

189
1

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales - Iztacala

Carrera de Biología



**UN METODO PARA INTRODUCIR DNA A UNA
CELULA EUCARIONTE**

T E S I S

**Que para obtener el Título de:
B I O L O G O
p r e s e n t a
ARTURO TOVAR MARTINEZ**

1 9 7 9



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ABREVIATURAS

Masa

1 Dalton = masa de un átomo de Hidrógeno = 1.67×10^{-24} g.

1 μ g = un microgramo = 1×10^{-9} g.

1 mg = un miligramo = 1×10^{-3} g.

Longitud

1 μ = 1000 milimicras ($m\mu$) = 1000 nanómetros (nm)

1 nm = 10 Angstroms (Å)

= 1×10^{-9} m = milimicra = ($m\mu$)

1 Å = 1×10^{-10} m.

S^{35} = Azufre³⁵ (radioactivo)

P^{32} = Fósforo³² (radioactivo)

I^{125} = Yodo¹²⁵ (radioactivo)

Metil H^3 = Timidina tritiada (marcada radioactivamente)

As = Absorbancia

CPM = Cuentas por minuto

Ci = Curie = 3.7×10^{10} dpm

dps = desintegraciones por segundo

μ Ci = 1 microcurie

λ = longitud de onda

INDICE

	Página
I .- INTRODUCCION -----	1
II .- MATERIAL Y METODOS -----	12
III.- RESULTADOS -----	22
IV .- DISCUSION -----	30
V .- CONCLUSIONES -----	34
VI .- RESUMEN -----	36
VII.- BIBLIOGRAFIA -----	38

INTRODUCCION

INTRODUCCION

Las primeras noticias que tenemos acerca del descubrimiento de los ácidos nucleicos, se remontan a 1869, cuando el DNA fué observado por primera vez en los núcleos celulares. Sin embargo en ese entonces se desconocían sus funciones dentro de la célula. No fué sino hasta 1920, cuando se inició la serie de experimentos que condujeron a la identificación del material genético. Los trabajos del investigador inglés Frederick Griffith (21) con neumococos capsulados y no capsulados, condujeron al descubrimiento de la transformación bacteriana.

Sabemos que la cápsula bacteriana confiere propiedades virulentas a los microorganismos que la presentan, si estas células patógenas, se inoculan a algún mamífero susceptible, generalmente provoca a una septicemia que resulta mortal.

Griffith trabajó específicamente con cepas de (Diplococcus pneumoniae), este microorganismo en forma silvestre presenta cápsula y por lo tanto resulta virulento. Griffith inoculó a un grupo de ratones, células no virulentas, a otro grupo con células virulentas muertas por el calor y un tercer grupo con células de ambas clases.

Los 2 primeros grupos no sufrieron efectos nocivos debido a las inoculaciones, pero en el grupo que contenía bacterias capsuladas muertas por el calor y acapsuladas los ratones murieron -- por septicemia.

De los resultados que arrojaron estos experimentos se observó que ambos tipos bacterianos interaccionaron para producir una nueva cepa patógena; además, se dedujo que las células patógenas muertas por el calor inducían patogenicidad en las células no virulentas de manera permanente, luego se dedujo que existía un compuesto termostable que produjo la transformación.

Aunque con estos trabajos se logró algún adelanto, aún quedaba demasiada incertidumbre y muchas dudas por resolver en cuanto a la identidad del "elemento transformador" y sus características.

Corrió el año de 1944 cuando se dieron a conocer los resultados de experimentos iniciados 10 años atrás por un grupo de investigadores entre los que se contaban Oswald T. Avery (2), Colin M. MacLeod (2) y W. Ellyn McCarty (2). Ellos lograron importantes avances en la elucidación de la identidad del material genético, al medir la actividad "transformante" de diferentes fracciones celulares. Lo consiguieron mediante la lisis de gran cantidad de bacterias capsuladas, el fraccionamiento de dichos restos y finalmente el valor de la actividad transformante de cada una de

estas fracciones en células no capsuladas. La fracción correspondiente al DNA fué la única que presentó la propiedad transformante sobre células que originalmente no eran patógenas; las convirtió en virulentas, esto sucedió al incubar células no capsuladas, con restos de bacterias lisadas capsuladas..

A raíz de éstas observaciones, se formularon varias hipótesis, una postulaba la participación del DNA en la transformación, produciendo mutaciones dirigidas, capaces de alterar el contenido genético de células receptoras al grado de alcanzar una semejanza con el contenido genético de la célula donadora. Otra hipótesis supone que la información genética está contenida en el DNA. No obstante, aún quedaban muchas dudas por esclarecer, y por tanto las investigaciones continuaron sin notables descubrimientos en el campo de la genética de Acidos nucleicos, hasta -- que en 1950 Martha C. Chase y A. B. Hershey (15) comprobaron sin lugar a dudas que efectivamente en el DNA radica la información genética. Para lograrlo, diseñaron un experimento en el que emplearon el fago T_2 constituido por aproximadamente 50 % de proteínas y 50 % de DNA.

Tomando en cuenta que el azufre solo se localiza en la cubierta proteica, como constituyente estructural viral, se cultivaron fagos T_2 con sus huéspedes (E. coli) en un medio en que se adicionó S^{35} ; esto con la finalidad de que dicho isótopo se incorporase a la cápside viral en forma específica. Posteriormente

te, se purificaron y aislaron los fagos ya marcados. Se preparó por separado, otro lote de fagos T² marcados con P³², aprovechando la localización específica de P en ácidos nucleicos, y estando totalmente excluida su presencia en alguna proteína viral. El método para el marcaje, fué semejante al del S³⁵, y de éste modo se marcaron específicamente los componentes estructurales del virus, que fué puesto en incubación con las bacterias. Se comprobó la permanencia de la cápside en el exterior; y la penetración del DNA como portador de la información para la síntesis de nuevos fagos, al detectar el S³⁵ en el fantasma vírico adherido a la bacteria, y el P³² en el material nuclear de la descendencia del fago.

Después de éstas observaciones, surgieron más tarde pruebas de que el ácido nucleico vírico, solo infecta en ausencia de la cubierta proteica, y que puede producir una descendencia viral completa, por infección de una célula huésped.

En 1938 Asbury sometió cadenas de DNA a difracción de rayos X y observó que había un espaciamento de 33.4 Å² que se presentaba regularmente a todo lo largo de la cadena. Sin embargo, sus observaciones no fueron muy representativas ya que trabajó con moléculas de DNA impuras. Aunque su contribución fué modesta, sirvió de pauta para que otros investigadores, entre los que destacan Rosalind Franklin, R. G. Gosling y Maurice Wilkins (1952) (33), hicieran una aportación importante para la elucidación de la -

estructura tridimensional del DNA.

Por otro lado, Chargaff (14) empleando procedimientos cromatográficos cuantitativos para la determinación analítica de las bases nitrogenadas, culminó sus experimentos, observando una equivalencia de bases en la molécula de DNA duplohelicoidal, es decir, la misma cantidad molar de la base púrica que se une con su complementaria pirimídica.

En otros laboratorios se había investigado acerca de las dimensiones de las bases púricas y pirimídicas.

En base a todas las observaciones realizadas y conjuntando una serie de datos experimentales, en 1953, J. D. Watson y Crick (32), propusieron un modelo tridimensional, tratando de explicar las propiedades físicas y químicas del DNA. Estos investigadores postularon un modelo tridimensional de la molécula del DNA en forma de una doble hélice, formada ésta por dos cadenas de polinucleótidos entrelazadas, y complementarias entre sí; los ejes de la cadena están constituidos por desoxirribosa-fosfato y los peldaños, equivalen a las bases nitrogenadas unidas por enlaces de hidrógeno; siempre purina con pirimida, C-G y T-A y toda la secuencia de nucleótidos formada por combinaciones de éstos pares de bases nitrogenadas.

Actualmente se sabe que la molécula de DNA no presenta ramificación, está constituida por dos cadenas de polinucleóti-

dos, entrelazadas helicoidalmente, sus miembros constitutivos son desoxirribonucleótidos, que a su vez están compuestos de -- una base nitrogenada (purica o pirimídica), ácido fosfórico, y una desoxirribosa de tipo éster, y la unión de la base nitrogenada se efectúa con el átomo de C_1 del azúcar. A su vez el nucleótido está ligado entre sí por enlaces fosfodiéster, es decir el grupo fosfato de cada nucleótido está unido al C_3 de la desoxirribosa del nucleótido adyacente. Las bases están apiladas a una distancia de 3.4 \AA una de otra, entre la unión A-T -- existen 2 enlaces de H, mientras que entre cada C-G, hay un triple enlace de H.

Las bases por ser poco solubles en agua constituyen los elementos hidrófobos de la molécula, mientras que los grupos -- fosfato y residuos de carbohidratos por poseer cargas quedan expuestos al exterior de la molécula. Existe una periodicidad a lo largo de las moléculas cada 34 \AA corresponden a un giro de 180° del arrollamiento de las cadenas; es decir, a cada 10 nucleótidos de la secuencia corresponde una vuelta de la cadena. La estructura de la molécula de DNA está mantenida por las interacciones hidrófobas entre las bases y por enlaces de H que unen los pares de bases. Después de seguir la trayectoria histórica de las investigaciones mas sobresalientes del DNA, en la actualidad se conocen muchas propiedades de esta molécula y --

una de ellas es la susceptibilidad a ser marcada con isótopos radioactivos, éstas técnicas resultan muy útiles para el rastreo del nucleótido marcado. El I^{125} es un radioisótopo susceptible de ser incorporado a la molécula de DNA por técnicas de iodinación.

Ninguno de los procedimientos para la iodinación "in vitro" de nucleótidos es totalmente satisfactoria, siempre hay algún inconveniente, existen variadas técnicas, una de ellas es la iodinación con ICl , que requiere de la conversión del ácido nucleico en una sal soluble en solventes orgánicos y conduce a la degradación del polinucleótido (Ascoli y Kahan, 1966) (14). La iodinación con N-succinamida aparentemente no produce degradación, (Brammer 1963) (14), pero solo pequeñas cantidades de yodo son unidas, siendo su uso inconveniente, otro tipo de método es por iodinación con I_2 en solución acuosa; la reacción es muy semejante a la que emplea tricloruro de talio ($TlCl_3$), salvo que es más lenta y las purinas no reaccionan. La iodinación del DNA también se puede inducir calentándolo con yodo elemental en presencia de tricloruro aurico, sin embargo la reacción no ocurre cuando el DNA es calentado en presencia de yoduro. Al parecer el método más conveniente y eficaz es el que emplea $TlCl_2$; el DNA puede ser iodinado "in vitro" por calentamiento en solución acuosa de tricloruro de talio iodinado en pH=5. El yodo se une al DNA por medio de un enlace covalente, formando 5-yodocitocina.

No hay reacción con residuos de timidina o adenina, muy poco o nada con guanina, este método sirve para marcar cadenas--

simples de DNA, hay una considerable incorporación del isótopo radioactivo y una insignificante alteración del peso molecular - además de la capacidad de restablecerse y transformarse. Alrededor del 95 % de la citocina de la cadena simple puede ser iodada, la formación de 5-yodocitocina es irreversible, excepto cuando hay una rotura de un pequeño segmento de la cadena.-----

La comprobación de la unión del yodo con el DNA, específicamente con las pirimidinas, es por la absorción de luz ultravioleta si el enlace es estable aumentará la densidad de la molécula y dicha absorción se efectuará a 310 m μ , y si ésta se realiza a 260 m μ , indica que esta asociación es muy inestable.-----

La iodación "in vitro" del RNA es un procedimiento parecido al del DNA de cadena sencilla, excepto porque se forma una pequeña cantidad de 5-yodouracilo y poco uracilo hidratado. ---

El marcaje de DNA con isótopos radioactivos, también puede efectuarse "in vivo", empleando a bacterias como organismo incorporador y a la timidina, (metil-H³) como nucleótido marcado radioactivamente. El procedimiento descrito por Aspelgot (1964)--- el nucleótido marcado se adiciona al medio de cultivo de alguna cepa bacteriana, por ejemplo Escherichia coli, microorganismo--- que lo incorpora fácilmente, y al cabo de varias generaciones - producidas se cosechan las colonias y posteriormente se procede al aislamiento y purificación del material genético ya marcado con la timidina tritiada. El mecanismo para preparar la timidina tritiada es empírico y se requiere únicamente la incubación

de timina y dioxuridina con nucleósido fosforilasa de (*E. coli*-
W_c) (5,6), el producto es aislado y purificado por filtración en
gel y filtro millipore. No obstante los polinucleótidos marcados-
con I¹²⁵ presentan algunas peculiaridades ventajosas; como la fa-
cilidad de detección de las radiaciones gama, el doble marcaje -
de moléculas, la elevada resolución autorradiográfica, además --
por el aumento de densidad es factible la separación de polinu-
cleótidos no marcados, por centrifugación diferencial, debido al
gradiente de densidades.

Actualmente se trabaja en la introducción de información ge-
nética siguiendo diversas metodologías; (Woodworth, 1976)(35) --
conseguió la introducción de fragmentos aislados de DNA nativo--
a cadenas íntegras de DNA empleando DNAligasa de *E. coli*, compro-
bó la unión por un incremento en la velocidad de sedimentación -
de las moléculas. Vosberg (1977)(31) propone una técnica "in vi-
tro" de propagación de fragmentos de DNA en bacterias, emplea un
elemento genético procurante (fago o plásmido) que funciona co-
mo vector éste es incubado con los fragmentos del DNA, en presen-
cia de las enzimas requeridas, para la incorporación, luego las
moléculas recombinantes son introducidas en la células huésped--
por transducción, así ésta funcionan como medio de expresión.---

Bogehagen (1978) (7), logra introducir genes en la doble--
hélice del DNA mitocondrial de una línea celular murina, por su-
parte Cairns (1978)(9) observa la expresión de genes que previa-
mente habían sido introducidos al núcleo de *Acetabularia*, en for-

ma de DNA o RNA por medio de una microinyección en el núcleo.-- (24) Minson y col. (1973) han introducido el gen de la timidina-cinasa (aislado del virus Herpes) a células murinas, empleando un adenovirus.

La idea de introducir información genética a células eucariotes por medio de la síntesis de un complejo DNA-IgG, fue -- idea originalmente del Dr. Carvajal (12) y estudios realizados -- por Rodríguez (1976) (28) calculó el peso molecular de las partículas (7.5×10^7), Romero (1976) (29) hizo el cálculo del número de dichas partículas a una concentración dada de IgG-DNA: 400:1 (4.03×10^{13} partículas/ml),; posteriormente los experimentos realizados por el Dr. Carvajal, Dra. Isabel Baeza et al. "in vivo" en ratones y en humanos han dado pruebas muy firmes a esta metodología para el tratamiento de enfermedades genéticas (5). En este trabajo se plantea un mecanismo para introducir a células eucariotes la información genética procedente de partículas parecidas a virus pero formadas de IgG y DNA-I¹²⁵, ; si se tiene como antecedente que los virus están constituidos estructuralmente por moléculas de ácido nucleico y una cápside de naturaleza proteica, además presentan la propiedad de ser ino--nos, es decir capaces de transitar su material genético a la célula huésped, es posible construir partículas similares a virus forrando moléculas de DNA con una cubierta proteica consistente en IgG dirigida contra las células blanco, este anticuerpo por ser específico para la identificación y fijación del inmu--

nógeno que le dió origen, simultáneamente cumple función estructural al funcionar como ósmoide, permitiendo así la introducción del DNA protegiéndolo de la acción de las DNAsas de las células blanco.

MATERIAL Y METODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

1.- Obtención del DNA de hígado de conejo.

El método empleado para la extracción del DNA fué el de --- Szybalska y Szybalsky (1962). (30).

Primamente se sacrificó al conejo, se realizó la disección para extraerle el hígado, se pesó para saber de cuánto se - partió. De inmediato se colocó en 150 ml. de solución salina-citrato; (NaCl-Na₂citrato) 0.15M-0.02N a pH=7.

Este órgano fué macerado en un mortero de porcelana, hasta obtener una masa viscosa; se vació a un tubo de centrifuga, para posteriormente someterla a agitación con vortex, para homogeneizar.

Al extracto tisular se le agregó lauril sulfato al 2 % en - solución salina-citrato V/V , con la finalidad de lisar las células, a continuación se sometió a severa agitación manual durante 30 min. a 5^o C. Al término de ésta operación se ajustó la concentración de NaCl a IX.

Con el objeto de desproteinizar el extracto celular, se añadió la mezcla cloroformo-butanol frío (4:1, V/V) lentamente y -- con agitación constante durante 3 min.

En seguida se sometió a centrifugación a 2 500 g durante 15 min a 15°C, el sobrenadante obtenido se separó con pipeta, este procedimiento se repitió 6 veces hasta la eliminación de proteínas. Finalmente, los ácidos nucleicos fueron precipitados por la adición de etanol al 95 % a 5°C. A continuación se procedió a la extracción del DNA; una fracción fue sustraída de la solución por una varilla de vidrio giratoria y el remanente se sometió a centrifugación a 1500 r.p.m. durante 15 min, el sobrenadante se decantó, el precipitado se colocó en solución salina 0.15M pH=7.8, se fraccionó y se almacenó en congelación.

2.- Determinación de la concentración de DNA

2a) Método espectrofotométrico según Chargaff-Davidson (1959, 14a)

Para determinar la concentración del DNA del hígado de conejo se hicieron lecturas de la absorbancia del ácido nucleico en un espectrofotómetro ZEISS PMQ III a 260 nm, empleando una alícuota de muestra de 0.05 ml de la solución del DNA, adicionada con un ml de solución salina NaCl 0.15M pH=7.8, y se aplicó la siguiente fórmula:

$$C = \frac{As}{as \cdot b}$$

Donde:

as= Índice de absorbancia específica del DNA
C=Concentración de DNA

As= Absorbancia del DNA a 260

nm.

b= Cte espesor del paso de luz = 1 cm

2b) Método colorimétrico.

El método empleado fué el de Dische (1955) modificado-- por Burton (1956)(8). Esta técnica está fundamentada en la valoración de la desoxirribosa del DNA. Se preparó una curva tipo em pleando diferentes alícuotas de una solución de DNA de timo de-- ternera (100 $\mu\text{g/ml}$) en ácido perclórico 0.5N, ajustándose el -- volumen de todas las alícuotas a 1 ml con el ácido perclórico y el color se desarrolló con 2 ml de reactivo de difenilamina.----

Después de incubar durante 1 hora las muestras fueron leídas a 600 nm en el espectrofotómetro Coleman mod. 35/6. La sensibilidad de ésta técnica es capaz de cuantificar desde 5 a 100 $\mu\text{g/ml}$ de DNA.

Marcado del DNA con I^{125}

3.- Iodinación del DNA con I^{125} "in vitro"

El método seguido para la iodinación del DNA de conejo fué el descrito por Commerford (1971)(14), el I^{125} se obtuvo de New England Nuclear, es un elemento que decae a un isótopo estable del Telurium, viene en forma de NaI en 0.1M de NaOH, con una -- actividad de 100 μCi . Primeramente se hicieron las diluciones -- del compuesto hasta tener una actividad de 10.0 μCi , se preparó una mezcla, compuesta de 10 μg de DNA de hepatocito de conejo, -- 0.4 ml de acetato de amonio 0.1M- ácido acético 0.04M, 2.5×10^{-4} de KI, 2 μCi de I^{125} y al último TlCl_3 a concentración final de

$1.5 \times 10^{-3} M$, todo esto en condiciones de $pH=5$. La mezcla se calentó durante 15 min a $60^{\circ}C$, en baño María, después se enfrió con hielo. Posteriormente por cada 2 ml de volumen se adicionó 0.1 ml de acetato de amonio $1M-NH_4OH$ $0.5M$ $pH=9$; se sometió nuevamente a calentamiento durante 20 min a $60^{\circ}C$.

El producto de la reacción fué posteriormente sometido a cromatografía en Sephadex G-200 fino; la elución se efectuó con acetato de amonio $0.1M$ $pH=9$. Se tomaron alícuotas de 1 ml cada 5 min con el colector de fracciones LKB Bromma Mod. 1000; con el objeto de obtener el perfil de elución del DNA- I^{125} y I libre, se midió la radioactividad correspondiente a cada fracción en un contador de centelleo sólido con cristales de NaI Marca SEARLE modelo 1285. Con el calibrador Marca MIDIAK DOSE se obtuvo la actividad que presentaron ambas fracciones.

4.- Aislamiento y purificación de linfocitos humanos.

Los linfocitos se obtuvieron de una persona tipo A, por punción intravenosa en condiciones estériles. Se vació la sangre en una probeta de 1000 ml, previamente heparinizada; para esperar la precipitación de células blancas, en incubación a $37^{\circ}C$. Al cabo de 3 días se obtuvo el paquete blanco; el cual se separó de las demás fracciones por medio de pipetas Pasteur; a continuación se obtuvo la viabilidad por conteo en la Cámara de Newbauer, por el-

método de exclusión del Azul Tripaco, los linfocitos se lavaron 3 veces con solución de Hanks, centrifugando a 2 500 g durante 10 min, la última resuspensión se hizo en medio de cultivo TC-199, para que se mantuvieran vivos los linfocitos hasta el momento de ser empleados. Una fracción fue empleada para inmunizar a un equino y otra se guardó para su posterior utilización como células blanco.

5.-Obtención del suero anti-linfocito humano.

Con los linfocitos obtenidos como ya se indicó se procedió a inmunizar a un equino (barro adulto), esto fue de manera paulatina, por punción intravenosa introduciendo a su torrente sanguíneo cantidades de 1×10^6 células. Estas inmunizaciones se realizaron semanalmente, durante 6 semanas consecutivas. Una vez que se consideró haber conseguido la producción de IgG anti-linfocito humano, a la semana de la última inmunización, se procedió a la obtención del suero del animal; el procedimiento seguido fue el siguiente: primeramente se anestesió al Equino por la administración intravenosa de Ketamina, los 3 lt. de sangre del animal se extrajeron directamente de la vena aorta, recibiendo el flujo en un matraz previamente esterilizado, esta sangre se centrifugó a 2 000 r.p.m. durante 10 min, con la finalidad de separar el suero de las células sanguíneas, aquel fue sujeto posteriormente a un proceso de purificación (Peterson y Sorber 1955)(26), hasta

método de exclusión del azul tripano, los linfocitos se lavaron 3 veces con solución de Hanks, centrifugando a 2 500 g durante 10 min, la última resuspensión se hizo en medio de cultivo TC-199, para que se mantuvieran vivos los linfocitos hasta el momento de ser empleados. Una fracción fué empleada para inmunizar a un equino y otra se guardó para su posterior utilización como células blanco.

5.-Obtención del suero anti-linfocito humano.

Con los linfocitos obtenidos como ya se indicó se procedió a inmunizar a un equino (burro adulto), esto fué de manera paulatina, por punción intravenosa introduciendo a su torrente sanguíneo cantidades de 1×10^6 células. Estas inmunizaciones se realizaron semanalmente, durante 6 semanas consecutivas. Una vez que se consideró haber conseguido la producción de IgG anti-linfocito humano, a la semana de la última inmunización, se procedió a la obtención del suero del animal; el procedimiento seguido fué el siguiente: primeramente se anestesió al Equino por la administración intravenosa de Ketamina, los 3 lt. de sangre del animal se extrajeron directamente de la vena aorta, recibiendo el flujo en un matraz previamente esterilizado, esta sangre se centrifugó a 2 000 r.p.m. durante 10 min, con la finalidad de separar el suero de las células sanguíneas, aquel fué sujeto posteriormente a un proceso de purificación (Peterson y Sorber 1955)(26), hasta

obtener la fracción correspondiente a la IgG.

6.- Obtención de IgG sérica anti-linfocito humano

El suero purificado se ajustó el pH a 7.8 con NaOH 6N y se realizó la separación de euglobulinas por precipitación con una solución saturada de sulfato de amonio. El procedimiento para la precipitación fue el siguiente: A un volumen dado de suero contenido en un tubo de centrifuga, se adicionó el $(NH_4)_2SO_4$; durante 10 min se mantuvo en agitación, posteriormente se centrifugó la mezcla a 6 000 r.p.m. durante 15 min bajo refrigeración ($5^{\circ}C$).--

Se decantó el sobrenadante para eliminar el sulfato de amonio sobrante, el precipitado se resuspendió con solución salina (NaCl 0.15M pH=7.8); este procedimiento precipita a las proteínas que no son IgG, este procedimiento se repitió 6 veces hasta que se observó la turbidez necesaria que indica la precipitación de las sales de amonio. El sedimento de la última centrifugación se resuspende en un buffer solución salina-amortiguador de boratos 0.15M, pH=7.8, hasta alcanzar la mitad del volumen original del suero. La suspensión se dializó contra el mismo buffer durante 18 horas a $5^{\circ}C$, con objeto de eliminar residuos de sulfatos. Para eliminar las gamaglobulinas desnaturalizadas, las euglobulinas se centrifugaron a 5 000 r.p.m. durante 15 min a $5^{\circ}C$, después se fraccionaron en alícuotas de 5 ml y se guardaron en congelación.--

5a.- Titulación del suero por hemaglutinación directa o activa.

Se formaron dos grupos de sueros, uno obtenido de equino no inmunizado con linfocitos humanos, que constituye el control ó - testigo, y por otro lado el experimental constituido por suero - de equino previamente inmunizado con linfocitos humanos. Para -- efectuar la titulación de ambos sueros; se prepararon diluciones con factor de 2, y se adicionó el antígeno (linfocitos humanos)- al suero, induciendo la hemaglutinación activa, se incubó durante 1 hora a 37°C, posteriormente se hicieron las lecturas.

7.- Determinación de la concentración de euglobulinas.

Esta cuantificación se hizo siguiendo el método de Lowry modificado (Folin-Ciocalteu) (1951)(23), específico para cuantificar concentración de proteínas. Se preparó una curva de calibración - de 0 a 1 mg de albumina humana, las lecturas se efectuaron en un - espectrofotómetro ZEISS PQ III a 750 nm (espectro infrarrojo), una vez trazada la curva tipo se interpoló la concentración del pro- blema. Después de la determinación de proteínas las euglobulinas - se dializaron contra P.B.S. (buffer de fosfatos de sodio 0.01M -- con 0.015% de NaCl p^H 7.5). durante 20 h. a 2°C, para eliminar - boratos.

6a.- Purificación de IgG

Se empleó el método de Peterson y Sorber (1955)(26), utilizando el intercambiador iónico DEAE-celulosa que absorbe las proteínas que no son 7S gamaglobulinas a pH=7.5.

El gel de celulosa, se encontraba hidratado en una solución de Tris-EDTA 0.001M pH=7.5, adicionada con azida de sodio al 0.02 % como conservador. El método de preparación fue el siguiente

Se eliminó la azida de sodio por lavados exhaustivos con NaOH 0.5N, el paso a seguir fue la eliminación del NaOH del gel lavándose con agua destilada v/v con el DEAE-celulosa mezclados con agitación constante con vortex, seguida de una centrifugación a 1500 r.p.m. durante 5 min; decantando el sobrenadante, esta operación se efectuó hasta ajustar el pH a 7.4. A continuación el gel se hidrató con P.B.S. preparado solubilizando fosfatos de sodio 0.01M con 0.015M de NaCl pH= 7.5 y preenfriado a 5°C, este buffer se adicionó con agitación constante, luego se centrifugó a 1500 r.p.m. durante 5 min, se decantó el sobrenadante. Una vez preparado el gel se le añadió gota a gota a las euglobulinas con agitación constante, (1 g de DEAE-celulosa por 30mg de gamaglobulina impura). Se dejó enfriando a -2°C durante 5 horas, al término de las cuales se sometió a centrifugación a 3 000 r.p.m. durante 15 min para precipitar las globulinas y demás proteínas que no son 7S quedando en el sobrenadante las gamaglobulinas IgG.

3.- Preparación de las partículas similares a los virus.

El complejo IgG-DNA-I¹²⁵, se preparó mezclando la IgG con -- el DNA marcado con yodo¹²⁵ radioactivo, en una proporción de 400:1

Se prepararon 2 tipos de partículas, los controles o testigos integrados de DNA e IgG de equino no inmunizado con linfocitos humanos y los experimentales fabricados con IgG de equino previamente inmunizado con los linfocitos humanos y DNA-I¹²⁵.

Tanto la IgG como el DNA se encontraban disueltas en solución salina 0.15M pH=7.8, en la proporción ya mencionada; se dializaron contra una solución de citratos de sodio 0.02M pH=7, y se ajustó la concentración del NaCl a 0.15M, a continuación se dializó el -- complejo contra solución salina NaCl 0.15M pH=7, hasta eliminar -- los citratos. Se purificaron por cromatografía en Biogel A-50 para eliminar el exceso de IgG en la mezcla. Se obtuvieron las fracciones que contenían las partículas y se metieron a los viales de centelleo sólido para obtener las cuentas correspondientes a su radioactividad, el perfil de elución se observa en la fig.(6)

Se hizo una dilución de 1:40 para obtener el espectro de absorción de las partículas, éstas se concentraron por pervaporación luego se esterilizaron por ultrafiltración a través de filtros --- Millipore con diámetro de poro de 0.45 micras, posteriormente se -- guardaron bajo congelación. El espectro de absorción se obtuvo --- para caracterizar las partículas y luego compararlo con los respectivos espectros del DNA y de la IgG.

9.- Incubación de las partículas similares a virus con las células blanco "in vitro".

El complejo IgG-DNA-I¹²⁵ se adicionó a un cultivo de linfocitos viables, y se incubó durante 1 hora; el cultivo de cada uno de los dos grupos (control y experimental) se realizó en 3 tubos de ensaye.

La incubación consistió en colocar en cada tubo 2.5×10^6 -- células blanco y 1 ml de las partículas (4.08×10^{13} partículas/ml) () a 37° durante 1 hora. A ambos grupos se sometieron a las --- mismas condiciones. A continuación se sometieron a contar los tubos-- para obtener la radioactividad total inicialmente, luego se lava-- ron las células blanco con solución de Hanks con la finalidad de-- eliminar los residuos del complejo de IgG-DNA-I¹²⁵, acto seguido-- se volvieron a contar las células, así se obtuvo la radioactividad captada durante la incubación. En seguida las células fueron lisa-- das por la adición de Lauril-sulfato 2 %, se desproteinizó el --- extracto celular por la adición de la mezcla cloroformo-butanol--- (4:1); los restos celulares se centrifugaron a 2 500 r.p.m. durante 15 min, finalmente se contó la radioactividad del sobrenadante, que equivale a la producida por el DNA-I¹²⁵ introducido a las células-- blanco.

RESULTADOS

RESULTADOS

Obtención del DNA de hígado de conejo.

El hígado extraído del conejo pesó 450 g., a este órgano se le extrajo el DNA según método Szybalska y Szybalski (1962)(30), y se le determinó el espectro de absorbancia a la luz ultravioleta según Chargaff y Davinson (1955)(14a). La figura No.(1) muestra la relación de A_{260}/A_{280} , que es mayor de 2, lo que es índice de una satisfactoria desproteínización del DNA.

La relación obtenida es la siguiente:

$$R = \frac{1.235}{0.547} = 2.259$$

La determinación de la concentración del DNA primeramente se hizo por el método colorimétrico de Burton(1956)(8). Se utilizaron 2 alícuotas de la solución de DNA por duplicado, una de 0.02 ml y otra de 0.05 ml se interpolaron los datos en la curva-tipo de la fig.No.(2), de la cual se obtuvieron los siguientes datos:

Tabla No. (1)

Muestra No.	As a 600 nm	Promedio As	ml sol de DNA	µg de DNA
1	0.110	0.2497	0.02	31.5
1"	0.120			
2	0.249	0.1140	0.05	68.5
2"	0.250			

Curva tipo

Espectro de absorción del DNA a la luz uv.

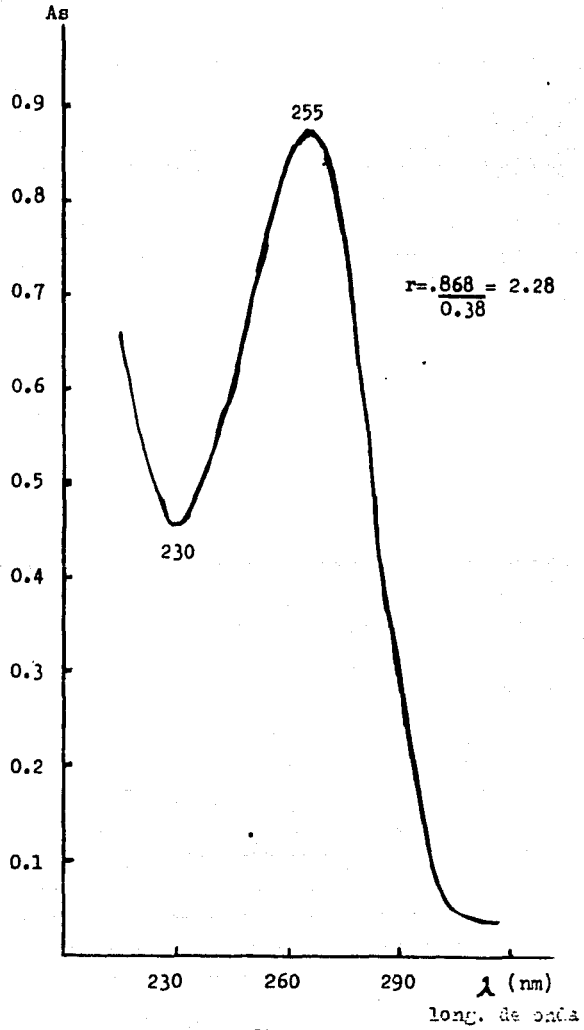


fig. No. 1

Curva tipo para la determinación de DNA
por el método Burton.

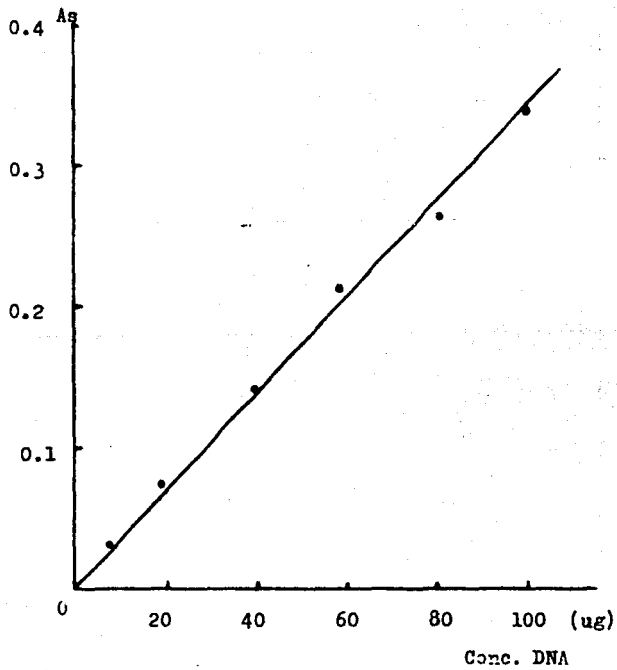


fig. No. 2

La cantidad total de DNA fue de 14.8 mg en los 11.5 ml de solución.

Iodinación del DNA.

El método seguido fue el descrito por Commerford (1971)(14) Para la iodinación inicialmente se contaba con una solución de I^{125} cuya vida media es de 57.4 días, que presentaba una actividad de 10 μ Ci, que después del proceso de iodinación del ácido nucleico decayó la actividad hasta 2.7 μ Ci, el resto de la radioactividad no se incorporó a la molécula de DNA. Los datos fueron proporcionados por el calibrador Nidico y son presentados en la tabla siguiente:

Tabla No. (2)

Actividad del I^{125}	Actividad del DNA- I^{125}	Porcentaje del I^{125} captado por el DNA = 27 %
10 μ Ci	2.7 μ Ci	

El complejo DNA- I^{125} fue purificado por cromatografía en Sephadex G-200 para separar el I^{125} del ácido nucleico ya marcado, del yodo inorgánico libre. Las fracciones colectadas se contaron y con los datos obtenidos se trazo el perfil de elución del DNA- I^{125} fig. No. (3), además del espectro de absorción a 260 nm

En las fracciones sucesivas se obtuvo el perfil de elución del I^{125} , por medio de tales alícuotas. fig. No. (4).

Gráfica de la elución de DNA-I¹²⁵
en Sephadex G- 200.

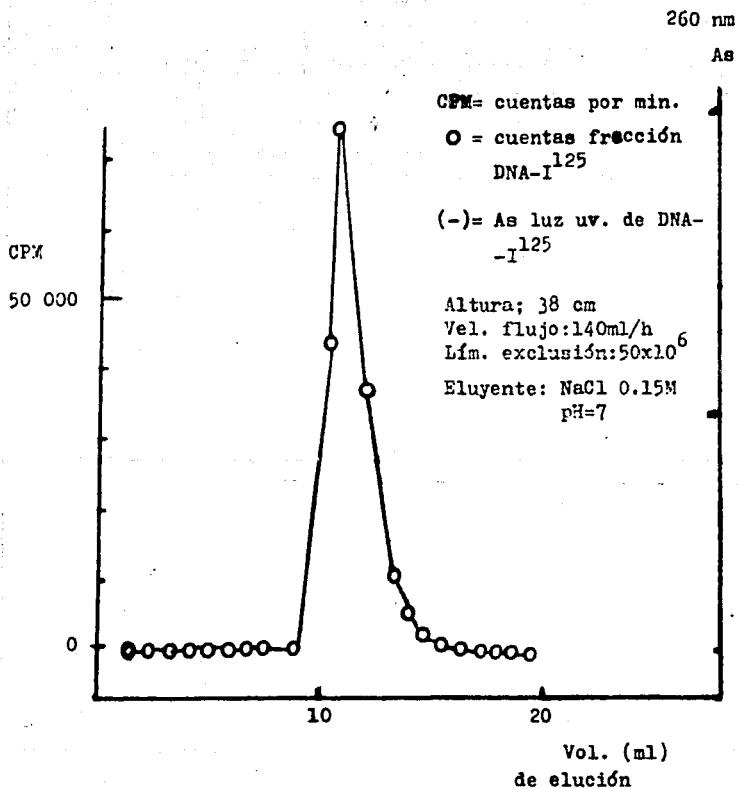


fig. No. 3

Gráfica de la Elución de I^{125}

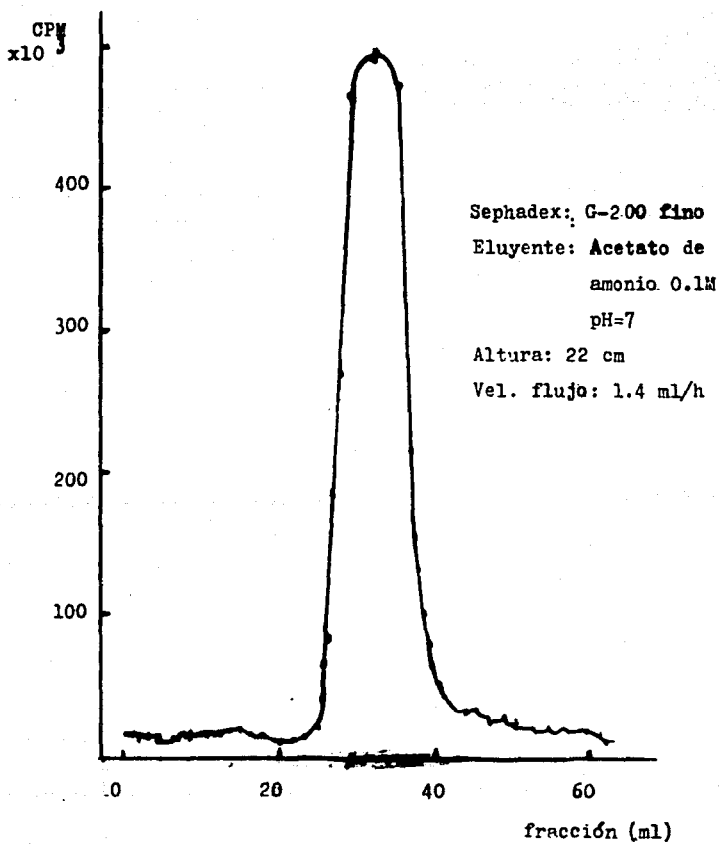


fig. No. 4

Actividad específica.

Definimos como actividad específica a la razón de la actividad que presenta determinada cantidad de materia. Entonces 10 μg de DNA-I¹²⁵ que presentaron 1.7 μCi de actividad, significa una actividad específica de :

$$\frac{2.7 \mu\text{Ci}}{10\mu\text{g DNA-I}^{125}}$$

Titulación de sueros.

Después de 6 semanas de inmunización cada 7 días, se obtuvo a partir de 1.870 litros de suero la fracción correspondiente a las euglobulinas. Se evaluó la presencia de gamaglobulinas por la titulación de sueros por hemaglutinación directa. El caso de nuestro control, se tituló el suero de equino no inmunizado con linfocitos humanos, no se produjo hemaglutinación considerable; por otra parte la titulación del grupo de diluciones del suero experimental, produjo la hemaglutinación, provocada por la presencia de linfocitos en el suero del equino previamente inmunizado con tales inmunógenos, se obtuvo el título más alto en la dilución correspondiente a la de 1:1280. Evidentemente se obtuvo un título bastante alto, indica de una elevada concentración de gamaglobulinas anti-células blanco.

Determinación de concentración de proteínas.

La cuantificación se hizo por el método de Lowry modificado (Folin-Giocalteau 1951) (), se obtuvo una concentración total de proteínas de 31.5 mg en los 21 ml de suero tratado con sulfato de amonio.

Aislamiento y purificación de la IgG.

La depuración de IgG se hizo siguiendo el método de Peterson y Sorber(1955)(26). Se hizo una segunda cuantificación de la concentración de proteínas por el método Lowry, y se obtuvieron 11.5 mg/ 11.5 ml.

Preparación del complejo IgG-DNA-I¹²⁵ (partículas similares a los virus).

El complejo se preparó mezclando el DNA-I¹²⁵ y la IgG en una proporción 1:400, y como se obtuvieron 14.8 mg de DNA totales. se mezclaron con 5.9 g de IgG, estando en solución de NaCl 0.15M. -- pH=7. después de haber sido dializada durante 12 horas contra -- solución de Na₂-citrato 0.02M a pH=7.8 y redisolta al volver a -- ajustar la concentración a 0.15M con NaCl. Posteriormente las -- partículas se pasaron por una columna con Biogel A-50 con objeto de separar el exceso de IgG. la Fig. No.(6) muestra el patrón de -- elución de esta columna.

Curva tipo para la determinación de proteína
por el método de Lowry.

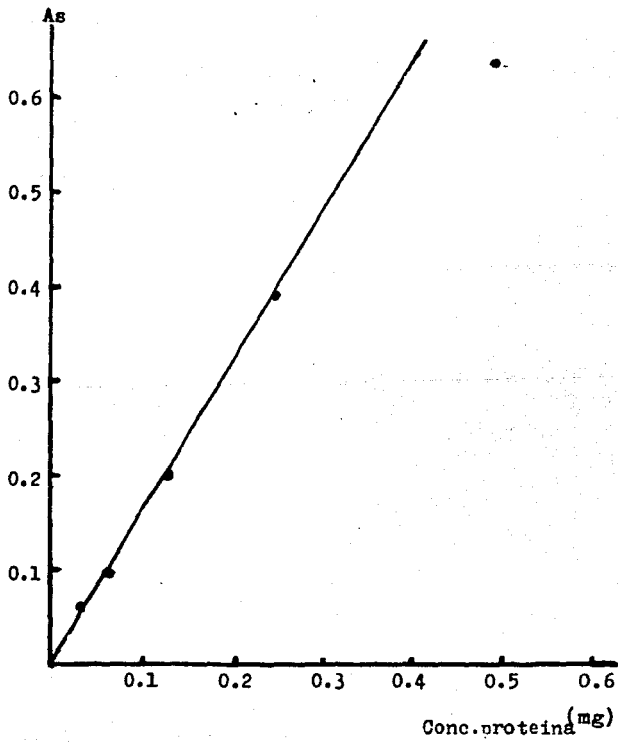


fig. No. 5

Patrón de elución DNA-I¹²⁵-IgG

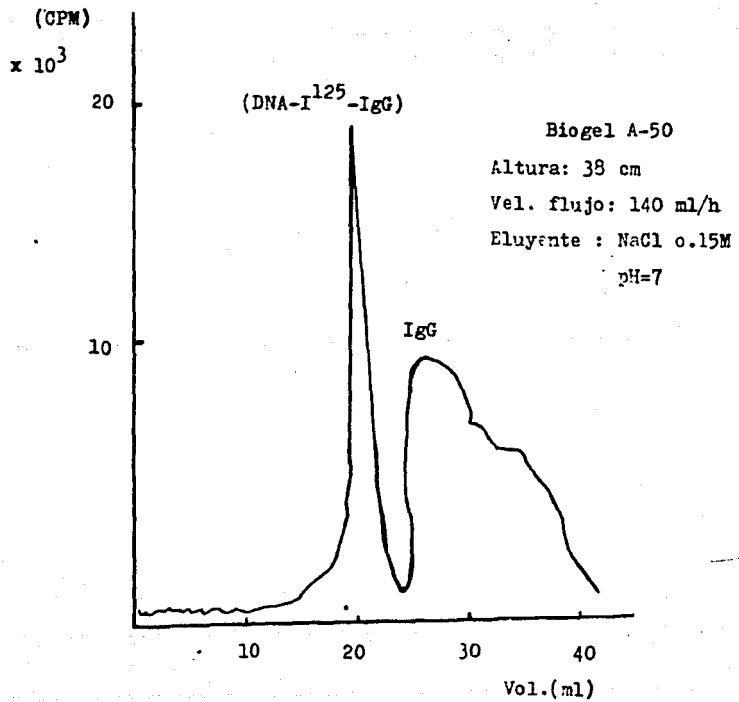


fig. No. 6

Espectro de absorción en la luz ultravioleta de las
Partículas similares a virus.

Se obtuvo el espectro de absorción en el espectrofotómetro Cary 15 de una dilución 1:40 de las partículas como se ve en la Fig. No. (7), en la que se observa un leve corrimiento hacia longitudes de onda mayores debido a la interacción de la proteína - IgG-DNA-I¹²⁵, comparando con el espectro de absorción de la IgG fig. No. (8) se aprecia claramente una disimilitud con el espectro del complejo, debido a la mayor densidad del complejo.

Incubación del complejo DNA-I¹²⁵- IgG (antilinfocito humano) y las células blanco.

Las partículas similares a virus previamente marcadas en su DNA con yodo radioactivo se pusieron a incubar con sus células blanco, se obtuvieron las cuentas correspondientes a la radioactividad total inicial y considerada así como el 100 % de la radioactividad; se define así:

R_t = Radioactividad total inicialmente emitida por el DNA-I¹²⁵ de las partículas.

R_t = 100 % radiación total inicial.

Espectro de absorción del complejo

DNA-I¹²⁵ - IgG (dil. 1:40)

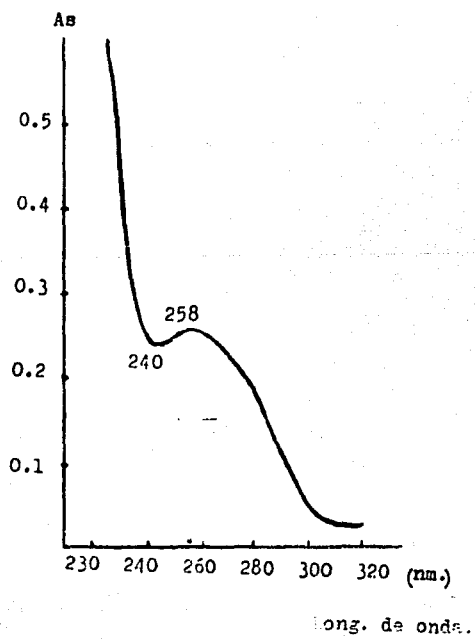


fig. No. 7

Espectro de absorción IgG.

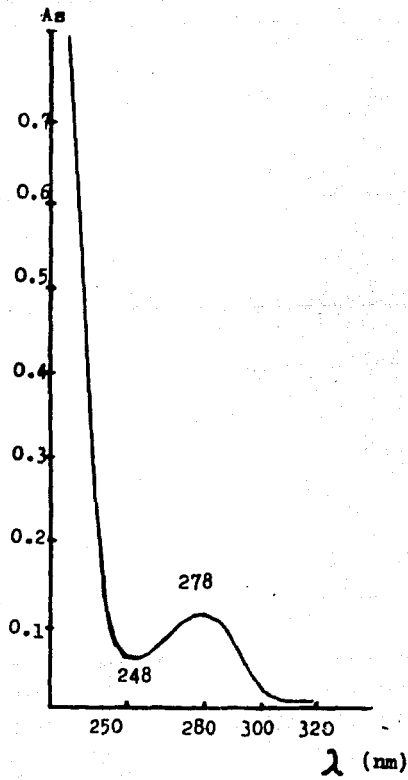


fig. No. 8

Con la finalidad de eliminar la radioactividad residual de las partículas y únicamente detectar la radioactividad emitida por el DNA-I¹²⁵ captado por las células, se lavaron los linfocitos, éstos valores se consideraron así:

$R_f = \%$ de la radioactividad total que fijaron las células

El modo de calcularlo es el siguiente:

$$R_f = \frac{\text{Cuentas de la } R_t}{\text{cuentas de la } R_f} \times 100 \%$$

Después de la lisis celular el valor de la radioactividad -- del sobrenadante resultante se consideró como índice del DNA-I¹²⁵ captado en el interior de las células, entonces para obtener R_{ti} se procedió así:

R_{ti} = Radioactividad captada en el interior

$$R_{ti} = \frac{R_t}{\text{Rad. int.}} \times 100 \%$$

Donde :

Rad. int. = cuentas de la radioactividad captada en el interior de las células.

El porcentaje de la radioactividad fijada que fué introducida a las células blanco, se denominó (Rfi), y equivale a la demostración de realizada la finalidad del experimento, al detectar radioactividad de la fijada en el interior y el % se calculó así :

Rfi = Radioactividad fijada en el interior de las células

Rfi = Radioactividad fijada ----- 100 %

Radioactividad interior ----- X %

X = Porcentaje de radioactividad captada en el interior

Los resultados se presentan en una tabla a continuación donde:

Lote experimental: Incubación de células blanco con las partículas similares a virus (DNA-I¹²⁵ e IgG de equino --- inmunizado con las células blanco.)

Lote control: Incubación de células blanco con las partículas parecidas a virus (DNA-I¹²⁵ e IgG de equino no inmunizado con células blanco.)

Tabla de resultados (3)

C P M de I DNA-I ¹²⁵			Porcentaje de Radioactividad			
Incubación de (PLV) con células blanco	Células blancas lavadas	Sobreviviente de células lisadas	Tt Rad. total	Rf Rad fijada	Rfi Rad introducida	
(A)	17883	5435	2226	100 %	30.33 %	40.95 %
	9323	2937	1372	100 %	32.14 %	45.97 %
	4391	1694	807	100 %	33.94 %	47.63 %
(B)	17883	1395	-----	100 %	7.8 %	-----
	9323	579	-----	100 %	6.2 %	-----
	4391	158	-----	100 %	2.6 %	-----

(A).- Lote experimental

(B).- Lote control

(PLV).- Partículas similares a virus

C P M.- Cuenta por minuto

DISCUSSION

DISCUSION

El método Burton (1956) para la determinación de la concentración de DNA resultó eficaz para la cuantificación, ya que tiene -- una sensibilidad de 1 a 100 μg , y la concentración obtenida cayó -- dentro de éste rango. El I^{125} como marcador radioactivo se eligió tomando en cuenta algunas cualidades; como la vida media 57.4 días la accesibilidad que presenta para su manejo, el hecho de que forma complejos estables con el DNA. La formación de 5-yodocitocina - no altera considerablemente las propiedades físicas, ni químicas del ácido nucleico y esto se demostró porque el espectro de absorción del DNA- I^{125} es poco diferente del DNA nativo.

Por otra parte, se hizo la consideración de la eficacia de la iodinación con el I^{125} que fué de un 27 %, realmente no es un porcentaje muy elevado; sin embargo es suficiente para lograr los fines perseguidos, que eran marcar el DNA, con un compuesto estable- no perturbador de la estructura del DNA.

Las determinaciones de concentración de proteínas indicaron - una pérdida paulatina de éstas sustancias debido principalmente a la desnaturalización por la manipulación, este proceso redujo en un 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ la concentración original, de hecho no considerable, sin embargo finalmente se contó con la cantidad necesaria para la preparación de las partículas similares a virus.

El complejo formado se pasó a través de una columna de filtración en el gel, para eliminar la interacción proteína-proteína, -- primeramente eluyó la fracción correspondiente al complejo DNA-I¹²⁵-IgG debido a su mayor peso molecular, seguidamente eluyó la fracción correspondiente a la IgG y agregados. El espectro de absorción de las partículas purificadas resultó ser parecido al de la-IgG, sólo que en el primer caso exhibe un leve corrimiento hacia longitudes de onda mayores, lo que indica un mayor peso molecular de la IgG, aumentado por la presencia del DNA-I¹²⁵.

Al analizar las cifras de radioactividad fijada por el grupo experimental, relacionándolas con la radioactividad captada en la incubación por el grupo control, se aprecia una proporción realmente significativa es de 6:1, se registró un promedio de 32 % captación en el experimental contra un 5 % del control (ver tabla No. 3) este último porcentaje es atribuible a la fijación inespecífica del anticuerpo a las células blanco, después de esto el control no produjo algún evento significativo, únicamente como referencia.

La radioactividad correspondiente al sobrenadante de las células lisadas se aprecia un porcentaje promedio de captación de 44.7 %, equivalente a la radioactividad captada en el interior.

El mecanismo de entrada del DNA-I¹²⁵ a las células blanco es bastante discutible. Se puede pensar de inmediato que debido a la gran cantidad de partículas 4.09×10^{13} partículas/ml (29) incubadas con los 2.0×10^6 células, es una cantidad muy desproporciona-

da de partículas fijadas a las células blanco; esto unido con el elevado peso molecular de dichas partículas (7.5×10^7) Rodríguez (1976) (28), resulta difícil imaginar que las células puedan resistir semejante presión sobre su superficie e torcer permaneciendo -- inmutable, no quedando otra alternativa que la introducción, debido a la acción mecánica venciendo la resistencia opuesta por la membrana celular.

Por otro lado si se consideran las propiedades fagocíticas propias de los linfocitos, suzieren otro modo de introducir el DNA-I¹²⁵

La penetración de la IgG de las partículas se pone en duda -- ya que es poco probable debido a su gran tamaño y a su elevado peso molecular (150 000), son moléculas muy grandes para poder penetrar pasivamente a las células; si los linfocitos fagocitaran dicha partícula y así permitiese la entrada a las IgG éstas tendrían la oportunidad de proteger al DNA-I¹²⁵ de la acción de las nucleasas intracelulares, esta acción protectora de la IgG sólo sería posible mientras ésta no es degradada por las proteasas, así que su vida -- medio en el interior celular es muy breve.

El mecanismo de penetración también podría ser el propuesto por Raff et al (1972) (27); por el cual los anticuerpos llegan a sus respectivos receptores en sus células blanco, entonces hay un movimiento de éstos en la membrana, y se acumulan en un polo de la célula y luego son pinocitosis llevando consigo el DNA.

Para conocer el mecanismo de penetración hubiese sido conve -

niente el marcaje de la IgG con (FITC) isotiocianato de fluoresceína y observar al microscopio de fluorescencia la preparación de la incubación de las partículas y las células blanco y observar la formación del "capping" en la superficie de la célula blanco. Por otro lado las técnicas de radioautografía hubieran resultado bastante -- útiles para conocer en que fracción de los extractos celulares se encuentra el DNA- I^{125} ; así por el rastreo de éste compuesto radioactivamente marcado hubiese aclarado la localización exacta del -- ácido nucleico marcado.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

El marcado del DNA con I^{125} por el método Commerford (1971) resultó adecuado ya que al iodinar las moléculas del ácido nucleico con el radioisótopo, se formó un compuesto radioactivo estable, que no alteró en forma considerable la estructura del DNA. El porcentaje de radioactividad captado por el DNA aunque no fué alto, resultó suficiente para realizar la función de trazador radioactivo y así proporcionarnos la información acerca de la localización y la cantidad de DNA- I^{125} presente en las ocasiones en que fué requerido.

La IgG aislada y purificada jugó un papel determinante para la consecución de los objetivos; al formar complejos estables con el DNA y conservar las características que le permitieron identificar su determinante anti- ϵ nico, fijarlo, y así facilitar la entrada del DNA unido a su estructura.

Considerando los resultados obtenidos mediante técnicas bastante reproducibles, se considera haber desarrollado un método para introducir información genética a células eucariotes.

Uno de los aspectos a desarrollar mediante este método sería el incorporar la información genética al genoma de la célula blanco, con la consiguiente expresión del mismo, demostrar dicho even

to, mediante la modificación de la morfología, la estructura y las funciones celulares específicas, con la identificación de dichos cambios, así como la de nuevos productos celulares, metabolitos, enzimas, hormonas, péptidos, secreciones, etc., dependiendo de que tipo de información se introduzca.

Las aplicaciones contempladas para la aplicación de éste método van desde la práctica de técnicas bioquímicas, el ensayo de ciencia pura, hasta el aspecto económico jugaría un papel importante, ya que se piensa sería posible la producción de sustancias celulares de importancia económica en cantidades comercialmente importantes como : hormonas, enzimas, etc. cuyo aislamiento y purificación son procesos muy costosos por su secreción en cantidades mínimas y con una vida media muy corta.

Por la incorporación del DNA al genoma también sería factible el obtener líneas celulares nuevas, el transformar a susceptible -- una cepa bacteriana, vírica resistente a los fármacos actuales.---

Se sugiere también como tratamiento terapéutico para corregir defectos genéticos de linfocitos oncogénicos que producen alteraciones tales como leucemias, linfomas y mielomas. Así como para el tratamiento de la diabetes Mellitus juvenil, corrigiendo las deficiencias en el genoma por la introducción de información genética normal.

R E S U M E N

RESUMEN

Este trabajo plantea la posibilidad de introducir información genética al interior de una célula eucariote, el mecanismo que se emplea para la realización de tal objetivo es por medio de la participación de Partículas similares a virus, estos complejos, se constituyen fundamentalmente como los virus auténticos: un ácido nucleico y una cubierta proteica.

El DNA que constituyó el material genético destinado a la fabricación de los virus, se obtuvo por el método de Szybalska y Szybalski (1962), a partir de hígado de conejo. Una vez aislado se marcó con I^{125} por la técnica de iodinación "in vitro" de DNA propuesto por Comneford (1971). Se obtuvo un 27 % de eficacia en la iodinación del DNA. La rotulación del DNA se hizo con la finalidad de formar un compuesto estable (5-yodocotocina) que sirviera para rastrear la localización y cuantificar la cantidad de DNA- I^{125} en determinado momento. Una vez que se contó con el DNA- I^{125} en las condiciones deseadas de pureza y actividad emisora de partículas gamma, se procedió a la obtención del componente proteico para la fabricación de las partículas similares a virus. Se sabe que los anticuerpos (gamaglobulinas), presentan características favorables para la realización del experimento, entre ellas están: son proteínas, con la capacidad de identificar y fijarse al antígeno que le dio origen. Para la comprobación de la introducción de DNA a la célula

blanco, se trabajó con 2 grupos; el testigo que fueron partículas - constituidas con DNA-I¹²⁵ con IgG de equino no inmunizado, mientras que el grupo experimental con las partículas compuestas por DNA-I¹²⁵ y con IgG de equino inmunizado con las células blanco (linfocitos-humanos), para obtener la IgG se inoculó al animal semanalmente - durante 6 semanas hasta obtener un título alto por Hemaglutinación directa, posteriormente se aisló, purificó y cuantificó la IgG obtenida, misma que constituyó el componente proteico del complejo.

Para la formación de tal complejo se mezcló en solución el DNA-I¹²⁵ con la IgG en proporción 1:400. Las partículas así formadas - se concentraron, purificaron y caracterizaron por su espectro de absorción y por la radioactividad que presentaron. Las partículas, tanto las control como las testigos, se adicionaron a un cultivo de células blanco, se dejaron incubando durante 1 hora en el medio de cultivo, dando tiempo a que se efectuaran los procesos de identificación y fijación a los determinantes antigénicos por las partículas de las células blanco. Al cabo de cumplirse el tiempo de incubación, los linfocitos se lavaron eliminando partículas y se contó la radioactividad que habían fijado, al lisar las células y separar el sobrenadante se cuantificó radioactividad en esta fracción - que correspondía al interior celular; así se comprobó que efectivamente se efectuó la intromisión de DNA a las células blanco.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

1. Andrews, P., 1970. Estimation of molecular size and molecular weights of biological compounds by gel filtration.- In methods of biochemical analysis. Ed. por D. Glick, Interscience publisher, New York, London, Toronto, -Sydney., 153.
2. Avery, Oswald T.; Colin M. MacLeod, y MacLyn McCarty, 1944. "Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types ", J. Exp. Med. 79,137-158
3. Baeza, R. I., E. J. Cervajal. y G. Cervajal. 1970. Introducción de material genético en células específicas empleando partículas viriformes., Resúmenes XIII Cong. Nal. de Cienc. Fisiolog., Brasilia, Mich., pag. 21.
4. Baeza, R. I., E. J. Cervajal. y G. Cervajal. 1974. Virus-like particles of DM-127 designed to used in genetic engineering., Rev. Lat. Am. Microbiol., 16, 147-151.

5. Brena, P. I. 1975. Estudios sobre terapia génica. Vol 1. Diabetes mellitus en ratones genéticamente diabéticos.-Tesis Doctor I. E. "U. de Chile", "
6. Bellenti, Joseph A. 1971. Immunology. 3a. Ed. Edit. W. B. Saunders Company. London, England, pp. 158.
7. Bogenhagen, D., Clayton, D. A., 1978., Introduction of super-helical turns into newly replicated molecules. Mechanism of mitochondrial DNA replication in mouse L-cells. J. Mol. Biol. (England), 119, 1, pp. 69-81.
8. Burton, G. 1956. The condition and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of the deoxyribonucleic acid., Biochem. J., 62, 315-324.
9. Cairns, R., Schweizer, H. G., 1978. Expression of foreign genes in Acetabularia cell- Introduction of RNA and DNA - via microinjected nucleus. Journal of Cell. Biology, 72, (2), 362.

10. Campbel, D. H., F. S. Garvey., N. E. Gremer., D. H. Sussdorf, 1973. Immunology. 2a. Ed. W. A. Benjamin, New York, fluids., Am. J. Clin. Patol. 32 (1), 97-99.
11. Carvajal, G., I. R. Baeza, y E. J. Carvajal. 1967. Intentos de modificaciones fenotípicas en un animal íntegro. , Resúmenes VIII Cong. Lat. y X Cong. Nal. Cienc. -- Físio., Méx., pag. 70.
12. Carvajal, G. 1968. Introducción de material genético en un animal íntegro., Resúmenes VIII Cong. Nal. Microbiol., Guadalajara, Jal. pag. 137.
13. Carvajal, G. I. R. Baeza. y E. J. Carvajal. 1973. Preparation of virus-like particles of DNA., *Experientia* 29 , - 1299-1301.
14. Commerford, S. L., 1971. Iodination of Nucleic Acids. "in --- Vitro" *Biochemistry*, 10, (11) 1993-1999.
- 14a. Chargaff, J. N. Davinson et al, 1955., *Techniques of Enzymology*, Academy Press., New York., U.S.A. 1 , 493.

15. Fraenkel-Conrat, H. y B. Singer. 1969. Reconstitution of ----
tobac Mosaic Virus. III. Improved Methods and use -
of mixed nucleic acids. Biochem. Biophys. Actas. 33
, 359-370.
16. Gelotte, B. 1964. Fractionation of proteins, peptides and ---
aminoacids by gel filtration. en New Biochemical ---
Separations., Ed. por A. T. James y L. J. Morris., -
D. Van Nostrand Co. L. T. D., London, Toronto, New -
York. 93-109.
17. Harold, F. 1971. The Physics of Radiology, Third Edition, ---
Second Printing, Charles C. Tombs., Publisher, Illi--
nois, USA, 533-551.
18. Hershey, A. D. , y Martha C. Chase., 1952. " Independent ---
Functions of Viral Protein and Nucleic Acid in -----
Growth of Bacteriophage ", J. Gen. Physiol., 36, ---
39-56
19. Felsenfeld, G., and Miles, H. T., 1967. Physical and Chemical
Properties of Nucleic Acids., Ann. Rev. Biochem., -
36, 407-448.

20. Kabat, R. A., y M. M. MAYER. 1961. Experimental Immunochemis--
try. Ed. por G. Thomas, Springfield, Illinois. U.S.A.
21. Lehninger, A. L. (1972), Bioquímica, 5a Reedicón, Ediciones
Omega, Barcelona, España, 675-680.
22. Lerman, L. S. y L. J. Tolmach. 1957. Cellular Incorporation -
of DNA Accompanyng Transformatio in Pneumococcus .
Biochim. Biophys. Acta 26 , 68-82.
23. Lowry, O. H. y N. J. Rosebrough. 1951. Protein measurement --
with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193.
265-275.
24. Minson, A. G., Wildy, P., Bucken, A. Derby, G. 1978. Intro---
duction of Herpes-DNA or Transformed-Cell DNA, 13 ,
(3), 581-587.
25. Pauling, G., Beck, L. A. Wilczynski, S. P. 1976. Properties -
of a DNA ligase mutant of Escherichia coli; Introduc
tion of strand breaks in DNA. J. Gen. Microbiol. 24,
(2) , 297-304.

26. Peterson, E. A. M. Sorber., 1955., Chromatography of Enzymes. I. Cellulose 30 - Exchange Adsorbents. J. Am. Chem. Soc. 77, 751.
27. Bass, G.H. 1972, Cell Surface Immunology in J. I. No. 234, 5, 30.
28. Rodríguez, G. H., 1976, Tesis profesional: Transferencia de Material Genético en Animal Integro. UNCS. IPN.
29. Romero, G. B. 1976., Tesis Profesional: Preparación de un complejo DNA-IgG para su empleo en el Tratamiento de la Diabetes Mellitus Juvenil Humana. UNCS, IPN.
30. Szybalska, H. W. y W. Szybalsky, 1962, Genetic of human - cells line, IV. DNA-mediated heritable transformation of a biochemical trait. Proc. Nat. Acad. Sci. , U.S.A. 49 , 2026-2034
31. Vosberg, H.P. 1977. Molecular cloning of DNA. An introduction into techniques and Problems. Hum.Genet. 40 , (1), 1-72.

32. Watson, J. D., 1974 *Biología Molecular del gen*, 2a. ed., -
Fondo Educativo Interamericano, S. A. México, D.F.
240-244.

33. Wilkins, M. 1956, *Physical Studies of the Molecular Struc-
tural of Deoxyribose Nucleic Acid and Nucleopro--
tein.*, *Quant, Biol.*, 75 , (21) , 90.

34. William J. W., 1975., *Hematología* , 1a. ed., Salvat., Edi-
tores., Barcelona, España., 2 , 821-822.

35. Woodworth, Gutai V., Lebowitz, J. 1976. Introduction of --
interrupted secondary structure in supercoiled--
DNA as function of superhelix density; considera-
tion of hairpin structures in superhelical DNA.-
J. Virol. 18 , (1), 195-204.