretallo y predisco basal. Ya en la formación de la espora se encontró poca división celular y no se detectó en las células tallo.

Hasta el estado de migración del pseudoplasmodio, Hayashi y Takeuchi ( 1981 ) observaron un incremento de 1.5 a 2.0 veces en el número de células anteriores. Este incremento coincidió con la aparición de las células de retaguardia, y es probable que esta aparición sea debida en parte, a la conversión de las células anteriores a células de retaguardia.

La formación de la espora se termina en un período de tiempo más corto que el requerido para la formación de la célula tallo.

Tasaka y Takeuchi ( 1983 ) estudiaron el patrón celular durante la migración del pseudoplasmodio y en el estado temprano de la culminación, encontrando que durante la migración prolongada decrece la proporción de las células preespora en el pseudoplasmodio. Así, se observó que patrón de células pretallo y preespora fue alterado. Después de la inducción de la culminación se restauró rápidamente la proporción y distribución de las células preespora no son completamente funcionales durante la migración, por lo que parece que la migración de este organismo no es necesaria para su desarrollo.

Los mismos autores observaron que durante la transición entre la mi-

gración y la culminación, se presentaba una íntesa mezcla de células. Pero fué interesante que durante este período, la proporción normal de las células preespora se restableciera. Esta observación fué hecha con pseudoplasmodios que tuvieron largos tiempos de migración, y esta de acuerdo con la idea de que el patrón celular se construye por la distribución de las células las cuales se diferencian previamente, independientemente de la posición en la que se encuentren.

Sakai ( 1973 ) había mostrado la transformación de células pretallo a preespora ( por rediferenciación ). en un grupo de células cuyo tiempo de migración fué de aproximadamente de 3 horas. Esta transformación de células pretallo a preespora fué detectada por la aparición del antígeno de la preespora. Por otro lado, pseudoplasmodios que migran largo tiempo, parecen incrementar la proporción de las células preespora, dentro de un período lag después de la inducción de la culminación. Esto sugiere que las células que han perdido el antígeno de la preespora durante la migración, son células preespora, cuya actividad en la síntesis del antígeno de la preespora fué temporalmente suprimida.

No se sabe la causa de la pérdida del antígeno de la preespora, pero se cree que la pérdida de ciertas sustancias en el sustrato son, probablemente las responsables. Tasaka y Takeuchi ( 1983 ), encontraron que el KCl imidazol y AMPc inhiben el decremento en la proporción de las células preespora, y que el NaCl lo acelera.

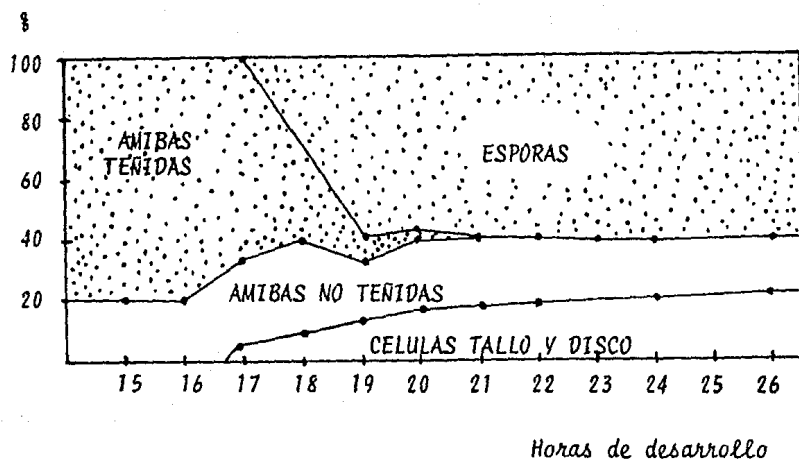


Fig. 7. Proporciones de diferentes tipos de células presentes en la masa celular durante varios estados de la culminación. El área punteada, representa a las células teñidas con suero antiespora conjugado con fluoresceína, y el área en blanco a las células no teñidas ( Hayashi y Takeuchi, 1981 ).

En la etapa de la culminación ( aproximadamente a las 14 horas después de la inanición ), la masa celular contiene amibas no teñidas tanto en la región posterior como en la anterior. No se sabe cual de estas células permanece como células amiboideas en el soro maduro; sin embargo la desapa-

rición de las células de retaguardia sugiere que se mueven hacia la parte superior del soro, y el resto se diferencia en células del disco basal. -- Por lo tanto el cuerpo fructífero consta de células espora, tallo, del disco basal y amiboideas. Los cuerpos fructíferos formados presentaron proporción normal de células, incluso de aquellos pseudoplasmodio que migraron durante mucho tiempo ( Tasaka y Takeuchi, 1983 ).

### 3.3. FACTORES FISICOS QUE AFECTAN LA AGREGACION Y MIGRACION.

Fisher et al. ( 1981 ) encontraron que el amplio rango de respuestas a tipos de conducta de orientación y velocidad de migración, en respuesta a gradientes de luz, calor y compuestos químicos, eran debidos quizás, a mecanismos de adaptación por cambios de sensibilidad, en relación a la intensidad de luz y calor, más bien que a la presencia o ausencia de estos.

El pseudoplasmodio se mueve a lo largo de gradientes de temperatura, humedad, luz y compuestos químicos, y estos parecen ser una clara razón ecológica para este comportamiento, ya que la respuesta a estos estímulos puede asegurar que el pseudoplasmodio se mueva en la superficie del suelo y de algún modo encontrar el sitio donde la diferenciación ocurra ( Ashworth, -- 1974 ).

La luz puede actuar como un estímulo para construcción del cuerpo --

fructífero ( aunque no es esencial ). Bajas intensidades de luz no influyen en la velocidad de migración; en cambio, intensidades muy altas provocan la desorientación del pseudoplasmodio, aunque ninguna variación en la velocidad de migración. Cuando se mantienen en la oscuridad migran indefinidamente y en forma desorientada. Este comportamiento del pseudoplasmodio fue de terminado cuando se le colocó en un medio de desplazamiento ( agar + agua ) bajo una fuente de luz a diferentes intensidades y midiendo periodos determinados de tiempo, así como la distancia recorrida para determinar la velocidad de migración a temperatura constante de 21°C.

Cuando se disminuyó la reflexión de la luz al añadir carbón al medio de cultivo, se observó que disminuyó la desorientación causada por la intensidad de la luz.

En cuanto al efecto termotáctico, no se observaron cambios en la velocidad de migración del pseudoplasmodio cuando en el medio ( agar + agua ) y en la oscuridad, se compararon las velocidades de migración en un gradiente de temperatura ( Fisher y Smith, 1982 ).

Los datos anteriores mostraron que la velocidad de migración del pseudoplasmodio no depende de la naturaleza de la señal ( oscuridad, calor, luz ), sino que es una tendencia innata de éste para moverse a una velocidad constante, sin importar la naturaleza del estímulo externo.

Cuando el sustrato donde se encuentra D. discoideum tiene una fuerza

iónica moderada y una capacidad amortiguadora débil, de tal manera que el pH se incrementa durante el curso del desarrollo de ligeramente ácido a cercano a la neutralidad, el pseudoplasmodio comienza a migrar, pero después de un corto tiempo ( el cual puede ser tan pequeño como de una hora ) el pseudoplasmodio deja de migrar y comienza la construcción del cuerpo fructífero. Si en cambio se tiene una fuerza iónica alta y una capacidad amortiguadora débil, el estado de migración puede ser omitido, e inmediatamente se construye el cuerpo fructífero. Las condiciones exactas de fuerza iónica, capacidad amortiguadora y el pH necesario, varían de cepa a cepa; así también las condiciones cambian dependiendo de la naturaleza del medio usado para el crecimiento de la ameba de la cual fué desarrollado el pseudoplasmodio ( Ashworth, 1974 ).

Grant ( 1982 ) observó que la velocidad y orientación eran controladas por diferentes células en el pseudoplasmodio; la orientación es regulada por las células de la punta del pseudoplasmodio, mientras que la velocidad es propiedad del tamaño y edad del pseudoplasmodio y el medio en el que se encuentre.

Los pseudoplasmodios más viejos son aquellos cuyos tiempos de migración son mayores de 8 horas ( claro que se han reportado migraciones hasta de días ) consiguiéndose estos tiempos de migración cuando los pseudoplasmodios ya formados se conservan en agar no nutritivo a 21°C y en la oscuridad. Los pseudoplasmodios más viejos suelen ser más pequeños que los jóvenes, debido probablemente, a la pérdida de las células de la cauda, lo que sobre-



viene con la edad.

Smith y Williams ( 1981 ) demostraron que los diferentes tamaños de los pseudoplasmodios difieren en velocidad de migración; además entre más jóvenes son los pseudoplasmodios más rápidamente se mueven, comparándolos con los pseudoplasmodios más viejos. Por lo tanto, la relación observada entre la velocidad y el tamaño del pseudoplasmodio es en base a la edad del mismo.

#### 3.4. FACTORES QUIMICOS QUE AFECTAN LA AGREGACION.

*Propagación de la señal y respuesta celular.*

La quimiotaxis es un importante mecanismo en la vida de los organismos. D. discoideum exhibe diferentes conductas de orientación, velocidad de migración y agregación frente a diversos compuestos químicos. Las amibas presentan un fenómeno de quimiotaxis negativa, debida quizás a una pequeña molécula que ayuda a la dispersión de las células ( Keating y Bonner, 1977; Kakebeeke et al., 1979 ).

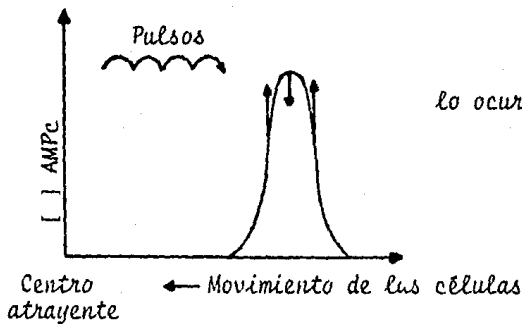
En la agregación natural, el movimiento de las células es de aproximadamente de 20 um en 100 segundos ( Steck y Devreotes, 1980 ), y la señal de AMPc parece ser también de aproximadamente 100 segundos, o sea, la duración de la quimiotaxis es tan duradera como la señal de AMPc ( Futrelle et

al., 1982 ). También se observó que pulsos breves, aproximadamente de 5 segundos, no inducían la quimiotaxis. Cuando los pulsos de AMPc son breves, se inducen respuestas también breves, y no existe una liberación independiente del estímulo ( ver párrafo adelante ).

Futrelle et al ( 1982 ) midieron la respuesta quimiotáctica cada hora durante 15 horas después de la inanición. Cada una de las células mostró fuerte y autónoma actividad quimiotáctica después de 15 horas, y a las 20 horas se presentó el fenómeno " en corriente ". En cada una de estas horas fueron administrados 3 pulsos consecutivos de 1 min. de AMPc, con un intervalo de tiempo de 2 min. entre pulsos. Bajo las condiciones de su experimento, ellos no observaron que se acelerara el desarrollo, ya que los controles que no fueron estimulados, comenzaron a agregarse entre las 17 y 20 horas después de la inanición, como ocurrió en las células estimuladas. Así, observaron que en las células que tienen más de 10 horas de inanición, existe un patrón de respuesta quimiotáctica, al aplicar 3 pulsos consecutivos de AMPc. Al primer estímulo se presentó una respuesta quimiotáctica fuerte y clara, para el segundo estímulo fué más fuerte la respuesta quimiotáctica pero con lento decaimiento; para el tercer estímulo se observó poco efecto en la respuesta. La respuesta al estímulo fué mediada por el movimiento de las células. Comparando la respuesta quimiotáctica a diferentes tiempos del desarrollo, de 1-5 horas, de 6-10 horas y de 11-15 horas, observaron que la respuesta quimiotáctica se refuerza con la edad del pseudoplasmodio.

Alcantara y Monk ( 1974 ) observaron la agregación sobre agar bajo campo oscuro, y vieron que se presentaron bandas claras y oscuras, en anillos concéntricos y espirales, donde en las bandas claras se encontraron amibas moviéndose y en las bandas oscuras, las amibas estacionarias. A este movimiento de las células se le llamó " en corrientes " ( stream ). Las células se mueven, como ondas de movimiento interior que se propagan hacia afuera.

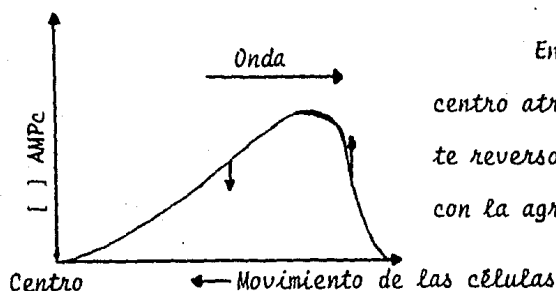
Shaffer ( 1975 ) estudió la onda de propagación de las células durante la transmisión de la señal de AMPc, y postuló un modelo para explicarlo: la transmisión del AMPc es en forma de pulsos breves, produciéndose un pico cuando se alcanza la concentración más alta de AMPc. Cuando termina la señal, el AMPc del pico máximo empieza a difundir a los lados, y la concentración aumenta en las orillas disminuyendo en el pico de la onda; entonces las células que se encuentran en los lados presentan un gradiente reverso. Este modelo va contra la agregación natural, ya que esta nunca se ha visto movimiento reverso.



En este modelo el segundo estímulo ocurre antes que el primero termine.

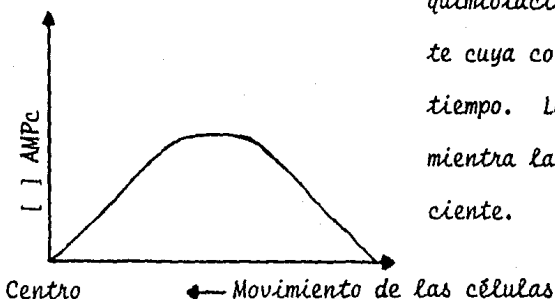
Un segundo modelo propuesto por Parnas y Segel ( 1978 ), consiste -

en que las ondas son más anchas y debido a la degradación del AMPc y a la carencia de secreción, la concentración de AMPc cae en la parte cercana al centro atrayente, mientras que las células más alejadas del centro son las últimas en ser estimuladas y por lo tanto es ahí en donde se encontraría -- una fuente de AMPc todavía activa.



Entonces las células cercanas al centro atrayente presentarían un gradiente reverso, por lo que tampoco concuerda con la agregación natural.

Un tercer modelo postulado por Tmchik y Devreotes ( 1980 ), está basado en el hecho de que la duración de la señal es comparable con la duración del movimiento. Esto es apoyado por la medición de la quimiotaxis y - la medida del estímulo del AMPc. Las células se mueven solamente mientras la concentración es liberada. Esto sugiere que las células no pueden ser -



quimiotácticamente sensibles a un gradiente cuya concentración esta cayendo con el tiempo. Las células solamente se mueven mientras la concentración de AMPc es cre-ciente.

La concentración cae después de que pudiera existir un aparente movimiento reverso. Este último modelo es el más aceptado ya que concuerda -

con la retransmisión de la señal durante la agregación.

Futrelle, Traut y McKee ( 1982 ) sugirieron que la existencia de on das muestra que la retransmisión de la señal ocurre. También encontraron - que las células exhibían una respuesta transitoria al AMPc, a la cual llama ron de " encogimiento " ( cringing ). Notaron que se inducía tanto por pul sos cortos como por pulsos largos de AMPc, y las células eran apreciable-- mente lentas, o definitivamente paraban dentro de los 20 a 30 segundos des-- pués de haber comenzado el pulso; esta disminución de la velocidad se acom-- pañaba de un curvamiento y contracción de las células, expandiéndose poste-- riormente después de 40 a 50 segundos y continuando su movimiento normal.

Si la duración de la señal de AMPc era bastante larga se inducía la quimiotaxis y la célula comenzaba a orientarse durante el " encogimiento ".

El " encogimiento " ocurre en poblaciones naturales durante movimien tos de orientación débil y como una reacción a cambios de AMPc. El " enco-- gimiento " parece ser un proceso de adaptación rápida porque la locomoción celular se restablece después de un minuto, aún cuando el estímulo sea man-- tenido. Es más rápido que la transmisión de la respuesta del AMPc ---- ( Dinauer, Steck y Devreotes, 1980 ).

Durante la agregación normal, las células esencialmente se detienen entre cada movimiento. La duración de esta pausa puede ser de 100 a 500 se-- gundos ( Alcantara y Monk, 1974 ) y durante este período las células pare--

cen " temblar ", aunque permanecen potencialmente en respuesta.

Futrelle et al. ( 1982 ) pensaron que este " temblor " probablemente sirviera para incrementar la eficiencia del patrón de agregación, ya que al " temblar " las células aumentan la probabilidad de que exista el contacto una con otra.

La agregación y la formación " en corrientes " son impedidos en los estados tempranos del desarrollo, probablemente debido a que la quimiotaxis es débil.

### 3.5. SITIOS DE AFINIDAD AL AMPc QUE INTERVIENEN EN LA AGREGACION.

El AMPc es generado a partir de la adenosina trifosfato ( ATP ) por la acción de la enzima adenilato ciclasa ( E.C.4.6.1.1. ), y es degradado a AMP por la 3',5'-nucleótido cíclico fosfodiesterasa ( E.C.3.1.4.17 ) la --cual es específica para los nucleótidos cíclicos. Las actividades de estas 2 enzimas determinan los niveles de AMPc. ( ver fig. 8 ).

Las células no solamente son atraídas por el AMPc, sino que el AMPc también causa la adherencia de una célula con otra ( Konijn et al., 1968 ). Parece además que en el agregado, las células estimuladas liberan AMPc, atrayendo todavía más amibas. La cantidad de AMPc producido es extremadamen

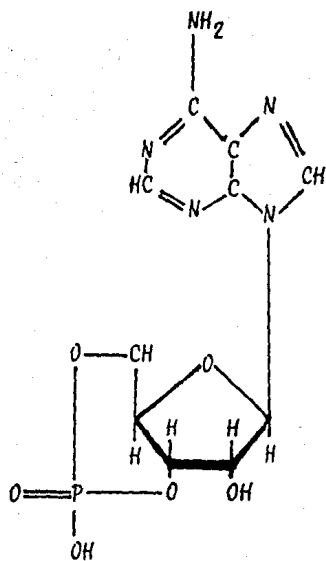
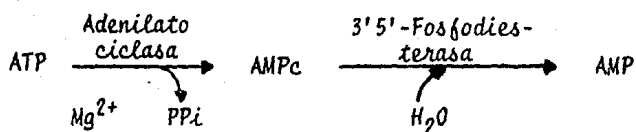


Fig. 8. Estructura del AMPc.

te pequeña durante el estado vegetativo, pero se incrementa fuertemente durante la fase de agregación. Cantidades muy pequeñas son detectables durante la migración del pseudoplasmodio ( Bonner et al., 1969 ). El AMPc parece jugar un papel análogo al que juegan las hormonas en los organismos superiores.

El AMPc en D. discoideum es responsable de iniciar la agregación de la ameba unicelular a una masa de células, las cuales eventualmente coalescen para formar un pseudoplasmodio multicelular. Después el pseudoplasmodio tiene que migrar a su sitio de culminación, y el AMPc es aparentemente responsable de la inducción de ciertas células a diferenciarse en células tallo y espora. Se cree que durante la estimulación de la agregación, el AMPc funciona como primer mensajero extracelular más que como un segundo mensajero intracelular ( Robison, Butcher y Sutherland, 1971 ).

Green y Newell ( 1975 ) demostraron que la unión del AMPc a la membrana presentaba 2 distintas afinidades, una de alta afinidad y otra de baja afinidad. Por la unión de  $8\text{-}^3\text{H}$  AMPc en diferentes concentraciones a las células, observaron que existían sitios de unión en las células con alta afinidad al AMPc, encontrando que eran aproximadamente 3,000 sitios por célula con un  $K_a$  de 0.6 nM. Los sitios de baja afinidad de unión se encontraron un rango de  $4.5 - 9 \times 10^4$ , con un  $K_a$  de 125 nM. Ambos sitios de unión al AMPc se localizaban en la superficie celular y eran de naturaleza proteica.



Schmidt y Stirling ( 1982 ) estudiaron el efecto de la  $\alpha$ -quimiotripsina en las enzimas reguladoras del desarrollo y los sitios que ligan al AMPc. La  $\alpha$ -quimiotripsina es una endopeptidasa específica para aquellos enlaces peptídicos en los que la función carbonilo es aportada por restos de aminoácidos aromáticos, por ejemplo la tirosina, el triptófano y la fenilalanina. Encontraron que  $\alpha$ -quimiotripsina afectaba los procesos necesarios para la expresión de las enzimas de la post-agregación, y en cambio, aquellas cuya actividad se incrementaba antes de la agregación conservaban sus patrones de acumulación de desarrollo normal.

También observaron que cuando las células eran tratadas con  $\alpha$ -quimiotripsina, se alteraba su habilidad para unir al AMPc en los sitios de baja afinidad; sin embargo, permanecía inalterable la unión a los sitios de alta afinidad ( Kelpatrick et al., 1980 ). Ya que ni los sitios de alta afinidad, ni la agregación fueron afectados por la  $\alpha$ -quimiotripsina, parece posible que los sitios de baja afinidad sean destruidos por la  $\alpha$ -quimiotripsina. También se observó que la pronasa afecta estos sitios de manera similar, mientras que la tripsina no tiene ningún efecto ( Schmidt y Stirling, 1982 ).

Por otra parte la mutante NP 144 mostró normal unión del AMPc al sitio de baja afinidad, y presentaba poca agregación por lo que se pensó que la unión del AMPc a los sitios de alta afinidad podrían ser requeridos para la agregación ( Schmidt y Stirling, 1982 ).

### 3.6. PROTEINAS QUE INTERVIENEN EN LA AGREGACION.

Existe evidencia de que el GMPc esta involucrado en la unión del receptor de membrana del AMPc con el sistema de respuesta intracelular, ya -- que el GMPc alcanza una acumulación máxima a los 10 segundos del estímulo -- con el AMPc ( Wuster et al., 1977 ).

Mato y Marin-Cao ( 1979 ) demostraron que existe una metilación rápida y transitoria de las proteínas de la membrana, en respuesta con la estimulación con el AMPc, por lo que es posible que el GMPc y la metilación -- de la proteínas de la membrana sean factores comunes que intervengan en la quimiotaxis.

Por otro lado Gerish ( 1980 ), tuvo evidencia de la acumulación de una glicoproteína en la superficie celular, llamada sitio de contacto A --- ( csA ) que tiene una función importante en la cohesión celular como receptor de superficie de membrana durante la fase de agregación. Esta glicoproteína con aparente peso molecular de 80 K daltons, contiene 2 cadenas de -- carbohidratos, y su N-glicosilación específica es inhibida por tunicamicina. Ahora bien, la tunicamicina actua sobre la agregación celular en D. discoideum provocando cambios en el movimiento celular y por inhibición de un receptor durante la adhesión intercelular. Las células tratadas con tunicamicina muestran actividad pseudopodial no coordinada, de manera que los pseudopodos son extendidos simultaneamente por todas partes de la superficie ce

lular, y las células son incapaces de moverse en forma correcta.

Geltosky y Springer ( 1980 ) encontraron una segunda glicoproteína, gp 150, que es diferente a csA, pero cuya función es la misma.

Barondes y Shinnick ( 1980 ) estudiaron 2 lectinas endógenas, discoidina I y discoidina II, que también se acumulan en la fase de agregación y que igualmente juegan un importante papel en la adhesión celular. Berger ( 1981 ) y Devine ( 1981 ) reportaron que tanto la discoidina I como la II eran potentes hemaglutininas con similar composición de aminoácidos.

Madley ( 1981 ) determinó por electroforesis en acrilamida el peso molecular de estas lectinas y encontró que ambas eran tetrameros con un peso molecular para discoidina I de 110,000 y para discoidina II de 96,000.

En el estudio de la relación entre la estructura de las lectinas y su función biológica, Fraizer ( 1975 ) encontró que las discoidinas I y II son proteínas multivalentes que ligan carbohidratos, siendo su reconocimiento específico diferente, sugiriendo que pueden unirse a diferentes receptores que contienen oligosacáridos en la superficie de las células en agregación.

Bartles, Santoro y Fraizer ( 1982 ) estudiaron la discoidina I y observaron que puede unirse a las células por 2 diferentes mecanismos; uno - que involucra la unión a sitios receptores de tipo carbohidrato ( llamados

sitios " C " ), y otro que involucra la interacción electrostática entre la carga negativa de un componente de la membrana ( llamado sitio " I " ) y la carga positiva de discoidina I. La unión de discoidina a los sitio " I " - fué estudiada usando vesículas lipídicas de fosfatidil colina, fosfatidilglicerol y fosfatidiletanolamina. Discoidina I es la lectina principal y ejerce un papel importante en la agregación celular.

Finley ( 1983 ), estudió el efecto de vesículas lipídicas que contengan AMPc, sobre la agregación. Asociado con este fenómeno hubo un retraso en el desarrollo de la liberación de la adenilato ciclasa, una inducción prematura de la fosfodiesterasa del AMPc y una caída aparente del inhibidor extracelular de la fosfodiesterasa.

Es claro que ninguna reacción de una célula a un estímulo puede ser vista en forma aislada. Un estímulo altera la morfología y la locomoción, y probablemente la función de receptores y las pozas internas. Esto enturbo, modula la respuesta para el próximo estímulo conduciendo a la adaptación. Si se evitan los efectos de " memoria " por esperar unas cuantas horas antes de aplicar otro estímulo, entonces las células de D. discoideum muestran cambios de desarrollo en la respuesta ( Futrelle, 1982 ), o sea, que no continúan con el proceso en el que se habían interrumpido.

## CAPITULO IV

## PROTEINAS.

### 4.1. LA REGULACION DE LA SINTESIS DE PROTEINAS EN LA DIFERENCIACION.

La regulación de la síntesis de proteínas en las células eucarióticas es una respuesta a una amplia variedad de condiciones medio ambientales; así por ejemplo, tenemos que en células de mamíferos en inanición de aminoácidos y glucosa, se observó disgregación de polisomas y una disminución en la velocidad de iniciación de la síntesis de proteínas ( Christman, 1973 ). Este bloqueo en la iniciación de la cadena polipeptídica trae como consecuencia la acumulación de RNAm no polisomal. Al momento en el que se añaden los nutrientes faltantes, otra vez la cantidad de polisomas y la velocidad de iniciación de la síntesis de proteínas retorna a niveles basales, no requiriéndose nueva síntesis de RNAm. Esta recuperación parece depender, de la eficiente traducción de RNAm sintetizado antes del evento de inanición ( Cardelli y Dimond, 1981 ).

Una de las respuestas inmediatas a la inanición en células de D. discoideum, es la reducción en el tamaño y cantidad de polisomas libres y de los unidos a la membrana ( Alton y Lodish, 1977; Cardelli et al., 1981; Margolskee et al., 1980 ).

Por lo anterior Cardelli y Dimond ( 1981 ) trabajaron para determinar qué etapa en la síntesis de proteínas era responsable de la respuesta a la inanición. Para ello investigaron el efecto que tiene la inanición sobre la iniciación de la síntesis de proteínas en células creciendo exponencialmente.

Para medir si la inanición produce un cambio en el nivel de polisomas, midieron su tamaño y cantidad en células en desarrollo, a tiempos tan tempranos como 15 min. después de establecida la inanición. Usaron un medio que contenía sales ( medio de inanición ) y una temperatura de 22°C. Para la determinación colectaron las células por centrifugación, las lisaron y los polisomas los analizaron en gradientes de sacarosa y leyeron las extinciones a 260 nm. Encontraron que el total de polisomas decrecía transitoriamente en tamaño y cantidad cuando las células eran simplemente lavadas, centrifugadas y posteriormente resuspendidas en un medio de crecimiento o simplemente, cuando se colocaron en un medio de inanición, sugiriendo que ambos tratamientos pueden efectuar una disgregación de los polisomas en D. discoideum, y esta disgregación tiene como resultado un rápido decremento en la velocidad de iniciación de la síntesis de proteínas.

Por otro lado, el hecho de que la centrifugación causara el decremento en la cantidad de polisomas probablemente se debiera a que se incrementa la densidad celular, y que por lo tanto, decreció la concentración local de oxígeno disuelto, sugiriendo que la anoxia afectaba el desarrollo celular. Para comprobar lo anterior, usaron medios de cultivo en suspensión,

donde la cantidad de oxígeno disuelto fué muy baja. El crecimiento que en contraron fué muy pobre, por lo que dedujeron que el crecimiento de las cé lulas requiere oxígeno.

Además, la agregación celular se vió afectada por la cantidad de oxígeno, ya que cuando los cultivos estaban en condiciones de anoxia, se observó dispersión de los agregados y cuando se airearon nuevamente, los a gregados volvieron a formarse. Precisamente en el momento en el que los a gregados se dispersaron, se observó la dispersión de los polisomas y la caída en la velocidad de la síntesis de proteínas en un 20% con respecto a un control positivo.

La dispersión de los agregados y la subsecuente disgregación de los polisomas son eventos independientes, pero ambos ocurren como una respuesta a la anoxia, por lo que Cardelli y Dimond ( 1981 ), sugirieron que la síntesis de proteínas en D. discoideum puede ser regulada en parte por los niveles de ATP.

Acompañando la reducción en la velocidad de iniciación de la sínte sis de proteínas inducida por la inanición, se observó también un incremen to de 3 veces en la cantidad de RNAm no traducido. Cardelli y Dimond ( 1981 ) encontraron que el 35% del total de RNAm celular se encontró como RNA no polisomal en células en inanición. Esto sugirió que ciertos facto res, sumados a la reducción en la velocidad de unión de los ribosomas al RNAm, pueden provocar un incremento en la cantidad de RNAm no traducido.



Tales factores podrían ser el secuestro de algunos RNAm a través - de la asociación con proteínas, o la reducción en la actividad de un factor o factores de iniciación, los cuales podrían reconocer una cierta clase de RNAm.

A causa de que la inanición inicia el desarrollo en *D. discoideum*, esta reducción en la velocidad de iniciación de la síntesis de proteínas podría estar relacionada al desarrollo. Cuando se restablecen los requerimientos nutricionales y el oxígeno, se restablece la síntesis de proteínas.

#### 4.2. GLICOPROTEINAS QUE INTERVIENEN EN EL DESARROLLO DE *D. discoideum*.

El contacto célula-célula es mediado por los componentes de la membrana plasmática, y en particular las glicoproteínas juegan un papel importante en el contacto celular ( Geltosky et al., 1979 ). Debido a que el -- ANPc acelera el proceso de agregación ( Darmon et al., 1975; Gerisch et al. 1975 ), podría estar involucrado en el control de la formación de glicoproteínas de la membrana.

Toda et al. ( 1980 ) obtuvieron patrones sustancialmente diferentes de las glicoproteínas de la membrana plasmática durante el estado de crecimiento en la interfase ( desde el momento de la inanición hasta el momento en que comienza la agregación ) y en el estado de agregación.

Toda et al. ( 1981 ) a su vez estudiaron los cambios en los patrones de glicoproteínas sobre la superficie celular de D. discoideum durante el desarrollo. Para esto usaron cultivos en suspensión y marcaron los carbohidratos de la membrana celular con periodato de bromohidruro (  $^3\text{H}$  ) -- ( periodato  $\text{NaB}^3\text{H}_4$  ); las células se lisaron y centrifugaron, y el sobrenadante fué analizado por electrofóresis en gel de poliacrilamida-SDS. Por fluorografía detectaron las glicoproteínas marcadas. Así, encontraron cambios que incluyeron :

#### INCREMENTOS.

Proteína de 153 Kd.- durante las primeras 6 horas del desarrollo y después decreció.

Proteína de 89 Kd.- durante las primeras 10 horas del desarrollo.

Proteína de 123 Kd.- decrece durante las primeras 4 horas del desarrollo y se incrementa a las 10 horas.

Proteína de 106 Kd.- durante las primeras 10 horas.

Proteína de 103 Kd.- durante las primeras 6 horas y luego decrece.

DECREMENTOS.

Proteína de 241 Kd Proteína de 205 Kd Proteína de 170 Kd Proteína de 78 Kd Proteína de 65 Kd	}	decrecen durante las primeras 6 horas y no se conoce si desaparecen totalmente o se incrementan posteriormente.
--	---	---

Proteína de 226 Kd Proteína de 187 Kd	}	decrecen durante las primeras 4 horas y no se conoce si desaparecen totalmente o se incrementan posteriormente.
--	---	---

Proteína de 143 Kd	}	decreció durante las primeras 2 horas y no se conoce si desaparece totalmente o se incrementa posteriormente.
--------------------	---	---

La aparición de las proteínas 89 Kd y 106 Kd se observó tanto en -- cultivos en suspensión como en cultivos sólidos en inanición durante la interfase y también en el desarrollo temprano. La adición de pulsos de AMPc indujo solamente el incremento de la glicoproteína 89 Kd en el estado temprano ( Parish et al., 1978 ).

La tendencia en los cambios de las glicoproteínas durante el desarrollo temprano ha sido también observado para proteínas solubles que se in

crementan gradualmente a través del desarrollo temprano, así como las proteínas de membrana ( Ono et al., 1981 ), analizadas por electrofóresis en el gel bidimensional.

Geltosky et al. ( 1979 ) reportaron una glicoproteína que llamaron gp 150, presente en células vegetativas, cuya concentración se incrementaba durante las primeras 10 horas del desarrollo y parecía corresponder a la -- glicoproteína 153 Kd reportada por Ono et al. ( 1981 ).

La glicoproteína 89 Kd parece corresponder al sitio de contacto A - ( Muller y Gerisch, 1978 ), el cual aparece en las células agregándose, mediante la cohesión intercelular. La 89 Kd y la cs A se parecen en peso molecular y en el efecto que produce el AMPc sobre éstas.

Existe otra glicoproteína con un peso molecular de 95 Kd cuya síntesis comienza en el estado de culminación, por lo que esta glicoproteína podría estar involucrada en la cohesión celular en el estado de desarrollo posterior.

Los cambios en los patrones de las glicoproteínas de la membrana -- plasmática durante el desarrollo parecen ser regulados por varios factores: inanición, pulsos de AMPc y contacto célula-célula.

#### 4.3. ENZIMAS CARACTERISTICAS DEL DESARROLLO.

Durante el desarrollo existen cambios importantes en las poblaciones de las moléculas de RNAm y proteínas ( Alton y Lodish, 1977 ) y aunque se pensó que el contacto célula-célula era necesario para iniciar estos cambios en la expresión de los genes, la continua síntesis de proteínas es solo dependiente del AMPc ( Landfear y Lodish, 1980 ). Sin embargo la multicelularidad no parece necesaria para ciertas mutantes en donde se expresan las enzimas post-agregativas ( Town y Gross, 1978 ) o en ambas de mutantes esporógenas que desarrollan esporas sin que exista contacto celular ( Kay y Trevan, 1981 ).

Durante el desarrollo de D. discoideum se presentan varias etapas en las cuales aparecen ciertas enzimas que son consideradas como específicas e indicadores de dichas etapas. Schmidt et al. ( 1978 ) y Kilpatrick et al. ( 1980 ) habían observado que cuando se agregaba  $\alpha$ - quimiotripsina a células de D. discoideum después de la inanición, se bloqueaba la formación del sorus. Si la  $\alpha$ - quimiotripsina se agregaba después de formado el agregado, se formaban cuerpos fructíferos con encapsulamiento impropio de las esporas, las que se encontraban inmaduras. Parece ser que la proteasa inhibe enzimas que aparecen en diferentes etapas, y se observa alteración de las etapas en las que probablemente estas enzimas actúan.

Schmidt y Stirling ( 1982 ) encontraron que la  $\alpha$ - quimiotripsina a-

fectó un proceso necesario para la expresión de las enzimas de la post-agregación. Por lo tanto, ninguna de las enzimas involucradas en la agregación fué afectada debido a que aún con el tratamiento de las células en inanición con la proteasa el agregado se formó. Además las enzimas que se incrementan antes de la agregación en células tratadas con la proteasa fueron acumuladas de manera paralela a células en desarrollo que no fueron tratadas con la enzima.

Al desarrollarse las células en presencia de  $\alpha$ -quimiotripsina se inhibe la producción de todas las enzimas post-agregativas. Schmidt y Stirling ( 1982 ) midieron aquellas que normalmente aparecen inmediatamente después de la agregación, la glicógeno fosforilasa, UDP-glucosa pirofosforilasa y UDP-galactosa 4-epimerasa,  $\beta$ -glucosidasa II y fosfatasa alcalina. Encontraron que la pronasa y la  $\alpha$ -quimiotripsina disminuyen la acumulación de la UDP-galactosa polisacárido transferasa, enzima de la agregación, además de observar que la maduración de la espora es más sensible a la  $\alpha$ -quimiotripsina, ya que solo se formó el 1% de los cuerpos fructíferos esperados. Esto puede reflejar el gran efecto del  $\alpha$ -quimiotripsina sobre las enzimas específicas de la culminación.

Cuando se liberó a las células del bloqueo de la  $\alpha$ -quimiotripsina, estas formaron cuerpos fructíferos aparentemente normales y se observó una elevación en la actividad específica de la UDP-glucosa pirofosforilasa independientemente que durante el efecto de la  $\alpha$ -quimiotripsina no se haya podido detectar ningún cambio en su actividad específica ( Schmidt y Stirling

Ling, 1982 ).

Para conocer más acerca de la interacción requerida para la formación de células preespora y espora, Peacey y Gross ( 1981 ) examinaron el efecto de las proteasas sobre la diferenciación y sobre la formación de varios productos de la post-agregación.

Así estudiaron el efecto de la pronasa y la  $\alpha$ -quimiotripsina sobre la formación de la espora, efectuando todos sus experimentos en presencia de altos niveles de AMPc. Encontraron 2 efectos principales de las proteasas sobre el desarrollo de D. discoideum: el primero fue que a bajas concentraciones de las proteasas se bloqueaba la formación de la espora cerca del tiempo de maduración; esto no fue debido a la transformación de células espora a células tallo, ya que no hubo incremento de estas últimas. Concentraciones bajas de proteasas eran incapaces de inhibir la acumulación de las enzimas espora-específicas, ya que su concentración no fue afectada. Si el efecto de estas proteasas fuera directamente sobre las enzimas espora-específicas, era de esperarse la inhibición en pasos anteriores del desarrollo de la espora, ya que esta capa puede ser escindida por acción combinada de la celulasa y pronasa.

El segundo efecto observado por los anteriores autores, fue que la pronasa y la  $\alpha$ -quimiotripsina a concentraciones mayores ( de 250 ug/ml o más ) reducen la acumulación de la enzima UDP-galactosa polisacárido transferasa, específica de la célula preespora, mientras que no afectó la apari-

ción de la glicógeno fosforilasa, una enzima presente tanto en células pre-tallo como preespora, detectándose una considerable reducción en la proporción de las células preespora. Cuando se añadieron estas proteasas en ausencia de AMPc, observaron que el desarrollo se paró en el estado en el que el agregado estuvo en forma de montículo, presentándose pobre desarrollo de las células preespora.

#### 4.4. ENZIMAS DEL METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS.

Durante el desarrollo de D. discoideum hacia la organización multicelular se presentan cambios drásticos en todos los niveles del metabolismo celular. Durante la inanición existe un alto recambio de componentes celulares, ya que la energía necesaria para la diferenciación proviene de fuentes endógenas. Comparando con células vegetativas, el contenido de proteínas, lípidos y ácidos nucleicos se reduce a un 40% durante el desarrollo. Cerca del 80% de las proteínas son cambiadas y los aminoácidos liberados -- son metabolizados o reincorporados.

Es importante la síntesis de las enzimas del metabolismo de carbohidratos, ya que están estrechamente relacionadas con los cambios del desarrollo, y sus actividades son prerequisite para el establecimiento de estructuras morfológicas especializadas y funciones fisiológicas.



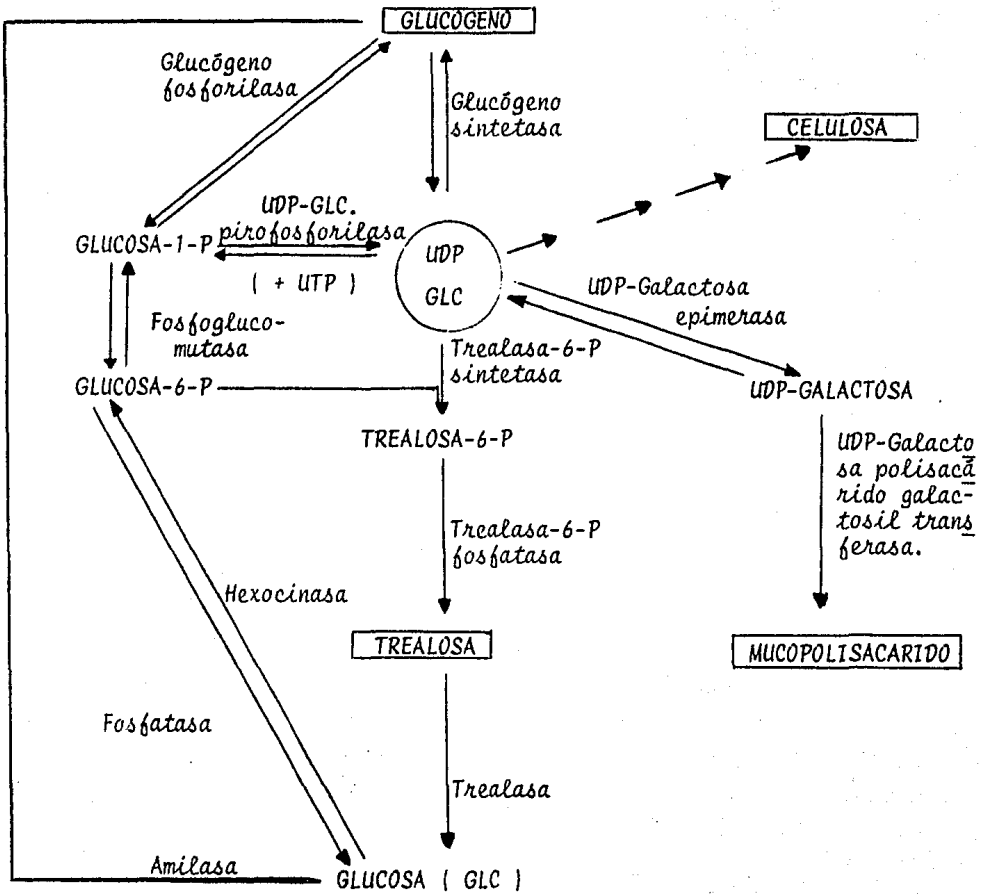


Fig. 9. Enzimas involucradas en el metabolismo de carbohidratos en *D. discoideum*. ( Sussman y Newell, 1962 ).

El contenido cuantitativo de los carbohidratos no cambia pero si se observan cambios cualitativos. Se sintetizan grandes cantidades de celulosa, varios mucopolisacáridos y trealosa como sustancia de almacenaje. La fuente de todos ellos es el glicógeno acumulado durante la fase vegetativa ( Parthier y Lerbs, 1982 ):

Las enzimas claves de estas vías metabólicas de los carbohidratos son: UDP-glucosa pirofosforilasa, trealosa-6-fosfato sintetasa, UDP-galactosa epimerasa, UDP-galactosa polisacárido galactosil transferasa y UDP-galactosa glucógeno pirofosforilasa, todas sintetizadas durante la fase post-agregativa, alrededor de las 10 horas del desarrollo; mientras que los correspondientes RNAm parece que se presentan varias horas antes.

La síntesis de todas estas enzimas y polipéptidos es una parte integral del programa de desarrollo. Así, mutantes morfológicas se producen por carencia de ciertas enzimas del metabolismo de carbohidratos; por ejemplo, mutantes que tienen bloqueada la actividad de N-acetilglucosaminidasa son incapaces de migrar; las que carecen de UDP-glucosa pirofosforilasa no pueden culminar; cepas mutantes sin un carbohidrato que une a una proteína -- ( CBP- 26 ) no son capaces de agregarse.

#### 4.5. LIBERACION DE PROTEASAS.

Rossomando et al. ( 1978 ) y Crean et al. ( 1981 ) describieron la liberación de una proteasa de la amiba de D. discoideum durante la inanición. Ellos sugirieron que la actividad proteolítica estaba involucrada en la modificación de componentes de la membrana celular, para facilitar la migración de la estructura multicelular.

North ( 1982 ) estudió la liberación de las proteasas cuando las amibas son colocadas en un medio de inanición, encontrando que la mayor actividad de las proteasas extracelulares apareció dentro de los 30 minutos de iniciada la inanición. Rossomando et al. ( 1978 ) habían reportado que durante la liberación de las proteasas se presentaba liberación de glicosidasas aunque North ( 1982 ) no pudo confirmarlo.

North ( 1982 ) también reportó que la liberación de la actividad de las proteasas fué insensible al tratamiento con cianuro mientras que confirmó que la actividad de otras hidrolasas sí fué inhibida. Igualmente reportó que las proteasas estudiadas se localizaban en los lisosomas. La insensibilidad de la liberación de proteasas al cianuro sugirió que el mecanismo de liberación no era un proceso específico secretor, ya que debió ser dependiente de energía y por lo tanto haber sido inhibido por el cianuro. Además la liberación de la actividad de proteasas fué más rápida que de otras enzimas liberadas por los lisosomas. La electroforesis en gel demos--

tró patrones similares, tanto de proteasas intracelulares como liberadas.

Se pudo especular que debido a la inanición, se enciende un mecanismo para la liberación de proteasas que debe ser dependiente de energía, aunque no se ha podido demostrar por la insensibilidad presentada frente al cianuro. Por lo tanto aún no es claro cual es el mecanismo de liberación de proteasas.

#### 4.6. PROTEINAS DE LA CAPA DE LA ESPORA.

Devine et al. ( 1982 ) estudiaron la síntesis diferencial de las proteínas de la capa de la espora mediante el análisis electroforético de extractos de la capa, los cuales revelaron la presencia de 6 proteínas con peso molecular aparente entre 60,000 y 200,000, ya observadas previamente por Orłowski y Loomis ( 1979 ).

Devine et al. ( 1982 ) encontraron que las proteínas de la capa de la espora SP 60, SP 70 y SP 96 ( 60 Kd, 70 Kd y 96 Kd respectivamente ), se encontraban presentes en las células de esporas maduras y no eran detectables en extractos de células tallo; estas proteínas fueron localizadas en la pared externa de la capa de la espora y su síntesis y acumulación a niveles detectables se desarrolló en células preespora sin que se encontraran ni trazas en las células pretallo. Esto demostró la exclusiva diferencia-

ción de las células preespora que parecen participar directamente en la formación de la espora.

La acumulación de estas proteínas no se observó sino hasta la preculminación, aproximadamente a las 14 a 16 horas de iniciada la inanición, cuando se ha formado el agregado como " sombrero mexicano "; sin embargo, otras proteínas de la capa de la espora son acumuladas antes, desde el inicio de su síntesis. Lo anterior puede ser debido a :

1.- Que la síntesis de proteínas de la capa de la espora es iniciada, pero algunas veces mantenida a bajos niveles en la migración del pseudoplasmodio, con la velocidad de síntesis en incremento durante el inicio de la culminación.

2.- Que el rápido recambio de las proteínas de la capa de la espora ocurra en la migración del pseudoplasmodio, terminando en el inicio de la culminación, permitiendo que se acumulen.

3.- Que pueden ser secretadas por las células.

Caloma y Lodish ( 1977 ) reportaron que la mayoría de las proteínas específicas del tallo y espora aparecen en la culminación ( 19 a 24 horas ). En contraste, Devine et al. ( 1982 ) demostraron que las proteínas específicas de la espora aparecen entre las 14 a 16 horas. ( El termino de la culminación se lleva a cabo aproximadamente a las 24 horas. ).

#### 4.7. FOSFORILACION DE PROTEINAS DEPENDIENTE DEL AMPc.

Después de la purificación de un extracto citoplásmico, Sampson --- ( 1977 ) reportó la existencia de una proteína cinasa dependiente del AMPc en las células que tenían 2 horas de inanición. La activación de esta cinasa - se incrementó con el tiempo de inanición. Gracias a esta observación se estudió el papel de la fosforilación en la diferenciación, y su relación con - el AMPc.

El posible papel de la fosforilación en la alteración de la respuesta de las células al AMPc, fué estudiada por Lubs-Hankeness y Klein ( 1982 ) quienes examinaron la fosforilación de proteínas endógenas en amibas intactas, estimuladas con AMPc. Estos autores encontraron que una de las respuestas de las células al AMPc era la fosforilación de una proteína con aparente peso molecular de 47 Kd ( pP 47 ). La fosforilación de pP 47 pudo ser detectada dentro de los 5 segundos de la estimulación con AMPc. El tiempo que -- pP 47 permaneció fosforilada dependió de la concentración de AMPc usada en - el estímulo y una vez desfosforilada pP 47 podía volver a fosforilarse con - otro estímulo de AMPc.

La rapidez de la respuesta de fosforilación de pP 47 es de naturaleza transitoria, y su habilidad para ser producida por aplicaciones repetidas de concentraciones bajas de AMPc permite suponer su papel en el periodo refractorio ( tiempo durante el cual la amiba es capaz de responder a un pulso

de AMPc por activación de la adenilato ciclasa ) de la transmisión de la res  
puesta.

Juliani y Klein ( 1981 ) encontraron que el tratamiento con AMPc cam  
bia el receptor de AMPc de un componente de aparente peso molecular de 45 Kd  
a uno de 47 Kd. Aunque este cambio puede deberse a la alteración en la movi  
lidad de la proteína en el gel de SDS-poliacrilamida, podría ser también que  
el cambio en el receptor del AMPc refleje un grado de alteración por su fos-  
forilación. Este fenómeno puede proveer un importante mecanismo en la deter  
minación de la actividad de unión del receptor o su interacción con la adeni  
lato ciclasa.

## CAPITULO V



### GENETICA DE *D. discoideum*.

Existen programas complejos de expresión genética durante el ciclo - vida de *D. discoideum*, el cual comprende la citodiferenciación, durante la - cual existen señales que indican a las células:

a) Que están en contacto una con otra.

b) De su posición relativa dentro del agrupamiento.

c) De los progresos del ensamblaje como un todo, a lo largo de vías alternativas del desarrollo. ( Godfrey y Sussman, 1982 ).

Durante el desarrollo, *D. discoideum* presenta una serie sistemática de cambios morfológicos y bioquímicos, cada uno de ellos con un orden determinado, de modo que solamente cuando una célula de tipo salvaje muta, se presentan alteraciones en cuanto al orden de estos eventos.

## 5.1. RECOMBINACION PARASEXUAL.

### *Parasexualidad en hongos.*

Ciertos hongos pueden formar núcleos recombinantes por un proceso en el cual la meiosis y la fertilización no están involucradas.

Este ciclo parasexual involucra:

- a) La formación de células hifales heterocarióticas o micelio.
- b) " Crossing-over " mitótico: el cambio ( infrecuente ) de segmentos de cromátida entre cromosomas de un par de homólogos durante la propagación mitótica de los núcleos diploides.
- d) Una disgregación no mitótica durante la haploidización. Se forman núcleos recombinantes haploides de aquellos núcleos diploides en los -- cuales el " crossing-over " ocurrió; se cree que la haploidización ocurre -- por la pérdida de un miembro de cada uno de los pares de cromosomas homólogos.

Los estados haploide-diploide.

Los estados haploide-diploide se relacionan por ciclo parasexual y son estados heredables ( Sussman y Sussman, 1962 ). La frecuencia de formación de diploides está controlada por el locus de unión mat ( relacionado -

con el apareamiento ). Cruzas parasexuales entre cepas de igual tipo de apareamiento producen diploides con una frecuencia en el orden de  $10^{-6}$  ( Robson y Williams, 1979 ) o mayor ( Katz y Sussman, 1972 ) dependiendo de las cepas. Diploides obtenidos de cruzas parasexuales entre cepas de diferente tipo de apareamiento ocurren a una frecuencia del orden de  $10^{-8}$  y se encuentran que son homocigotas a mat ( Robson y Williams, 1979 ).

Los diploides heterocigotos se forman por fusión celular de haploides ( se usa  $Ca^{++}$  como agente promotor de la fusión celular ) en una baja frecuencia; comunmente son inestables y revierten a la característica haploide. Durante la formación de células haploides se observó el fenómeno de aneuploidía ( número cromosómico que no es múltiplo del número haploide ), la cual puede deberse a la pérdida de cromosomas simultáneamente ( Brady y Williams, 1974 ).

Para la selección de los heterocigotos se han usado haploides sensibles a temperatura, de carácter recesivo ( mutantes Tsg; crecen a  $22^{\circ}C$  pero no a  $27^{\circ}C$ , y al fusionarse producen diploides que crecen a  $27^{\circ}C$  ). Son de lento crecimiento; pero al fusionarse producen diploides de rápido crecimiento ( Loomis y Asworth, 1968 ). El problema es que son generalmente indistinguibles una marca de otra ( Newell, 1978 ) o sea no se puede localizar la marca Tsg de la de velocidad de crecimiento.

Se ha simplificado la selección de heterocigotos por la disponibilidad de mutaciones recesivas en varios loci que afectan la habilidad de las -

células a crecer con B. subtilis, ( como alimento para D. discoideum ) ( Morrissey et al., 1980; Welker y Williams, 1980 ). Welker y Diring ( 1978 ) - trabajaron con haploides sensibles a radiaciones ultravioleta o radiaciones gama, produciendo diploides que sobrevivían al tratamiento con ambas radiaciones.

También para la selección de diploides heterocigotos se usaron haploides con mutaciones con caracter dominante de resistencia a drogas como cicloheximida, carbamicina ( Fuhei y Takeuchi, 1971 ) y cloruro de cobalto ( Williams, 1978 ). El uso de mutaciones recesivas resistentes a drogas permite la selección directa de segregantes y el conveniente señalamiento de marcadores no unidos ( Loomis, 1980 ).

Para la segregación de haploides se ha preferido el uso de mutaciones recesivas resistentes a drogas sobre aquellos diploides heterocigotos sensibles a drogas.

Diploides isogénicos ( que tienen los mismos genes ) ocurren espontáneamente ( Sussman y Sussman, 1962 ) o pueden ser inducidos por tratamiento con derivados de benzoimidazoles ( Welker y Williams, 1980 ), permitiendo estudios de efectos de dosificación de genes en el desarrollo.

Se han construido diploides para segregar haploides durante el análisis de los grupos de unión; esto se ha logrado mediante la combinación de cepas relativamente sin marcadores que portan una mutación del desarrollo, jun-

to con una cepa "prueba" que porta una marca bien definida en todos los grupos asociados ( grupos de unión ) ( Rather y Newell, 1978 ).

El estudio del mapeo mediante recombinación mitótica no solamente se ha seguido con segregantes haploides, sino que también son de utilidad los diploides recombinantes recobrados ( aquellos que no presentaron haploidia ), los cuales son homocigotos para la droga seleccionada como marca recombinante mitótica ( Williams et al 1974; Gengold y Ashworth, 1974; Katz y Kao, -- 1974 ). Estos recombinantes son el resultado del cruce mitótico entre el -- centrómero y la zona que posee la marca ( Käfer, 1977 ); su frecuencia es -- muy baja, pero presentan la ventaja de que mediante ellos se ha podido deducir el orden de algunos marcadores en los cromosomas y en ocasiones su posición, pero solamente es posible el mapeo mitótico con aquellos marcadores -- que están entre el centrómero y la marca de la droga seleccionada ( Williams, Kessin y Newell, 1974 ).

Las técnicas de genética parasexual son más adecuadas que la genética del acrocisto ( ver el siguiente tema ) para análisis de complementación y análisis de enlace, pero para análisis de estructura fina, el sistema de -- macrocisto es indispensable ( Newell, 1978 ).

## 5.2. RECOMBINACION SEXUAL.

### Genética del macrocisto.

El desarrollo sexual en cultivos en apareamiento de D. discoideum - resulta en la formación de estructuras llamadas macrocistos ( Blaskovics y Raper, 1957; Erdos et al. 1972 ). Originalmente se pensó que el macrocisto era un sorocarpo abortivo, pero estudios de Blaskovics y Raper ( 1957 ), indicaron que en verdad se trataba de un cisto multicelular, con estructura - diferente al sorocarpo.

En algunas especies de Dictyostelium se observó que cuando la población amiboidea se encontraba en condiciones de inanición, las células se acumulaban en cúmulos compactos, que se rodeaban de una envoltura semejante a una vaina viscosa y en vez de desarrollar a sorocarpo, permanecían como agregados y después de unas cuantas horas, secretaban una pared secundaria, semejante a celulosa, quedando las amibas en el interior ( Newell, 1978 ).

Las condiciones que favorecen la formación del macrocisto en mez--- clas de cultivos con diferentes tipos de apareamiento incluyen la oscuridad ( O' Day y Lewis, 1981 ), sumersión ( Nickerson y Raper, 1973 ), alta temperatura ( Erdos, Raper y Vogen, 1976 ) y  $Ca^{++}$  ( Chagla, Lewis y O' Day, --- 1980 ). También se observó la formación de macrocistos en cultivos de la cepa V 12 ( cepa de tipo salvaje, mat A2 ( Raper, 1951 ) ), expuesta a una feromona volátil producida por las células NC 4 ( cepa de tipo salvaje mat

AI [ Raper, 1935 ] ] ( Lewis y O' Day, 1977; O' Day y Lewis, 1981 ).

Un evento temprano en el desarrollo del macrocisto es la formación de células cigoto gigantes diploides, como resultado de la fusión de amibas haploides ( Chagla, Lewis y O' Day, 1980; O' Day, Szabo y Chagla 1981; -- 1982. ). Estas actúan como centros de agregación, en una manera reminiscente a la construcción del cuerpo fructífero que sigue de la agregación ( O' Day y Lewis, 1981 ). El quimioatrayente producido por los cultivos de macrocisto es probablemente el AMPc; así cada una de las células gigantes atrae a las amibas cercanas ( O' Day, 1979; O' Day y Durston, 1979 ).

Subsecuentemente los agregados pasan a través de un estado de precisto, en el cual las células gigantes se vuelven citofágicas y engloban a otras células en el agregado, llegando al estado de maduración en el cual una pared trilaminada es construida ( Newell, 1978; O' Day y Lewis, 1981 ).

Durante la producción progresiva de la pared trilaminada alrededor del agregado, la célula cigoto gigante engloba a todas las amibas de su alrededor ( citofagia ), envolviéndolas en membranas como un endocito intracelular ( Blaskovics y Raper, 1957; Felosa y Dugler, 1972 ). El endocito es una célula pequeña compacta y de paredes firmes.

Durante los primeros días el endocito no se distingue. Al cabo de pocas semanas se presenta un contenido acelular ( en el que no se observan organelos citoplásmicos ), que forman una masa parduzca que ocupa una por-

ción central dentro del macrocisto. Esta estructura es resistente al calor ( 42° por 10 minutos ), aunque menos resistente que la espora, siendo capaz de germinar en medio acuoso liberando amibas haploides ( Nickerson y Raper, 1975 ).

El desarrollo sexual en *D. discoideum* es regulado por feromonas volátiles, las cuales son secretadas solamente por uno de los tipos de apareamiento en un par ( Lewis y O' Day, 1975; Lewis y O' Day, 1977 ). Los datos acumulados sugirieron que las feromonas inducen la formación de cigotos -- ( O' Day y Lewis, 1981 ).

La formación de células gigantes es también dependiente de  $Ca^{++}$ . Con 1 nM de  $CaCl_2$ , la formación de células gigantes mejora cerca de 57 veces ( Chagla et al., 1980 ). Un autoinhibidor es secretado por las células gigantes para prevenir que otras amibas se desarrollen como células gigantes; así aseguran que las células cigóticas permanecieran como fuente de comida para los cigotos ( O' Day et al., 1981 ).

La evidencia de que el macrocisto es una estructura sexual y la célula gigante representa al cigoto viene de 3 fuentes:

- a) La existencia de tipos de apareamiento en varias especies --- ( Clark et al., 1973; Erdos et al., 1973 ).
- b) La presencia de complejos sinaptonemales en núcleos de la célula



la gigante de Polysphondylium violaceum ( Erdos et al., 1972 ).

c) La liberación de la progenie recombinante de cistos germinados ( Mac Innes y Francis. 1974; Wallace y Raper, 1979; Francis, 1980 ).

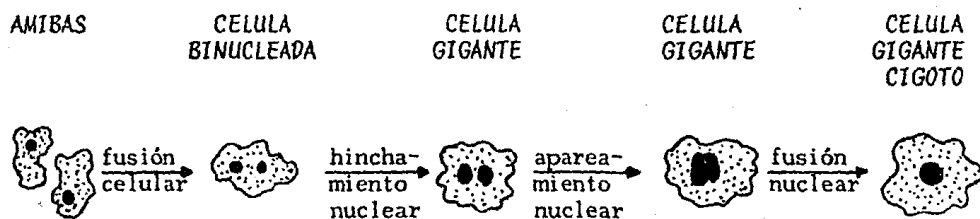
Aunque la vía del macrocisto en D. discoideum presenta un sistema - potencialmente valuable para el análisis genético estructural fino, varios problemas no resueltos lo hacen operacionalmente inefectivo ( Robson y Williams, 1979 ) y solo podrá resolverse estos problemas cuando puedan ser elucidados algunos detalles del evento de apareamiento ( Szabo, O' Day y Chagla, 1982 ).

Para conocer más acerca de los eventos tempranos del proceso de apareamiento de D. discoideum, Szabo, O' Day y Chagla ( 1982 ), analizaron los eventos nucleares mediante tinción fluorescente del núcleo y observaron que la fusión de las células comienza aproximadamente 11 horas después de que los cultivos comienzan a aparearse y continúan hasta las 26 horas.

Aparentemente, la fusión de células comprende una fase de diferenciación, en la cual pequeñas amibas binucleadas son convertidas en células gigantes distintas morfológicamente y de mayor tamaño. Los núcleos se hinchan y a esto sigue una fusión nuclear que convierte a estas células gigantes en verdaderos cigotos. Aunque las células gigantes se desarrollan a -- partir de los productos de la fusión ( O' Day, 1979; Chagla et al., 1980 ), no son el resultado directo de la fusión celular, sino que representan un -

producto de diferenciación post-fusión. Ya que los productos de fusión original son tan pequeños como las amibas no fusionadas, esto sugiere que las células amibianas sexuadas pueden ser más pequeñas que las amibas no sexuadas ( Szabo, O' Day y Chagla, 1982 ).

El  $Ca^{++}$  es esencial, tanto para la fusión celular como para la diferenciación de estos productos hacia células distintas morfológicamente.



El evento de hinchamiento nuclear es análogo al proceso de hinchamiento pronuclear durante la fertilización en animales ( Longo y Anderson, 1968 ).

Cuando los núcleos se hinchan se observa una aparente migración hacia la parte central de la célula gigante. Después de la migración pronuclear viene la fusión de los núcleos en la célula gigante, formándose un cigoto verdadero definido como protozoa ( Grell, 1967 ). Sin embargo no todos los cigotos son simples diploides. Szabo et al., ( 1982 ) encontraron

que solamente un cigoto ( largo y de forma irregular ) residía en el núcleo en cada una de las células cigotas, pero algunas veces un gran número de núcleos adicionales están presentes y éstas son células multinucleadas anormales, aunque los análisis genéticos usando el sistema de macrocisto ( Wallace y Raper, 1979 ), indicaron que solamente un núcleo es el que queda ya -- que los otros son desintegrados.

### 5.3. TIEMPO DE LOS EVENTOS DEL DESARROLLO DE D. discoideum.

Loomis ( 1969, 1970 ) observó que los niveles de  $\beta$ -manosidasa y N-acetilglucosaminidasa se incrementaban rápidamente durante los estados iniciales de la diferenciación, por lo que éstas 2 enzimas se usaron como indicadores de la respuesta a la diferenciación. Woffendin y Greffiths (1982) observaron que existía una relación entre el nivel de estas enzimas y la -- formación del cuerpo fructífero. También estudiaron la respuesta de la diferenciación a diferentes tiempos durante el desarrollo utilizando cultivos sincronizados. Encontraron que la respuesta a la esporulación es diferente cuando las células son tomadas a diferentes tiempos, variando también los niveles de  $\beta$ -manosidasa y N-acetilglucosaminidasa.

Así cuando las amibas fueron cosechadas justo antes del comienzo de la división celular y transferidas a un medio de cultivo para su diferenciación, Woffendin y Greffiths ( 1982 ) observaron mayor formación de cuerpos

fructíferos en células que agotaron su alimento y comenzaron a diferenciarse; en cambio encontraron niveles muy bajos cuando transfirieron las amibas al medio para su diferenciación hacia el final de la fase de división celular.

Poco se conoce acerca de los mecanismos por los cuales se regula el tiempo de los eventos del desarrollo. Este tiempo de desarrollo puede ser afectado por mutación en el DNA de D. discoideum ( Sonnerborn et al., 1963; Loomis, 1970; Atryzek, 1976; Kessin, 1977; Abe y Yanagisawa, 1983 ). Con el objeto de conocer más acerca de los mecanismos de control del desarrollo Abe et al. ( 1983 ), aislaron un número de mutantes rde ( mutantes de desarrollo rápido ) y las analizaron genéticamente. Kessin ( 1977 ) había reportado una mutante ( rde ) FR 17, que llevaba una mutación recesiva rde - A1, localizada en el grupo de unión IV ( D. discoideum contiene 7 cromosomas ), cuya velocidad de desarrollo era más rápida que la normal, sin presentar alteración en el orden de los eventos.

Yanagisawa et al. ( 1983 ) clasificaron a las mutantes rde en 2 grupos A y B, en donde la agregación ocurre varias horas más temprano que en las cepas de tipo salvaje. Sin embargo, encontraron una mutante HTV 506 -- que forma esporas resistentes al calor y células tallo a las 16 horas después de iniciado el desarrollo, mientras que la cepa de tipo salvaje de la cual fue derivada ( XP 55 ), no se diferenció hasta las 24 horas. Esta mutante posee la mutación rde C1850 en el grupo de unión III, diferente al grupo A que tiene la mutación en el grupo de unión IV, mientras que el gru-

po de unión en donde se encuentra la mutación se sabe que es diferente de la mutante HTV 506 por varias características no genéticas.

HTV 506 es clasificada en un nuevo grupo llamado C en donde el tiempo de diferenciación de las células espora y tallo se encuentra reducido, presentando posteriormente un tiempo de agregación normal, por lo que Abe et al. ( 1983 ) sugirieron la existencia de 2 mecanismos, los cuales estaban involucrados en la regulación del tiempo de desarrollo de D. discoideum.

Los genes afectados por las mutaciones rde no se conocen, pero sí se sabe que el metabolismo del AMPc se ve alterado en las mutantes del grupo A y C ( Coukell y Chau, 1980; Abe y Yanagisawa, 1983 ), por lo que la morfología final anormal y la diferenciación bajo condiciones inusuales pueden ser las consecuencias de este metabolismo alterado de AMPc. Características similares de las mutantes rde pueden ser observadas en cepas de tipo salvaje por la adición de AMPc que reduce el tiempo de diferenciación ( Nestle y Sussman, 1972; Gerisch, 1975; Town et al., 1976; Fert et al., 1978 ).

#### 5.4. GENETICA DEL ESTADO DE PSEUDOPLASMODIO.

En D. discoideum 7 son los cromosomas que se pueden distinguir. El contenido de DNA es 11 veces más grande que el de E. coli. El genoma haploide tiene un peso molecular de  $3.6 \times 10^{-10}$  daltones y el 70% del total

del DNA parece ser repetitivo. De acuerdo a los 7 cromosomas, 7 grupos de unión se tienen establecidos con aproximadamente 40 mutantes como marcadores genéticos. Así tanto mutantes bioquímicas como morfológicas han sido mapeadas ( Newell, 1978 ). Pocas han sido las mutantes que han sido estudiadas con respecto al bloqueo bioquímico y sus efectos en los siguientes pasos de la diferenciación. No obstante, una secuencia linealmente dependiente de eventos puede ser descrita, de modo que los eventos antes del bloqueo provocado por la mutación se presentan en forma normal, mientras que los eventos posteriores fallan en ocurrir ( Loomis, 1980 ).

80 loci genéticos han sido asignados a grupos de unión como resultado del análisis parasexual. Los loci son definidos por mutaciones conferidas a una variedad de fenotipos. La mayoría de las mutaciones son recesivas y existe la posibilidad de traslape entre los numerosos loci aberrantes o deficientes en agregación. Es de esperarse que algunas mutaciones de sentido equivocado ( una mutación en la cual un codón que especifica a un aminoácido es alterado, así es que especifica a un aminoácido diferente ) en genes que controlan funciones de agregación tendrán agregación aberrante por defectos ligeros, más que porque no se presente la agregación.

La formación y terminación de la fase de pseudoplasmodio es un ejemplo de un sistema regulatorio que involucra el comportamiento de una estructura multicelular. Se han aislado mutantes con defectos en varias etapas del sistema del desarrollo, capaces de formar el pseudoplasmodio pero incapaces de iniciar el programa para formar el cuerpo fructífero ( Newell

y Ross, 1982 ).

Mediante el sistema genético parasexual de la fusión entre mutantes o entre mutantes y el tipo salvaje y la posterior observación del fenotipo de los diploides resultantes, Newell y Ross ( 1982 ) encontraron mutantes - cuyas mutaciones fueron recesivas y las colocaron dentro de 10 grupos de -- complementación, slg A - slg J.

Los loci slg se encuentran dispersos en 4 de los 7 grupos de unión lo que se sabe gracias al estudio efectuado de la segregación de diploides formados entre los mutantes y las cepas control ( Newell y Ross, 1982 ).

GRUPO DE COMPLEMENTACION	GRUPO DE UNION
slg A	III/VI
slg B	III
slg C	IV
slg D	III
slg E	II
slg F	III/VI
slg G	III/VI
slg H	III + VII
slg I	IV
slg J	VII

El análisis genético parasexual y el análisis citológico de cepas - que llevan la fusión de cromosomas sugiere que el grupo de unión II corresponde al cromosoma II, y que el grupo de unión VII corresponde al cromosoma III ( Welker y Williams, 1980 ). Otras cepas con traslocación de los grupos II y VI han sido reportadas ( Newell y Ross, 1982 ). El grupo de unión V no está genéticamente marcado ( Rauter y Newell, 1978 ), sugiriendo que - puede contener pocos genes mutables ( Loomis, 1980 ).

La fase de pseudoplasmodio es inducida por la producción de amonio de las células en inanición, Newell y Ross ( 1982 ) observaron que las mutantes *slg* presentaron una sobresensibilidad al amonio, principalmente en - las mutantes *slg D*, *slg E* y *slg G*, desarrollando formación del cuerpo fructífero, siendo comprobado esto en mutantes del grupo *slg C*, sugiriendo así que existe un bloqueo en la formación de un compuesto natural que es el que induce la formación del fruto.

#### 5.5. RNAm REGULADORES DEL DESARROLLO.

El análisis de la complejidad y diversidad de las poblaciones de -- RNAm a través de todo el desarrollo ha demostrado que los poliribosomas de las células después de la agregación, contienen aproximadamente 2,500 especies de RNAm que están ausentes en las células en crecimiento ( Blumberg y Lodish, 1980 ). Parece ser que estos RNAm son regulados a nivel transcrip-



cional ( Blumberg y Lodish, 1980; Chung et al., 1981 ).

Britten y Davidson ( 1969 ) propusieron que la expresión genética - puede ser regulada por una cadena de secuencias repetidas. Aproximadamente el 50% del genoma de D. discoideum está organizado como pequeñas secuencias repetidas entre regiones de 250 a 450 pares de bases ( copias sencillas de DNA ) en un modo similar al de la mayoría de los eucariotes superiores -- ( Fertel y Kindle, 1975 ). Parece ser que transcripción del DNA para formar RNA poli (A)<sup>+</sup> se lleva a cabo en secuencias de copia sencilla, covalentemente unidas a pequeñas secuencias repetidas ( Kemmel y Fertel, 1979; -- Constatini, Britten y Davidson, 1980 ).

Zuker y Lodish ( 1981 ) aislaron un fragmento de DNA de D. discoi-- deum designado como pB41-6 que contenía secuencias que estaban repetidas y - diseminadas en el genoma. La mayoría de las especies de RNAm complementarias a pB41-6 eran expresadas solamente durante la diferenciación, sugiriendo un importante papel regulatorio de estas secuencias. Encontraron que su longitud era de 300 a 500 pares de bases y estimaron que estas secuencias - se repetían de 100 a 200 veces en el genoma de D. discoideum.

Las clonas de pB41-6 se encuentran intercaladas en el genoma de Dictyostelium y cuando se expresan se unen a RNAm reguladores del desarrollo; estos RNAm se presentan en la post-agregación pero no en la preagregación y no se detectan en el crecimiento vegetativo.

No se tiene evidencia de la forma específica en que están relacionadas estas secuencias repetidas y la expresión genética diferencial. Se cree que las secuencias complementarias de pB41-6 en un gene dado define a este como codificador de RNAm reguladores del desarrollo.

Gracias a la disponibilidad de mutantes del desarrollo de D. discoideum se ha podido observar que se afectan todas las etapas de la secuencia morfogénica, así como los procesos de transcripción y traducción relacionados con la acumulación de las proteínas reguladoras del desarrollo. El establecimiento de nuevas vías metabólicas como características de estados especializados del desarrollo indican una síntesis intensiva de RNAm y de proteínas de novo. Mientras que en la germinación de la espora y el estado vegetativo los RNAm parecen estables, durante el desarrollo existen cambios en el nivel de RNAm.

En el desarrollo existe degradación de moléculas de RNAm en forma constante sin que se observen cambios drásticos. El recambio del total de RNA traducido durante el ciclo de vida varía en aproximadamente un 25%. La vida media del RNA total en células agregándose es de aproximadamente 180 minutos; en células vegetativas y otros estados del desarrollo es por lo menos de 230 minutos. Algunas especies de RNA tienen una aparente vida media que va de 13 a 420 minutos dependiendo del RNAm ( L. Nover, 1982 ).

Cerca de 5,000 secuencias de RNA poliadenilado son encontradas en los polirribosomas de amibas en crecimiento. La mayoría de estas secuencias

de RNAm continúan presentes a través de todo el desarrollo ( Blumberg y Lodish, 1980 ). Por otra parte, cerca de 3,000 secuencias de RNA poliadenilado aparecen en el citoplasma de las células en desarrollo solamente después de la formación de los agregados ( Blumberg y Lodish, 1980 ).

Cuando se formaron los agregados y se disgregaron experimentalmente se observó una rápida y selectiva pérdida de RNAm dependiente de la agregación; en cambio, los RNAm que se encuentran a través de todo el desarrollo permanecieron presentes a nivel normal. La síntesis de RNAm dependiente de la agregación también se redujo ( Chung et al., 1981 ).

Margioratte, Lefebvre y Lodish ( 1982 ) estudiaron la estabilidad de los RNAm dependientes de la agregación y los del desarrollo, y encontraron que su promedio de vida media fue de 3 a 4 horas. La determinación se hizo mediante la medición del nivel de radioactividad en secuencias de RNAm específicas previamente clonadas. Estas clonas consistieron de fragmentos de DNA nuclear insertados en el fago y una de estas clonas, PL3, cuando se le adicionó AMPc al cultivo después de la disgregación previno la pérdida de las secuencias de RNAm ( Chung et al., 1981 ).

#### 5.6. FAMILIAS DE GENES EN D. discoideum.

El análisis de clonas y el análisis de las secuencias genómicas, --

han mostrado que discoidina I ( proteína que interviene en la agregación; ver capítulo de agregación ), es codificada por 4 genes, 3 de los cuales difieren uno del otro en secuencia ( Poole et al., 1981 ). La forma nativa de discoidina I es un tetrámero ( Simpson, Rosen y Barondes, 1974 ).

Otra familia de genes cuya expresión es modulada por el desarrollo son los genes de la actina; D. discoideum contiene 17 genes conocidos para la actina ( Kindle y Fertel, 1978; Mc Keown et al., 1978 ). Muchos de ellos son sustancialmente similares, produciendo secuencias de aminoácidos que divergen en las secuencias no codificantes 3' y 5' ( Mc Keown y Fertel, 1981 ). Se encontró que 2 de los genes eran expresados a diferentes niveles y con diferentes variaciones en el nivel durante el programa de desarrollo ( Mc Keown y Fertel, 1981 ). Uno de los genes parece apagarse durante la inanición, y otro parece expresarse durante la agregación. No se sabe si los diferentes productos de la actina tienen diferentes funciones ( Fertel, 1981 ).

Muchas secuencias de copia sencilla en el DNA de D. discoideum están distribuidas con secuencias repetidas cortas. Estas secuencias repetidas se cotranscriben con las secuencias de copia sencilla ( Zucker y Lodish 1981 ). Un ejemplo de estas secuencias repetidas es M4 ( AAC )<sub>n</sub>, presente en aproximadamente 1% del RNA vegetativo. Quizá estas secuencias repetidas representen sitios de control comunes para la expresión del gene ( Kemmel y Fertel, 1981; Zucker y Lodish, 1981 ).

### 5.7. UN PLASMIDO ENDOGENO EN D. discoideum.

Se han obtenido y estudiado mutaciones resistentes a cobalto en D. discoideum ( Welker y Williams, 1980 ). Con excepción de una, cob 354, todas las mutaciones estudiadas se mapearon en el locus cob A presente en el grupo de unión VII ( Williams, 1978; Welker y Williams, 1980 ). La inestabilidad de la resistencia a cobalto y los niveles altos de resistencia y dominancia en el tipo salvaje ( Williams, 1978 ), condujeron a sospechar que la resistencia a cobalto era producida por un plásmido. La localización de este elemento extracromosomal fué comprobada por la observación al microscopio electrónico de círculos de 4  $\mu$ m de diámetro, que corresponden aproximadamente a 13 Kbp ( Metz et al., 1983 ).

Ya que el DNA de D. discoideum tiene un alto contenido de A - T - ( Keimmel y Fertel, 1982 ), Metz et al. ( 1983 ) supusieron que el plásmido podía ser digerido con enzimas de restricción que reconocieran secuencias ricas en A - T; así encontraron que el plásmido Ddp 1 tuvo un alto contenido de A - T típico del DNA de Dictyostelium, sin que este se halle relacionado con el DNA mitocondrial o ribosomal.

Debido a que D. discoideum fué crecido sobre Klebsiella aerogenes, se sospechó que el plásmido podría ser de origen bacteriano, se comprobó que no fué así ya que:

1.- Se clonó Ddp en pBR 322 y se probó su habilidad para conferir resistencia a E. coli frente a cobalto. No se observó ningún incremento en la resistencia.

2.- La digestión del DNA por enzimas de restricción, tanto del plásmido como de Klebsiella aerogenes, dieron fragmentos de restricción diferentes.

3.- No se observó hibridación del plásmido con plásmidos de K. aerogenes ni otras secuencias de Klebsiella.

El plásmido no parece codificar para ninguna función esencial, ya que cepas del tipo salvaje no parecen contener el plásmido, y el crecimiento por largo tiempo en medio axénico resulta en la pérdida del plásmido.

Ddp 1 se localiza en el núcleo y puede ser transferido a otras cepas por técnicas genéticas parasexuales. Ddp 1 fué descubierto en la cepa AV 32, que es inestable a la resistencia a cobalto y se cree que de alguna manera no específica produce un cambio en la membrana celular (Metz, 1983) ya que el plásmido también suprime la sensibilidad a cumarina, asociada con la mutación cou A 351. La pérdida del plásmido también está asociada con la habilidad de D. discoideum para crecer en un medio axénico, lo cual requiere indudablemente de un cambio en la membrana (North y Williams, 1978 ).

## **CONCLUSIONES**

## CONCLUSIONES

Para el estudio de la diferenciación celular en organismos eucariotes, se ha escogido a D. discoideum como un buen ejemplo, ya que es un organismo que vive en forma vegetativa como una célula independiente y aislada cuando las condiciones medio ambientales son favorables, y como una masa -- multicelular con diferentes tipos de células, cada una de ellas con una función específica, cuando las condiciones medio ambientales son desfavorables.

Tanto de los cambios morfológicos como bioquímicos se puede concluir:

1.- Las células de D. discoideum presentan polaridad, tanto individual como en el agregado, como una respuesta al AMPc para iniciar la formación de un agregado multicelular.

2.- Cada célula en el agregado tiene una función específica, pero son independientes una de otra.

3.- Existe una proporción constante entre los diferentes tipos celulares y es muy probable que sean las células de " tipo anterior " las encargadas de conservar esta proporción.



4.- Estímulos físicos tales como luz, temperatura y humedad afectan la velocidad de migración del pseudoplasmodio. No es importante la naturaleza del estímulo sino su intensidad.

5.- Los receptores de superficie como discoidina I y II, sitios de contacto A y receptores de alta y baja afinidad al AMPc son necesarios para el contacto célula-célula, tanto durante la preagregación como durante la postagregación.

6.- El AMPc es el iniciador de la diferenciación, y en respuesta a la ocupación de los receptores del AMPc de la superficie celular las células de D. discoideum liberan  $Ca^{++}$  el cual, aparentemente, está involucrado en la activación de la adenilato ciclasa para producir AMPc intracelular y la guanilato ciclasa para producir GMPc intracelular.

7.- El período de adaptación asegura la sensibilidad de las células al AMPc, y este período dura el tiempo que los receptores de superficie del AMPc se encuentren ocupados.

8.- El GMPc es sintetizado como una respuesta de las células al AMPc para así poder inducir otras respuestas intracelulares tales como la inducción de las fosfodiesterasas ligadas a la membrana, cuya función es mantener a las células con la sensibilidad adecuada para responder a nuevos estímulos de AMPc (sistema ePD-PDI).

9.- En la inanición el 80% de las proteínas cambian al pasar las células del estado vegetativo al de diferenciación. El metabolismo de D. discoideum cambia ya que muchos de los genes de la fase vegetativa dejan de ser traducidos, iniciándose la traducción de otros, por lo que los RNAm también cambian. La cantidad de proteínas sintetizadas durante el desarrollo disminuye, comparadas con la fase vegetativa. Estos cambios también se presentan en el glicoproteínas y lípidos.

10.- La síntesis de proteínas es dependiente del AMPc. Existe la aparición de proteínas específicas en cada una de las etapas del desarrollo como una respuesta al encendido de genes en forma secuencial conforme se esta llevando a cabo la diferenciación, y su acumulación e importancia ha podido ser determinada por el uso de proteasas y mutantes del desarrollo.

11.- Los análisis de complementación y de enlace se han podido efectuar mediante la recombinación parasexual de D. discoideum, así se sabe que existe el locus mat que es el responsable del apareamiento. No se encontró información más amplia de esto, pero se sabe que existen varios tipos de apareamiento.

12.- Durante la recombinación sexual de D. discoideum se forma un macrocisto, y es en esta estructura en donde se lleva a cabo la meiosis. - Las condiciones para que se lleve a cabo la recombinación parasexual o sexual dependerá del tipo de apareamiento, porque parece que solo un tipo de apareamiento es el que da lugar a la formación de feromonas volátiles que

son las que inducen la formación del macrocisto.

13.- Durante la formación del macrocisto también parece existir la diferenciación, ya que se forman las llamadas células gigantes, las cuales inician la formación de un endocito que dará origen al macrocisto.

14.- Se ha comprobado que existe la linealidad dependiente de los eventos del desarrollo, ya que no es posible la aparición de un nuevo evento sin que haya existido previamente un evento anterior específico.

15.- Son 7 los grupos de unión localizados en 4 cromosomas de D. discoideum, cada grupo de unión presenta características bioquímicas y morfológicas particulares.

16.- La existencia de secuencias repetidas simples del genoma, parecen ser un modo de regulación ya que cuando se expresan parecen unirse a los RNAm del desarrollo. Así se observa la aparición de RNAm poliadenilado durante el desarrollo. Tales mecanismos son de alguna forma los que regulan las proteínas que aparecen durante la diferenciación.

Aún falta mucho por conocer con respecto a las respuestas celulares durante la diferenciación, ya que para que se lleve a cabo una respuesta, intervienen varios factores, que conjuntados cada uno de ellos dará por resultado un comportamiento específico, por lo tanto, algunos eventos ----

aparentemente aislados de alguna forma intervienen para que, ya sea en ese momento o después, se integren como parte de un todo.

El estudio de los organismos que presentan diferenciación celular, así como los factores que la inducen, son claves importantes para después - extrapolar los conocimientos adquiridos hacia los eventos que ocurren durante el inicio de la diferenciación de las células humanas en la enfermedad llamada cáncer, y así conocer más acerca de los posibles eventos bioquímicos, así como las causas genéticas que lo generan, y de esta manera poder evitar e impedir el progreso de esta enfermedad.

## **BIBLIOGRAFIA**

## BIBLIOGRAFIA

- Abe et al., 1983. Genetic analysis of gene regulating the timing of developmental events in Dictyostelium discoideum. Journal of General Microbiology. 129: 1623-1628.
- Abe and Yanagisawa, 1983. A new class of rapidly developing mutants in -- Dictyostelium discoideum: implications for cyclic AMP metabolism and cell differentiation. Developmental Biology. 95: 200-210.
- Alcantara and Monk, 1974. Signal propagation during aggregation in the - slime mold Dictyostelium discoideum. J. Gen. Microbiol. 85: 321-334.
- Alton and Lodish, 1977. Dev. Biol. 60: 180-206.
- Atryzek, 1976. Alteration in timing of cell differentiation resultin from cell interactions during development of the cellular slime mold Dictyostelium discoideum. Dev. Biol. 50: 489-501.
- Barondes, SH., 1980. In cell adhesion and motility. Eds. Curtis, A. and Pitts, J. ( Columbia Univ. Press. New York ) pp. 309-328.
- Bartles, Santoro and Fraizer, 1982. Biochim. Biophys. Acta. 687: 137-146.

- Bartles et al., 1982. Discoidin I. Membrane interactions II. Discoidin I binds to and agglutinates negatively charged phospholipid vesicles. -- *Biochim. Biophys. Acta.* 687: 129-136.
  
- Bartles et al., 1982. Discoidin I. Membrane interactions III. Interaction of discoidin I with living Dictyostelium discoideum cell. *Biochim.-Biophys. Acta.* 687: 137-146.
  
- Bartles, R. and William, A., 1982. Discoidin I binds to two types of receptor on fixed Dictyostelium discoideum cell. *Biochim. Biophys. Acta.* - 687: 121-128.
  
- Berger, E. and Randall, D., 1982. Discoidins I and II. Common and unique regions on two lectins implicated in cell-cell cohesion in Dictyostelium discoideum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 2162-2166.
  
- Bernstein et al., 1981. Folate deaminase and cyclic AMP phosphodiesterase in Dictyostelium discoideum: Their regulation by extracellular AMP on -- folic acid. *Cell. Differ.* 10: 79-86.
  
- Beug et al., 1973. Dynamics of antigenic membrane sites relating to cell aggregation in Dictyostelium discoideum. *J. Cell. Biol.* 56: 647-658.
  
- Blaskovics, J. and Raper, K., 1957. Encystment stages of Dictyostelium. *Biol.* 113: 58-88.

- Bonner, 1967. "The Cellular Slime Molds" 2nd. ed., Princeton Univ. -- Press.
- Bonner et al., 1969. Acrasin, acrasinase and the sensitivity of acrasin in Dictyostelium discoideum. Dev. Biol. 20: 72-87.
- Bonner, J., 1944. A descriptive study of the development of the slime -- mold Dictyostelium discoideum. Amer. J. Bot. 31: 175- 182.
- Bonner, J., 1952. The pattern of differentiation in amoeboid slime molds. Amer. Natur. 86: 79-89.
- Bonner, J., 1957. A theory of the control of differentiation in the cellu lar slime molds. Quart. Rev. Biol. 32: 232-246.
- Brookman et al., 1982. Dev. Biol. 83: 96-101.
- Cardelli, J. and Dimond, R., 1981. Dev Biol. 82: 180-185.
- Cardelli, J. and Dimond, R., 1981. Regulation of protein synthesis in -- Dictyostelium discoideum: Effects of starvation and anoxia on initiation. Biochemistry. 20: 7391-7398.
- Christman, 1973. Biochim. Biophys. Acta. 294: 153-164.



- Chagla, A., Lewis, K. and O'Day, 1980.  $Ca^{++}$  and cell fusion during several development in liquid cultures of Dictyostelium discoideum, Exp. Cell. Res. 126: 501-503.
- Clark et al., 1973. Mating types in cellular slime molds. Biochim. Biophys. Res. Commun. 52: 672-678.
- Coukell and Chau, 1980. The precocious appearance and activation of an adenylate cyclase in a rapid developing mutant of Dictyostelium discoideum. FEBS Letters. 110: 39-42.
- Crean et al., 1981. Lysosomal abnormalities in hadacidin treated Dictyostelium discoideum amoebae. Journal of General Microbiology. 123: 253-257.
- Darmon et al., 1975. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72: 3163-3166.
- Devine, K. et al., 1982. Differential synthesis of spore coat proteins in prespore and prestalk cells of Dictyostelium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79: 7361-7365.
- Devreotes, P., Derstine and Steck, T., 1979. Cyclic 3',5'-AMP relay in Dictyostelium discoideum. 1. A technique to monitor responses to controlled stimuli. J. Cell. Biol. 80: 291-299.
- Dicou, E. and Brachet, D., 1980. A separated phosphodiesterase for hydro

- lysis of cyclic guanosine 3',5'-monophosphate in growing Dictyostelium discoideum amoebae. Eur. J. Biochem.. 109: 507-514.
- Dinauer, Steck and Devreotes, 1980. Cyclic 3',5'-AMP relay in Dictyostelium discoideum. V. Adaptation of the cAMP signaling response during -- cAMP stimulation. J. Cell. Biol. 86: 554-561.
- Dinauer, M., Steck and Devreotes, 1980. Cyclic 3',5'- AMP relay in Dictyostelium discoideum. IV. Recovery of the cAMP signaling response after adaptation to cAMP. J. Cell. Biol. 86: 545-553.
- Dinauer, M., Mac Kay and Devreotes, R., 1980. Cyclic 3',5'-AMP relay in Dictyostelium discoideum. III. The relationship of cAMP synthesis and secretion during the cAMP signaling response. J. Cell. Biol. 86: 537-544.
- Erdos et al., 1973. Mating types and macrocyst formation in Dictyostelium discoideum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70: 1828-1830.
- Erdos, G., Raper, K. and Vegen, L., 1976. Effects of light and temperature on macrocyst formation in paired mating types of Dictyostelium discoideum. J. Bacteriol. 128: 495-497.
- Filosa, M. and Dengler, R., 1972. Ultrastructure of macrocyst formation in the cellular slime mold, Dictyostelium mucoroides. Extensive phagocytosis of amoebae by a specialized cell. Dev. Biol. 29: 1-16.

- Firtel et al., 1979. Unusual nucleotide sequence at the 5' end of actin genes in Dictyostelium discoideum. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 12: - 6206-6210.
- Fiona, M. and Newell, P., 1981. Streamers: Chemotactic mutants of Dictyostelium discoideum with altered cyclic GMP metabolism. J. Gen. Microbiol. 127: 339-350.
- Forman, D., Garrod, D., 1977. Pattern formation in Dictyostelium discoideum. I. Development of prespore cells and its relationship to the pattern fruiting body. J. Embryol. Exptl. Morphol. 40: 215.
- Futrelle, R., 1982. Dictyostelium chemotactic response to spatial and temporal gradients. J. Cell. Biochem.
- Fisher, D., 1981. The separation of cells and organelles by partitioning in two polymer aqueous phases. Biochem. J. 196: 1-10.
- Futrelle, R., et al., 1982. Cell behavior in Dictyostelium discoideum: Preaggregation response to localized cyclic AMP pulses. J. Cell. Biol. 92: 807-821.
- Fraizer et al., 1975. Purification and comparison of two developmentally regulated lectins from Dictyostelium discoideum. J. Biol. Chem. 250: --- 7714.

- Francis, D., 1980. Techniques and marker genes for use in macrocyst genetics with Polysphondylium pallidum. *Genetics*. 96: 125-136.
- Geltosky et al., 1979. *Cell*. 18: 391-398.
- Gerisch et al., 1975. Control of cell contact sites by cyclic AMP pulses in differentiation Dictyostelium cells. *Nature* 265: 547.
- Gerisch G., et al., 1975. Cell communication by periodic cyclic-AMP pulses. *Phil. Trans. Roy. Soc. London. Ser. B* 272: 181-192.
- Gerisch 1980. Univalent antibody fragments as tools for the analysis of cell interactions in Dictyostelium. *Curr. Top. Dev. Biol.* 14:243.
- Gerisch, G. and Wick, U.; 1975. Intracellular oscillations and release of cyclic-AMP from Dictyostelium cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65:-364-370.
- Gingold and Ashworth, 1974. Evidence for mitotic crossing over during parasexual cycle of cellular slime mould Dictyostelium discoideum. *J. Gen. Microbiol.* 84: 70-78.
- Godfrey and Sussman, 1982. The genetics of development in Dictyostelium - discoideum. *Ann. Rev. Genet.* 16: 385-404.

- Grell, K., 1976. Sexual reproduction in protozoa. In *Research in Protozoology*. ( T.T. Chem. ed. ) Vol. 2 pp. 149-213. Pergamon, Oxford.
- Green, A. and Newell, P., 1975. Evidence for the existence of two types of cAMP binding sites in aggregating cells of Dictyostelium discoideum. *Cell*. 6: 129-136.
- Grutsch, J. and Robertson, A., 1978. The cAMP signal from Dictyostelium discoideum amoebae. *Dev. Biol.* 66: 285- 293.
- Hase, A., 1982. Changes in phospholipid composition during the development of Dictyostelium discoideum. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 219: 21-29.
- Hayashi and Takeuchi, 1981. Differentiation of various cell types during fruiting body formation of Dictyostelium discoideum. *Develop. Growth Differentiation* 23: 533- 542.
- Henderson, E., 1975. The cyclic adenosine 3',5'-monophosphate receptor of Dictyostelium discoideum . *J. Biol. Chem.* 250: 4730-4736.
- Ishida, S., 1980. A mutant of Dictyostelium discoideum capable of differentiating without morphogenesis. *Development Growth and Differentiation* 22: 143-152.

- Ishida, S., 1980. The effects of cyclic AMP on differentiation of a mutant Dictyostelium discoideum capable of developing without morphogenesis. *Development, Growth and Differentiation* 22: 781-788.
- Ishida, S., 1982. A mutant of Dictyostelium discoideum with alternative pathways of differentiation depending on culture conditions. *J. Gen. Microbiol.* 128: 411-414.
- Julian, M., Brusca, J. and Klein, C., 1981. *Dev. Biol.* 83: 114-121.
- Kafer, B., 1977. Mitotic recombination in Aspergillus and its chromosomal aberrations. *Adv. Genet.* 19: 133-131.
- Kakebeeke et al., 1979. Negative chemotaxis in Dictyostelium and Polysphondylium. *Exp. Cell. Res.* 124: 429-433.
- Katz, E. and Yao, V., 1974. Evidence for mitotic recombination in the cellular slime mold Dictyostelium discoideum. *Proc Natl. Acad. Sci. USA.* 71: 4025-4026.
- Katz and Sussman, 1972. Parasexual recombination in Dictyostelium discoideum selection of stable diploid heterozygotes and stable haploid segregants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 69: 495-498.
- Kay et al., 1967. Cell differentiation in Dictyostelium discoideum. *Di-*

- Keating and Bonner, 1977. Negative chemotaxis in Cellular slime molds, -  
Journal of Bacteriology. 130:144-147.
- Kelpatrick et, al 1980. The effect of chynotrypsium on the development -  
of Dictyostelium discoideum. J. Embryal Exp. Morphol. 57:189
- Kessium, 1972. Mutations causing rapid developmen D.d. Cell. 10:703-708.
- Kimmel and Fertel R. 1979. Cell. 16:787-796.
- Kimmel and Fertel.R. 1982. The development of D. de Academic Press. N.Y.  
pp. 233-324.
- Klein, C. 1976. Adenylate cydase activity in Dictyostelium discoideum -  
amoebae and ist changes during differentiation. F.E.B.S. Lett. 68:125-  
128.
- Klein, C. and Darmen 1977, Effects of c.AMP pulses of adenylate cyclase  
and the phaspho diesterace inhibitios of D. discoideum. Nature. 208:76-78.
- Konyn T. et. ad., 1968. The acrasin activity of ademosine 3', 5' -Cyclic  
phospate. Prac. Natl Acad. Sci, USA. 58:1152-1154.
- Konyn T. et. ad. 1968. Cyclic AMP: Anaturally occurring acroxin in the  
cellular slime malds. Amer. Nat. 102:225-233.

- Lappano, S. and Caukell M. 1982. Evidence that intracellular cGMP. is involved in regulation the extracellular cAMP phosphodiesterase and its specific inhibitor in *D.d.* *Dev. Biol.* 93:43-53.
- Lewis and O'Day. 1977. sex hormone of *Dictyostelium* is volatile. *Nature.* 208:730-731.
- Longo F. and Aderson E, 1968. The fine structure of pronuclear development and fusion in the seaurchin *Arbacea punctulata*. *J. Cell. Biol.* 39, 339-368.
- Loomis, 1970. Temporal control of differentiation in the slime mold *D.d.* *Experimental. Cell Research* 60:285-289.
- Loomis W. 1980. A . glucosidase gene of *D.d.* *Devel. Genet* 1:241-246.
- Lubs - Han Keness and Klein., 1982. Cyclic Nucleotide dependent phosphorylation in *Dictyostilium* *J. Biol. Chem.* 257:12204-12208.
- Mac Innes and Frances 1974. Meiosis *Dectyostelium mucocides*. *Nature.* 251: 321-324.
- Mac Williams, H. and Bonner J. 1970. The prestalk prepare paltem in cellular slime molds. *Differentiation* 14:1-22.



- Mac Williams, H. 1982. Transplants experiments and paltem mutants in --  
cellular slime mald slugs.
- Madley., et. al. 1981. Common Cell-Sulface receptors for discoidin I and  
discoidin II in D.d. Differentiation 20:278-282.
- Malchow, D. and Gerisch G., 1973. Cyclic AMP binding to living cells of  
D.d. in the presence of excess cyclic GMP Biochim, Biophys. Res. Comm-  
un. 55:200-204.
- Malchow D. and Gerisch G. 1974. Shart - Terem binding and hydrolysis of  
cyclic 3' y 5' - adenasine microphosphate by aggregating Dictyostilium  
cells. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 71:2423-2427.
- Malchow. et. ad. 1972. Mimbrane-baund cyclic AMP. phosphodiesterase in  
chemotactically responding cells of D.d. Eur J. Beachem. 28:136-142.
- Margolskee. et. ad. 1980. Dev. Bead. 74,409-421.
- Margionatte, Lefivre and Jodish 1982. Defferences en the Stability of  
Developmentally regulated in RNAs in Aggregated anad disaggregated D.d.  
cells. Dev. Biol. 89:82-91.
- Mato., et. al. 1977. Unified control of chemotoxis and cAMP mediated  
cGMP accumulation by cAMP in D.d. Biochen Biophys. Res commun 77:399-  
402.

- Mato et al., 1978. A model for cyclic AMP-chemoreceptor interaction in D. discoideum. *Biochem. Biophys. Acta* 544: 309-314.
- Mato, J. and Malchow, D. 1978. Guanylate cyclase activation in response to chemotactic stimulation in D. discoideum. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett* 90: 119-122.
- Mato, J. and Marin-Cao. 1979. Protein and phospholipid methylation during chemotaxis in D. discoideum and its relationship to calcium movements. - *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 72: 4991-4993.
- Metz et al., 1983. Identification of an endogenous plasmid in D. discoideum. *The EMBO Journal* Vol. 2, 4: 1515-1519.
- Morrissey et al., 1980. New loci in D. discoideum determining pigment formation and growth on B. subtilis. *Genetics* 96: 115-124.
- Mullens, and Newell, 1978. cAMP binding to cell surface receptors of Dicystostelium. *Differentiation* 10: 171-176.
- Muller and Gerisch, 1978. *Nature* 4: 445-449.
- Nestle and Sussman, 1972. The effect of cyclic AMP on morphogenesis and enzyme accumulation in D. discoideum. *Dev. Biol.* 28: 545-554.

- Newell, Telser and Sussman, 1969. Alternative developmental pathways determined by environmental conditions in the cellular slime mold D. discoideum. *J. Bacteriol.* 100:763.
- Newell et al., 1977. Sensitivity to B. subtilis: A novel system for selection of heterozygous diploids of D. discoideum. *Journal of General Microbiology.* 100: 207-211.
- Newell, 1978. Genetics of the cellular slime molds. *Ann. Rev. Genet.* 12: 69-93.
- Newell, 1978. Cell surface cAMP receptors in Dictyostelium. *Exp. Biol.* 35: 161-171.
- Newell and Fiona, 1982. Genetic analysis of the slug stage of D. discoideum. *Journal of General Microbiology* 128: 1639-1652.
- Nickerson y Raper, 1973. Macrocysts in the life cyclic of the Dictyosteliaceae II. Germination of the macrocysts. *Ann. J. Biol.* 60: 247-254.
- North and Williams, 1978. *J. Gen. Microbiol.* 107: 223-230.
- North, M. 1982. A study of the proteinase activity released by D. discoideum during starvation. *J. General Microbiology.* 128: 1653-1659.

- Nover, 1982. *Molecular bases of cell differentiation. Cell differentiation.* Edited by Lutz, Nover, Martin. Springer Verlag B. Freidelberg. New - York.
- O' Day D., 1979. Aggregation during sexual development in D. discoideum. *Can. J. Microbiol.*, 25: 1416-1426.
- O' Day D. and Durston, A., 1979. Evidence for chemotaxis during mating - in D. discoideum. *Can. J. Microbiol.* 25: 542-544.
- Okamoto, K., 1981. Differentiation of D. discoideum in suspension culture *J. of General Microbiology.* 127: 301-308.
- O' Day D. and Lewis, 1981. Pheromonal interactions during mating in Dictyostelium. In *sexual interactions in eukaryotic microorganisms*. Ed. D.H. O' Day. P.H. Horgam pp. 199-201. New York Academic 407.
- O' Day Szabo and Chagla, 1982. An autoinhibitor of zygote giant cell for mation in D. discoideum. *Exp. Cell. Res.* 131: 456-458.
- Orloweki and Loomis, 1979. Plasma membrane proteins of Dictyostelium: the spore coat proteins. *Dev. Biol.* 71: 297.
- Pan et al., 1972. Folic acid as second chemotactic substance in the cellular slime moulds. *Nature New Biol.* 237: 181-182.

- Pan et al., 1978. Linkage analyses in D. discoideum using multiply marked tester strains: Establishment of linkage group VII and the reassessment of earlier linkage data. *J. Gen. Microbiol.* 109: 225-236.
- Parnas, H. and A. Segel, 1978. A computer simulation of pulsatile aggregation in D. discoideum. *J. Theor. Biol.* 71: 185-207.
- Parthier and Lerbs, 1982. Cell differentiation molecular bases and problems. Edited by Lutz, Nover and Martin. Springer Verlag. B. Freidelberg New York 1982.
- Peacey, M. and J. Gross, 1981. The effect of proteases on gene expression and cell differentiation in D. discoideum. *Differentiation* 19: 184-193.
- Ramagopal S. and Ennes H., 1982. Ribosomal protein synthesis during spore germination and vegetative growth in D. discoideum. *The Journal of Biological Chemistry* 257: 1025-1031.
- Raper, K., 1940. Pseudoplasmodium formation and organization in D. discoideum. *J. Elisha Mitchell Sci. Soc.* 56: 241-282.
- Ratner, D. and Wayne, B., 1983. Comparison of differentiating D. discoideum cell types separated by and improved method of density gradient centrifugation. *Experimental Cell Research* 143: 1-13.

- Riedel et al., 1972. Cyclic AMP phosphodiesterase interaction with its inhibitor of the slime mould, D. discoideum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 46: 279-287.
- Robson and Williams, 1979. Vegetative incompatibility and the mating type locus in the cellular slime mould D. discoideum. *Genetics* 93: 861-875.
- Ross and Gerisch, 1976. Receptor-mediated adenylate cyclase activation in D. discoideum. *FEBS Lett.* 68:170-172.
- Ross et al., 1977. Adenylate cyclase activity oscillations as signals for cell aggregation in D. discoideum. *Nature* 266: 259-260.
- Ross, F. and Newell, P., 1981. Streamers: chemotactic mutants of D. discoideum with altered cyclic GMP metabolism. *J. Gen. Microbiol.* 127: 339-350.
- Rossier et al., 1978. Action of slowly hydrolyzable cyclic AMP analogue on developing cell of D. discoideum. *J. Cell Sci.* 35: 321-338.
- Rossomando et al., 1978. Protease secretion during onset of development in D. discoideum. *J. Cell Sci.* 30: 305-318.
- Rossomando et al 1981. Isolation and characterization of adenylyl-protein complex forming during incubation of membranes from D. discoideum with

- ATP. *Biochem. Biophys. Acta* 675: 386-391.
- Sakai, Y., 1973. Cell type conversion in isolated prestalk and prespore fragments of the cellular slime mold D. discoideum. *Develop. Growth Differentiation* 15: 11.
  - Sampson et al., 1982. Cyclic AMP and the control of aggregative phase gene expression in D. discoideum. *Dev. Biol.* 67: 54-64.
  - Sampson, J., 1977. *Cell* 11: 173-180.
  - Schindler and Sussman, 1977. Ammonia determines the choice of morphogenetic pathways in D. discoideum. *J. Mol. Biol.* 116: 161.
  - Schmidt, J. and Stirling, J. 1982. Developmentally regulated enzymes and cyclic AMP-binding sites in D. discoideum cells blocked during development by chymotrypsin. *Biochem. J.* 206: 185-193.
  - Sharpe, P. et al., 1982. Studies of early stages of differentiation of cellular slime mould D. discoideum. *J. Embryol exp. Morph.* Vol. 67: 181-193.
  - Sonnerborn et al., 1963. Mutation affecting both rate and pattern of morphogenesis in D. discoideum. *Dev. Biol.* 7: 79-93.

- Sternfeld, j. and David C., 1981. Cell sorting during pattern formation in D. discoideum. *Differentiation* 20: 10-21.
- Sternfeld and David, 1982. Fate and regulation of antero-like cells in Dictyostelium slugs. *Dev. Biol.* 93: 111- 118.
- Sussman and Sussman, 1962. Ploidal inheritance in D. discoideum: Stable haploid, stable diploid and metastable strains. *J. Gen. Microbiol.* 28: - 417-429.
- Sussman, M. and Schindler, ]J., 1978. A possible mechanism of morphogenetic regulation in D. discoideum. *Differentiation* 10: 1-15.
- Szabo, S., O' Day D. and Chagla, H., 1982. Cell fusion nuclear fusion and zygote, differentiation during sexual development of D. discoideum. *Dev. Biol.* 90: 375-382.
- Takeuchi et al., 1978. Regulation of cell differentiation in slime mold development. *Bot. Mag. Tokyo Special Issue* 1: 47.
- Tasaka and Takeuchi, 1983. Cell patterning during slug migration and -- early culmination in D. discoideum. *Differentiation* 23: 184-188.
- Toda et al., 1980. *Eur. J. Biochem.* 11: 377-388.



- Toda et al., 1980. Surface labeling of membrane glycoproteins and their drastic changes during development of D. discoideum. Eur. J. Biochem. -- 111: 377-388.
- Toda et al., 1981. Developmentally regulated glycoprotein alterations in D. discoideum. J. Biochem. 90: 1429-1436.
- Town, C. and Stanford, E., 1978. The role of cyclic nucleotides and cell agglomeration in postaggregative enzyme synthesis in D. discoideum. Dev. Biol 63: 412-420.
- Tomchik, K. and Devreotes, P., 1981. Adenosine 3',5'-monophosphate waves in D. discoideum: a demonstration by isotope dilution fluorography. Sci. - ( Wash. D.C. ) 212: 443-445.
- Town et al., 1976. Cell differentiation without morphogenesis in D. discoideum: haploidization of diploid strains using benlate. FEMS Microbiology Letters 4: 155-159.
- Town, C. and Stanford, e., 1979. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 308-312.
- Tsang, A. and Coukell, M., 1977. The regulation of cyclic AMP phosphodiesterase and its specific inhibitor by cyclic AMP in Dictyostelium. Cell - Differ. 6: 75-84.

- Van Haastert. 1981. High-performance liquid chromatography of nucleobases, nucleosides and nucleotides II. Mobile phase composition for the separation of charged solutes by ion-exchange chromatography. *J. Chromatogr.* 210: 241-254.
- Van Haastert et al., 1981. Evidence that the role of association of adenosine 3',5'-monophosphate to its chemotactic receptor induces phosphodiesterase activity in *D. discoideum*. *J. Bacteriol.* 147: 170-175.
- Van Haastert et al., 1982. Phosphodiesterase induction in *D. discoideum* by inhibitor of extracellular phosphodiesterase activity. *Dev. Biol.* 94: 240-245.
- Van Haastert et al., 1982. Nonequilibrium kinetics of cyclic GMP binding protein in *D. discoideum*. *J. Cell. Biol.* 94: 271-278.
- Van Haastert et al., 1982. Evidence for a messenger function of cyclic GMP during phosphodiesterase induction in *D. discoideum*. *J. Bact.* 152: 232-238.
- Van Haastert and Konijn, 1982. Signal transduction in the cellular slime molds. *Mol. Cell. Endocr.* 26: 1-17.
- Van Haastert et al., 1983. Excitation, adaptation and deadaptation of cAMP-mediated cGMP response in *D. discoideum*. *J. Cell. Biol.* 96: 347-353.

- Varnum, B. and Sall, R., 1981. Chemoresponsiveness to cAMP and folic acid during growth development and differentiation in D. discoideum. *Differentiation* 18: 151-160.
- Wallace and Raper, 1979. Genetic exchanges in the macrocysts of D. discoideum. *J. Genet. Microbiol.* 113: 327-337.
- Ward, A., and Brenner, M. 1977. Guanylate cyclase from D. discoideum. *Life Sci.* 21: 997-1008.
- Welker, D. and Deering, R., 1978. Genetics of radiation sensitivity in the slime mould D. discoideum. *J. Gen. Microbiol.* 109: 11-23.
- Welker, D. and Williams, K. 1980. B. subtilis sensitivity loci in D. discoideum. *FEMS Microbiol. Lett.* 9 : 179-183.
- West, M. et al., 1982. A temperature dependent choice in cell differentiation. *Differentiation* 23: 91-102.
- Williams, Kessin and Newell, 1974. Parasexual genetics in D. discoideum: mitotic analyses of acriflavine resistance and growth in axenic medium. *J. Gen. Microbiol.* 84: 59-69.
- Williams, K., 1978. Characterization of dominant resistance to cobalt chloride in D. discoideum and its use in parasexual genetic analysis.

Genetics 90: 37-48.

- Williams, et al., 1981. Cell patterning in d. discoideum. *Differentiation* 18: 61-63.
- Woffendin and Geffiths, 1982. The differentiation responses of d. discoideum amoebae at various times during synchronous growth. *Journal of General Microbiology*. 128: 2449-2452.
- Wurster et al., 1977. Cyclic GMP in D. discoideum: oscillation and pulses in response to folic acid and cyclic AMP signals. *Fed. Eur. Biochem. Soc. Lett.* 76: 141-144.
- Wurster et al., 1979. Cyclic GMP and cyclicAMP changes in response to folic acid pulses during cell development of D. discoideum. *Cell Differ.* 8: 235-242.
- Wurster, B. and Buman, J. 1981. Cell differentiation in the absence of intracellular cyclic AMP pulses in d. discoideum. *Dev. Biol.* 85: 262-265.
- Yeh, R. et al., 1978. Independent regulation of the extracellular cyclic AMP phosphodiesterase inhibitor system and membrane differentiation by exogenous cyclic AMP in D. discoideum. *Dev. Biol.* 66: 361- 374.
- Yanagisawa et al.,, 1983. Genetic analysis a gene regulating the timing

of developmental events in *D. discoideum*. *J. General Microbiology*. 129:  
1623-1628.