

Tesis de Posgrado

Exoenzimas en tetrahymena

Jacobsen de Florín-Christensen, Mónica O.

1988

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Jacobsen de Florín-Christensen, Mónica O.. (1988). Exoenzimas en tetrahymena. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2511_JacobsendeFlorinChristensen.pdf

Cita tipo Chicago:

Jacobsen de Florín-Christensen, Mónica O.. "Exoenzimas en tetrahymena". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1988.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2511_JacobsendeFlorinChristensen.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Carrera del Doctorado en Ciencias Biológicas

TESIS DOCTORAL

EXOENZIMAS EN Tetrahymena

Mónica O. JACOBSEN de FLORIN-CHRISTENSEN

Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE)

Universidad Nacional de La Plata - CONICET

Director: Leif Rasmussen, dr. phil.

Universidad de Odense, Dinamarca

1988

*Tesis.
2511
y. 2.*

Los trabajos descriptos en esta Tesis fueron iniciados en el Instituto de Anatomía y Citología de la Universidad de Odense, Dinamarca, y en el Instituto de Zoología de la Universidad de Münster, Alemania Federal. Las etapas finales se desarrollaron en la Cátedra de Biología Celular, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, en el Centro de Estudios Parasitológicos y de Vectores (CEPAVE), La Plata, y en el Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP).

Deseo agradecer al Dr Leif Rasmussen, Universidad de Odense, Dinamarca, al Dr Julio Azcurra, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, y al Dr Rodolfo R. Brenner, INIBIOLP, por el apoyo brindado para la realización de esta Tesis. Agradezco también la hospitalidad del Dr Klaus Heckmann, Director del Instituto de Zoología de la Universidad de Münster, Alemania Federal.

Las siguientes Instituciones me concedieron las becas que hicieron posibles estos estudios:

Ministerio de Relaciones Exteriores (Udenrigsministeriet) de Dinamarca.

Sociedad Dano-Argentina (Dansk-Argentinsk Forening), Hillerød, Dinamarca.

- Heinrich Hertz Stiftung, Ministerio de Ciencia e Investigación, Estado de Nordrhein-Westfalen, Alemania Federal.

Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

En 1983 y 1984 llevé a cabo estos estudios como Adjunktvikar (Junior lecturer) de la Universidad de Odense. Por ello, agradezco también a las autoridades de dicha Universidad.

El Consejo Alemán de Investigaciones (Deutsche Forschungsgemeinschaft) y la Fundación Carlsberg de Dinamarca aportaron fondos para cubrir los gastos de laboratorio.

INDICE

Resumen pg.1

1. Introducción pg.2

- 1.1. Ubicación taxonómica
- 1.2. Morfología
- 1.3. Nutrición
- 1.4. Ecología
- 1.5. Liberación de enzimas lisosomales

2. Materiales y Métodos pg.22

- 2.1. Materiales
- 2.2. Cultivo de los organismos
 - 2.2.1. Cepas
 - 2.2.2. Medios
 - 2.2.3. Determinación de la densidad de los cultivos
- 2.3. Determinaciones enzimáticas
- 2.4. Estudios farmacológicos
 - 2.4.1. Tratamiento con dibucaína
 - 2.4.2. Tratamiento con ionóforos
- 2.5. Determinación del Ca^{++} libre citosólico
- 2.6. Medición del ritmo de egestión de vacuolas
- 2.7. Observación microscópica de mucocistos
- 2.8. Determinación de actividades enzimáticas de superficie
- 2.9. Análisis de los datos

3. Resultados pg.34

- 3.1. Selectividad de la liberación de hidrolasas ácidas (LHA)
- 3.2. Efecto de un aumento de Ca^{++} libre citosólico sobre la LHA
- 3.3. Estudio de la relación entre la LHA y la egestión de vacuolas alimenticias
 - 3.3.1. Tratamiento con dibucaína

Resumen

Diversos autores han mostrado que el ciliado Tetrahymena thermophila libera enzimas hidrolíticas de pH óptimo ácido, como fosfatasa, β -hexosaminidasa, proteasa, nucleasa, fosfolipasas y otras, al medio extracelular. Estas enzimas son de origen lisosomal. La naturaleza de este proceso y su rol biológico no habían sido elucidados hasta el presente. En esta Tesis, utilizando líneas celulares mutantes y de tipo salvaje, se investigaron aspectos fundamentales de la fisiología de este fenómeno. Así, se ha logrado demostrar que la liberación de hidrolasas ácidas (LHA) es un proceso selectivo que no involucra pérdida de componentes citoplásmicos. Se encontró además que la LHA es fuertemente estimulada por agentes farmacológicos, como los ionóforos A23187 e Ionomicina, que son capaces de aumentar la concentración de Ca^{++} libre citosólico. Estos resultados sustentan el concepto de la LHA como un auténtico proceso secretorio, indicando que una población de los lisosomas de Tetrahymena tiene las propiedades características de las vesículas secretorias de las células eucariotas. Se observó, por otra parte, que la secreción de enzimas lisosomales es independiente de otros procesos de exocitosis que tienen lugar en la misma célula, como la secreción de mucocistos y la egestión de vacuolas digestivas a través del citoprocto, indicando que la LHA es un evento celular en sí mismo y no una mera consecuencia de otros procesos. En esta Tesis se describe además la presencia de fosfatasa ácida y otras hidrolasas sobre la superficie de Tetrahymena. Se propone el nombre "exoenzimas" para referirse a estas enzimas y a las hidrolasas secretadas. El rol de las exoenzimas en la biología de Tetrahymena, por último, fue analizado mediante experimentos nutricionales. En éstos, se evalúa la capacidad de distintos medios para dar lugar al crecimiento de los ciliados. Se utilizaron medios sintéticos y medios que imitan condiciones naturales. De este modo se encontró que las exoenzimas pueden jugar un rol decisivo en la nutrición de estos ciliados al catalizar la digestión extracelular de nutrientes. Se discuten los roles de las exoenzimas a la luz de datos de la biología y ecología del género Tetrahymena, como asimismo de otros protozoos parásitos y de vida libre que también liberan hidrolasas al medio.

1.1. Ubicación taxonómica

La familia Tetrahymenidae, a la cual pertenece la especie Tetrahymena thermophila, se ubica taxonómicamente, según la clasificación más reciente (1), como se describe a continuación.

Reino	<u>Animalia</u>
Subreino	<u>Protozoa</u>
Phylum	<u>Ciliophora</u> Doflein, 1901
Clase	<u>Oligohymenophorea</u> de Puytorac et al, 1974
Subclase	<u>Hymenostomatia</u> Delage & Hérouard 1896
Orden	<u>Hymenostomatida</u> Delage & Hérouard, 1896
Suborden	<u>Tetrahymenina</u> Fauré-Fremiet, en Corliss, 1956
Familia	<u>Tetrahymenidae</u> Corliss, 1952

T.thermophila era considerada antes como una variedad de la especie T.pyriformis (se la llamaba T.pyriformis syngen I). Su separación como especie independiente fue propuesta por Nanney y McCoy (2). Las principales diferencias entre T.thermophila y T.pyriformis son que la primera posee un micronúcleo y puede reproducirse sexualmente, por conjugación, mientras que la segunda es amiconucleada y sólo tiene reproducción asexual. Por otra parte, la temperatura óptima de cultivo de T.thermophila es de 37°C y la de T.pyriformis, de 28°C. Las demás características de estas especies son en general muy similares.

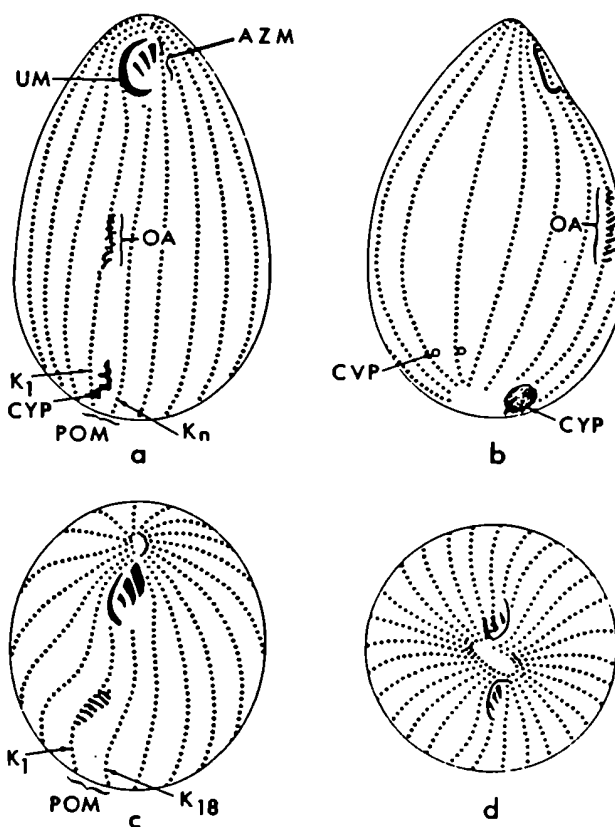
1.2. Morfología

Son células alargadas, con forma de pera, de lo que deriva el nombre "pyriformis". Miden aproximadamente 50 µm de largo y 30 µm de ancho (3). La ciliatura somática, como puede

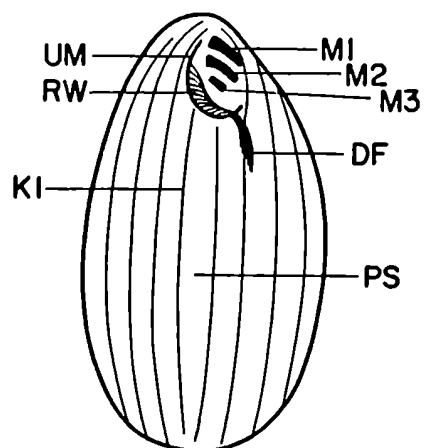
observarse bajo microscopio óptico luego de impregnación argéntica, es uniforme y está distribuida en 18 hileras longitudinales de cilias (meridianos primarios) (4). Alternando con los meridianos primarios, se encuentran los meridianos secundarios, compuestos por hileras de mucocistos, organelas secretorias típicas de estos ciliados. Cerca del extremo anterior se encuentra el aparato oral. Es una cavidad poco profunda, con una membrana de cilias fusionadas en la pared derecha, la membrana ondulante, y tres membranas menores paralelas en la pared izquierda. La presencia de estas cuatro membranas es la causa del nombre "Tetrahymena". En el fondo de la cavidad oral puede observarse material fibroso y microtúbulos formando la llamada "fibra profunda" o "fibra interna" que se extiende hacia el interior de la célula. Esta es aparentemente una estructura de sostén que, junto con la membrana ondulante, daría la forma y estabilidad al aparato oral (5). Las vacuolas alimenticias, que miden en promedio 5 μm de diámetro, se forman secuencialmente en el fondo de la cavidad oral. Esto ocurre durante todo el ciclo celular, con excepción de un período de 15 a 30 min alrededor de la división binaria y durante la conjugación (6). Otras estructuras somáticas permanentes que pueden observarse luego de la impregnación argéntica son el poro anal o citoprocto, en la superficie ventral posterior y dos poros donde descarga la vacuola contráctil, en la zona posterior derecha (7). En los esquemas de la Fig. 1 se hallan representadas las principales estructuras somáticas de Tetrahymena.

En el centro de la célula se encuentra un único macronúcleo de aproximadamente 10 μm de diámetro. Adyacente a éste, se encuentra un micronúcleo de 1 a 2 μm de diámetro. Ambos núcleos están rodeados por una envoltura de doble membrana con abundantes poros. El micronúcleo tiene un complemento diploide de DNA distribuido en 5 cromosomas (7). La información contenida en el DNA micronuclear no se expresa durante el crecimiento vegetativo, sino que constituye un reservorio genético para nuevos micro y macronúcleos que se forman luego de la conjugación en las dos células hijas. El macronúcleo determina el fenotipo durante el crecimiento vegetativo (8).

Fig.1. Estructuras corticales en Tetrahymena



UM= membrana ondulante; AZM= zona adoral de membranelas; OA= primordio del aparato oral de la futura célula hija; CYP= citoprocto; CVP= poros de la vacuola contráctil; K1= primer meridiano estomatogénico; K18= último meridiano; POM= meridianos postorales.



DF= fibra profunda
 KI= meridiano 1
 M1,M2,M3= membranelas 1,2 y 3
 PS= sitio del primordio oral
 RW= sostén de la membrana ondulante
 UM= membrana ondulante

El citoplasma de Tetrahymena está cubierto por una "película", formada por una membrana celular externa, que es continua con la membrana que recubre las ciliias, una membrana media y una interna. Las dos últimas se fusionan en sus extremos a lo largo de los meridianos primarios y secundarios, formando sacos llamados alvéolos (9). La función de éstos es desconocida aunque se ha propuesto que pueden servir como reservorio de Ca^{++} que participaría en el movimiento ciliar (10). Debajo de los alvéolos puede observarse una compleja red de microtúbulos y la capa ectoplásmica, constituida por material amorfo. En la zona anterior a cada cilia hay una pequeña invaginación de la membrana celular formando los sacos parasomales. Estos constituyen zonas de activa endocitosis y pueden verse aquí numerosas fosetas recubiertas (coated pits), a partir de las cuales se forman vesículas recubiertas (coated vesicles). Los sacos parasomales son el único sitio conocido, además del citoprocto, donde la membrana celular se pone en contacto directo con el citoplasma, por estar la capa ectoplásmica interrumpida a este nivel (9). En la Fig. 2 se muestra una micrografía electrónica de un corte de Tetrahymena a nivel de la superficie celular. Pueden observarse sacos alveolares, dos ciliias y los sacos parasomales delante de éstas. Obsérvense las fosetas recubiertas en los sacos parasomales, mostrando la estructura característica asociada a las cubiertas de clatrina.



Fig.2. Micrografía electrónica de un corte de Tetrahymena a nivel de la superficie celular.

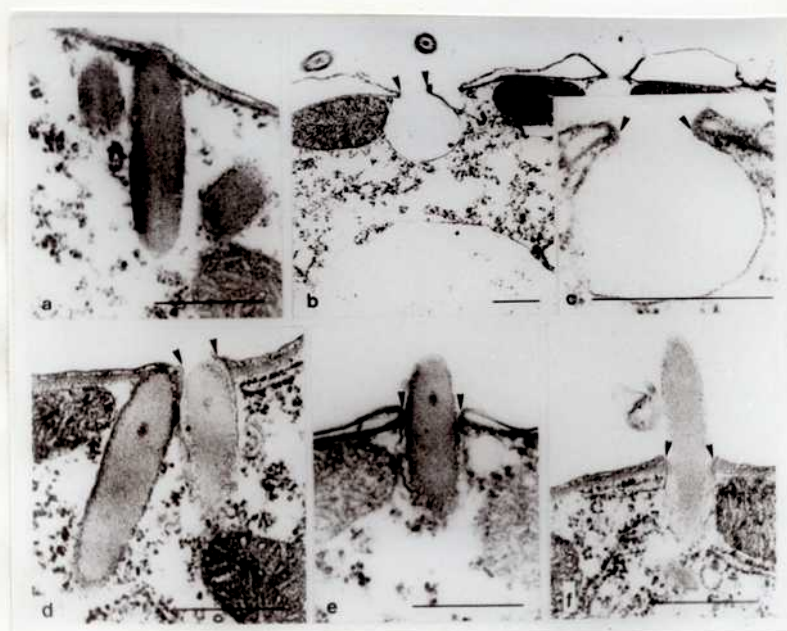
1) cilia; 2) saco alveolar, 3) saco parasomal con foseta recubierta.

Los mucocistos de Tetrahymena han servido de modelo para numerosos estudios sobre los mecanismos de exocitosis y fusión de membranas (11,12,13,14). Son organelas con forma de cigarro, de $0,9 \mu\text{m} \times 0,32 \mu\text{m}$, limitadas por una membrana, que se encuentran ancladas debajo de la membrana celular, a lo largo de los meridianos secundarios (12). Su contenido, la matriz, está muy condensado y presenta una estructura paracristalina (15). Se originan como pequeñas invaginaciones del retículo endoplásmico rugoso, formándose vesículas que sufren un proceso de maduración y se dirigen a la periferia, donde quedan fijadas en sitios regulares por debajo de la película (16). Por criofactura, se observó que a nivel de los sitios de fijación, la membrana celular presenta un sistema de partículas intramembranas en forma de rosetas regulares (11,12). Se ha propuesto que estas partículas, que se dispersan al ocurrir la exocitosis de los mucocistos, cumplen un rol importante en esta secreción.

La exocitosis de los mucocistos se produce por diversos estímulos, como la exposición a $0,15 \text{ M NaCl}$, Alcian Blue (17), glutaraldehído (12) y a ciertos agentes que aumentan la concentración de Ca^{++} libre intracelular, como la dibucaína (18) y el ionóforo A23187 (19). Durante la exocitosis, la membrana que recubre el mucocisto se fusiona con la membrana celular y el mucocisto es liberado al medio, al tiempo que se decondensa su matriz. Esta sufre así un aumento de volumen de 10^3 veces. La forma cilíndrica, sin embargo, se conserva y la matriz se muestra ahora como una ordenada red tridimensional de fibrillas (15). Los mucocistos descargados se conservan intactos por meses en el medio extracelular, a pesar de la presencia de las numerosas enzimas hidrolíticas que Tetrahymena libera (20).

Se ha propuesto (11,12,13) que la expansión de la matriz del mucocisto proporciona una fuerza impulsora que conduce a la exocitosis. Se sugiere que la primera etapa en la exocitosis del mucocisto implica un cambio en la permeabilidad de la membrana que conduce a una entrada masiva de agua a la organela, resultando en la expansión mencionada e impulsando el mucocisto hacia el exterior. Los mismos autores indicaron que

la exocitosis del mucocisto va acompañada de una pérdida de la estructura para convertirse en un material amorfo. Sin embargo, como se indicó anteriormente, esto no es así puesto que pueden recuperarse mucocistos del medio que conservan su forma original. El aspecto amorfo que es comunmente observado en micrografías electrónicas, es considerado un artefacto resultante de las estructuras expandidas. Por otra parte, en un trabajo no comprendido en esta Tesis (Florin-Christensen, M., Florin-Christensen, J., Tiedtke, A. Uncoupling of exocytosis and matrix decondensation in mucocyst discharge in Tetrahymena, env. a publ.) se logró demostrar, cambiando las condiciones de la preparación, que la expansión de la matriz no es necesaria para que ocurra la exocitosis. Este hecho se documenta en la Fig. 3 donde se muestra un conjunto de micrografías electrónicas en las que se pueden observar mucocistos no descargados (a y d), mucocistos descargados, evidenciados por los bolsillos exocitóticos remanentes (b y c) y mucocistos en proceso de exocitosis (e y f). En estos últimos puede verse que se ha completado normalmente el fenómeno de fusión de membranas, característico de la exocitosis, sin que haya habido expansión de la matriz.



La función de los mucocistos es desconocida aunque se han propuesto para ellos diversos roles. Se sugirió que podían participar en la nutrición, facilitando la retención de partículas, que luego serían incorporadas a vacuolas alimenticias (21). Sin embargo, hemos observado que un mutante bloqueado en la exocitosis de mucocistos, SB 715, tiene una capacidad de filtración igual a la del tipo salvaje del que deriva. Por otra parte, mediante experimentos nutricionales utilizando medios sintéticos químicamente definidos, no hemos logrado detectar diferencias entre la cepa mutante y la salvaje en la utilización de una gran diversidad de nutrientes.

La membrana celular de Tetrahymena ofrece una particularidad muy interesante. Está compuesta en su mayor parte por fosfolípidos, un tipo especial de fosfolípidos. En éstos, la etanolamina (presente en la cefalina) está unida al grupo fosfato por un enlace directo P-C, en lugar de P-O-C (22). Muchos de estos compuestos tienen también una unión éter, en lugar de una unión éster en la posición sn-1 (23). La primera característica les confiere resistencia a la hidrólisis por fosfolipasa C (24,25) mientras que la segunda posiblemente prevenga la degradación por fosfolipasa A (26). Es importante destacar que la membrana celular externa está formada predominantemente por fosfolípidos, lo cual no se observa en las membranas internas como las del retículo endoplásmico o mitocondrias (27,28,29).

1.3. Nutrición

Tetrahymena puede crecer en el laboratorio en medios axénicos, químicamente definidos o complejos, como la proteosa peptona, y en medios no axénicos en los cuales se utilizan bacterias, como Aerobacter aerogenes, como fuente nutritiva. En condiciones naturales, hay especies de vida libre que pueden alimentarse de bacterias y especies parásitas, facultativas y obligatorias, que se nutren con los tejidos y fluidos

de sus hospedadores. Muchas especies son histófagas, lo cual significa que pueden crecer teniendo como única fuente de alimento trozos de tejido animales o vegetales. Se han utilizado con éxito trozos de cerebro o riñón de rata y también granos de trigo o garbanzos (30).

En cuanto a qué nutrientes son esenciales para Tetrahymena, estas células tienen un requerimiento absoluto de aminoácidos, vitaminas del complejo B, una pirimidina, una purina y algunas sales inorgánicas. Los carbohidratos no son indispensables, pero se observó que hay un mejor crecimiento en presencia de glucosa o dextrina. Tampoco necesitan aporte externo de ácidos grasos aunque los incorporan rápidamente si éstos son agregados al medio de cultivo (31).

Si bien la formación de vacuolas alimenticias es la forma más conocida de alimentación en los ciliados en general, la incorporación de nutrientes a través de la membrana plasmática juega también un rol fundamental en la nutrición de Tetrahymena.

Las vacuolas alimenticias contienen partículas visibles bajo microscopio óptico (mayores de $0,2 \mu\text{m}$). Las tres membranelas orales y la membrana ondulante, mediante fuerte agitación generan una corriente de partículas hacia la cavidad oral, las cuales se van llenando la vacuola en formación que se encuentra en el fondo de la cavidad. En la zona de la citofaringe pueden observarse numerosas vesículas pequeñas que posiblemente contribuyan a la generación de la vacuola. Cuando ésta alcanza un diámetro de aproximadamente $5 \mu\text{m}$, es incorporada al citoplasma por endocitosis (6).

Las vacuolas se forman con una frecuencia aproximada de 1 cada 3 minutos. Se puede contar un promedio de 30 vacuolas por célula en una población en fase logarítmica, crecida en proteosa peptona. Tetrahymena puede incorporar diversidad de partículas por medio de las vacuolas alimenticias, entre ellas, bacterias, levaduras y partículas de tinta china, látex, dimetilbenzatraceno o albúmina de huevo coagulada por calentamiento (6). Según algunos autores, las células poseen cierta selectividad en cuanto a lo que ingieren. Por ejemplo,

aceptan partículas de tinta china solas o mezcladas con bacterias. También ingieren partículas de oro coloidal, pero si éstas se mezclan con bacterias, incorporan sólo las bacterias (32).

Tetrahymena, al igual que otros ciliados, tiene la capacidad de concentrar partículas en las vacuolas alimenticias. Se encontró que el volúmen de fluido extracelular depurado de partículas por las células era aproximadamente 500 veces mayor que el volumen de las vacuolas formadas en el mismo tiempo (33). Esto sugiere que Tetrahymena puede jugar un rol importante en la limpieza de ambientes en la Naturaleza y abre la posibilidad de su aprovechamiento en plantas de purificación.

El proceso que sufre la vacuola alimenticia luego de ser endocitada ha sido estudiado con detalle en Paramecium (34). Se observó que en el curso de los primeros 3-4 minutos, el pH de la vacuola baja de 7 a menos de 3. Esto ocurre porque un grupo de vesículas citoplásmicas, los acidosomas, que tienen bombas de protones en sus membranas, se fusionan con las membranas de las vacuolas. Esta acidez temporaria es útil de muchas maneras. Ayuda a matar microorganismos, desnaturaliza macromoléculas, haciéndolas más fácilmente hidrolizables por las enzimas lisosomales y libera grupos necesarios para la nutrición de complejos de gran tamaño. De esta manera, el complejo Fe(III)-citrato probablemente se separa en las vacuolas alimenticias por competencia con los protones, permitiendo que el Fe(III) liberado entre al citoplasma. En los siguientes 5 minutos, muchas pequeñas vesículas se forman a partir de la vacuola, lo que hace que esta reduzca su tamaño en un 50%. Luego, los lisosomas primarios se unen a la vacuola que, de esta manera, recobra su tamaño original y elevan algo su pH. Así, las enzimas lisosomales entran en contacto con el contenido vacuolar y lo digieren. El material digerido se incorpora al citoplasma y el no digerido permanece en la vacuola. Esta se fusiona a una zona particular de la superficie de la célula, el citoprocto, liberando su contenido al exterior. Poco tiempo después, la membrana en este punto se colapsa y forma vesículas vacías que posiblemente sirvan como

reserva de membrana para nuevas vacuolas. Este proceso ha sido descrito también para Tetrahymena (35) pero aún no se han encontrado en ésta evidencias de la presencia de acidosomas.

Como se mencionó anteriormente, en los sacos parasomales pueden observarse fosetas recubiertas de clatrina que, por endocitosis, dan lugar a pequeñas vesículas. Estas tienen un diámetro de 100 nm, 10^5 veces menores que las vacuolas alimenticias. Pueden visualizarse con microscopio electrónico, utilizando ferritina cationizada (36). No se conoce su importancia fisiológica, pero se ha sugerido que, bajo ciertas condiciones, podrían servir para cubrir los requerimientos celulares de algunos micronutrientes (Rasmussen, comunicación personal). Cuando se disponga de mutantes deficientes en la formación de estas microvesículas se podrá aclarar su significado fisiológico.

Tetrahymena puede incorporar nutrientes a través de su membrana plasmática, o sea sin que haya invaginación de la membrana, como ocurre en la formación de vacuolas alimenticias o de microvesículas. Se puede llegar a esta conclusión analizando los resultados de varios experimentos:

i) Las células no forman vacuolas durante un período de 20 min previo a la división celular. Si se les suministra fenilalanina o histidina radiactivas a células sincronizadas en su ciclo celular, puede observarse que éstas incorporan los aminoácidos a un ritmo constante durante todo el ciclo. Es decir, que la incorporación tuvo lugar también durante el tiempo en que no hubo formación de vacuolas (37).

ii) Se midió la velocidad de incorporación de fenilalanina en un mutante bloqueado en la formación de vacuolas, NP1, y en la cepa salvaje de la que éste deriva y se comprobó que no había diferencias significativas (Rasmussen, L., comunicación personal).

iii) Se observó que la incorporación de fenilalanina y metionina mostraban cinética de saturación (38). Esto también fue demostrado para la incorporación de nucleósidos (39). Se encontró asimismo que la timidina y otros nucleósidos inhibían competitivamente la incorporación de uridina. La ribosa y

deoxiribosa no afectan el transporte de uridina, sugiriendo que la especificidad del mecanismo de transporte reside en la purina o pirimidina (39).

iv) Se estudió la cinética de incorporación de arabinosa, una pentosa que no es metabolizada por estas células. Se observó que la arabinosa no es concentrada por las células, a diferencia de la glucosa que sí lo es. Si a un cultivo equilibrado con arabinosa se le agrega glucosa se produce una pérdida de arabinosa de las células, en contra de un gradiente de concentración, es decir que ocurre un intercambio entre arabinosa intracelular y glucosa extracelular (40).

Estos resultados sugieren que la membrana de Tetrahymena tiene mecanismos de incorporación de nutrientes mediados por transportadores.

1.4. Ecología

Los protozoos en general exhiben una gran capacidad de adaptación a variaciones en factores ambientales, tales como luz, temperatura, salinidad, pH y concentración de oxígeno. Esta adaptabilidad puede explicar su amplia distribución geográfica (41). Tetrahymena no es una excepción a esta condición general. En realidad, algunas de sus especies muestran una capacidad de adaptación incluso mayor que la de las especies de plantas y animales más ubicuas. La especie tipo T.pyriformis parece ser la más cosmopolita (*). Ha sido aislada de lugares muy distintos, no sólo de habitats de agua dulce, sino también del suelo, aguas termales, aguas salobres y cavidad del cuerpo de varios invertebrados acuáticos (30). También se la ha hallado como organismo coprófilo (42,43,44).

[(*) Estos estudios son previos a la separación de T.thermophila de la especie T.pyriformis. Muchas de las observaciones fueron hechas utilizando T.pyriformis syngen I, que es la actualmente designada T.thermophila.]

Las preferencias alimenticias de Tetrahymena son amplias. Como se señaló anteriormente, puede nutrirse como micrófaga, de bacterias, como histófaga, de los tejidos de organismos invertebrados o vertebrados; como parásita facultativa, de una dieta líquida provista por los fluidos del hospedador y como organismo de laboratorio, de nutrientes disueltos, incluso de composición química totalmente definida y en completa ausencia de otros organismos (30).

Con respecto al parasitismo, Tetrahymena exhibe un amplio rango de posibilidades. Se puede agrupar a las distintas especies de este género en cuatro categorías, aunque esta división no es estricta (30). Estas categorías son:

a) Formas de vida libre: Típicamente se las encuentra como no parásitas en la Naturaleza, o sea son esencialmente de vida libre obligadas, aunque bajo condiciones experimentales pueden mostrar cierto grado de parasitismo (por ejemplo, cuando se las inocula en la cavidad del cuerpo de alguna larva de insecto). A este grupo pertenecen T.setifera, T.patula, T.vorax y T.paravorax.

b) Formas parásitas facultativas: Son formas que son generalmente de vida libre pero para las cuales el parasitismo es también una condición natural. Estos ciliados pueden vivir por un período ilimitado de tiempo como endoparásitas, tanto experimentalmente como en la Naturaleza. Pertenecen a este grupo dos especies, T.pyriformis (incluyendo a T.thermophila) y T.rostrata. La primera se encuentra en general en la cavidad del cuerpo de invertebrados acuáticos, como larvas de insecto. La infección ocurre a través de lesiones en el tegumento del hospedador u ocasionalmente por la abertura oral y es generalmente fatal. T.rostrata se encuentra como forma libre en el suelo, hojarasca y musgo. Puede parasitar gasterópodos terrestres, siendo la infección altamente patogénica.

c) Formas de vida libre facultativas: Se las encuentra típicamente en asociación con un hospedador pero son también capaces, tanto en la Naturaleza como experimentalmente, de vivir por tiempo indeterminado libres de los tejidos del hospedador. En esta clase encontramos a T.chironomi y

T.corlissi. T.chironomi parasita larvas de quironómidos. Entra al hemocele aparentemente por aberturas que aparecen durante la muda. Siempre causa muerte del hospedador. Poco se conoce sobre su estadio de vida libre. Sólo se sabe que experimentalmente puede cultivarse fuera del hospedador. T.corlissi parasita vertebrados acuáticos, generalmente penetra en formas larvales, a través de heridas, invadiendo el sistema circulatorio. Aquí también poco se sabe de su vida libre, aunque se la ha encontrado en la Naturaleza alimentándose de bacterias, y en el laboratorio se ha observado que es una voraz histófaga.

d) Formas parásitas obligadas: Pasan al menos la mayor parte de su ciclo celular dentro de un hospedador, aunque experimentalmente pueden cultivarse fuera de él. Seguramente, poseen en la Naturaleza un estadio libre en su ciclo de vida pero posiblemente este sea de corta duración. T.stegomyae y T.limacis exhiben esta forma de vida. T.stegomyae es parásita obligada de las larvas de algunos mosquitos. En la invasión interviene un quiste que se fija a la cutícula de la larva, pero se carece de más información sobre este hecho. La infección causa la muerte del hospedador. T.limacis parasita gasterópodos terrestres. La penetración es por la boca y la infección es poco o no patogénica.

Existen casos de infecciones mixtas en las que dos especies pueden encontrarse en el mismo hospedador. Por ejemplo, T.pyriformis y T.chironomi pueden hallarse juntas en el hemocele de larvas de quironómidos. La infección es fatal, se halle presente una o ambas especies. También, T.rostrata y T.limacis pueden parasitar juntas a babosas, pero su ubicación en el hospedador y su efecto son diferentes. T.rostrata se ubica en el riñón y es muy patogénica, mientras que T.limacis infecta la glándula digestiva, siendo su efecto sólo levemente patogénico.

1.5. Liberación de enzimas lisosomales

La existencia de lisosomas en Tetrahymena fue demostrada por Elliott en 1965 (45). Este autor utilizó la técnica de Gomori para la detección de fosfatasa ácida, encontrando reacción positiva en vesículas rodeadas de una membrana simple. Estas vesículas son algo menores que las mitocondrias y parecen originarse de dilataciones del retículo endoplásmico rugoso directamente, sin involucrar un paso por el aparato de Golgi (45). Los lisosomas de Tetrahymena también fueron estudiados por los métodos clásicos de gradiente de densidad y las propiedades de sedimentabilidad y latencia fueron demostradas para diversas enzimas lisosomales por Müller y De Duve (46).

Junto a lisosomas primarios, se distinguen dos tipos de lisosomas secundarios: los fagolisosomas, que resultan de la fusión de lisosomas primarios con vacuolas alimenticias y los citolisosomas, en los cuales los lisosomas primarios se han fusionado con vacuolas autofágicas (47).

En la centrifugación en gradiente de sacarosa se observa la separación de por lo menos dos poblaciones de lisosomas que equilibran a densidades distintas (48,49). Los lisosomas así separados parecen ser únicamente lisosomas primarios pues, si se suministran a las células materiales indigeribles que son fácilmente incorporados a las vacuolas alimenticias, como partículas de poliestireno (50) o dimetilbenzatraceno (49), las mismas no aparecen asociadas con ninguna de las dos poblaciones de lisosomas. Este resultado sugiere además que la célula posee una considerable reserva de lisosomas primarios y que sólo una pequeña fracción de las enzimas lisosomales están asociadas a lisosomas secundarios en un determinado momento.

La fisiología de las enzimas lisosomales de Tetrahymena tiene un rasgo peculiar que dió origen a los estudios presentados en esta Tesis: este ciliado libera incesantemente hidrolasas ácidas al medio extracelular. Estas enzimas fueron detectadas por Smith en 1961 (51). Dickie y Liener (52,53) estudiaron y caracterizaron las proteasas secretadas, pero el trabajo de mayor interés en este campo es, probablemente, el

de Müller, quien describió con precisión el proceso (48). Este autor observó que la secreción ocurre tanto en medios nutricios como no nutricios. En los primeros, la pérdida al de enzimas al medio extracelular es compensada por la biosíntesis, con lo cual el contenido enzimático por célula permanece inalterado. En los medios no nutricios, en cambio, ocurre una disminución del contenido intracelular de las distintas hidrolasas. El análisis en gradientes de sacarosa en este caso demostró que la liberación al medio coincide con la desaparición de la más densa de las dos poblaciones de lisosomas mencionadas anteriormente. Este resultado sugiere que la heterogeneidad de los lisosomas está relacionada con su destino final: la población de menor densidad estaría disponible para la digestión intracelular, mientras que la de mayor densidad estaría destinada a la secreción.

Se han sugerido diversas rutas que podría seguir la liberación de enzimas. Rothstein y Blum (54) observaron que ciertos agentes farmacológicos, como el dicloroisoproterenol, tienen la propiedad de estimular la liberación de enzimas y también la formación de vacuolas. Basados en esta observación, estos autores propusieron que la liberación se produce a través de la egestión de vacuolas alimenticias, es decir que se produciría una pérdida aumentada al medio, al incrementarse el número de vacuolas que descargan su contenido a través del citoprotecto. En contra de esta observación, Silberstein (55) demostró que el mutante NP1, que no forma vacuolas, libera enzimas lisosomales a un ritmo similar al tipo salvaje.

Müller encontró, por otra parte, que la liberación de enzimas es independiente de la función de la vacuola contráctil, pues la resuspensión de las células en medios de distinta osmolaridad, que afectan dramáticamente el ritmo de pulsación de la misma, no alteran la liberación de enzimas (48).

Tiedtke, utilizando una técnica citoquímica para la detección de fosfatasa ácida en secciones delgadas para microscopía electrónica, halló esta actividad enzimática asociada a mucocistos descargados (56). Basado en esta observación, este autor propuso que la liberación de las

hidrolasas tenía lugar como consecuencia de la descarga de mucocistos (20,56).

Las hidrolasas secretadas por Tetrahymena son glucoproteínas (57,58), como las enzimas lisosomales en otros eucariotas. Sin embargo, carecen del característico residuo manosa-6-fosfato (58,59) que se halla presente, en cambio, en las enzimas lisosomales de mamíferos (60) y en el mixomicete Dictyostelium discoideum (61).

La biosíntesis de la β -hexosaminidasa secretada por Tetrahymena ha sido estudiada recientemente (58). Esta enzima sufre un procesamiento proteolítico postraducciona para dar lugar a la forma madura secretada. Procesamientos de este tipo son normalmente observados en la biosíntesis de enzimas lisosomales en células de mamífero (60).

1.6. Producción de mutantes de Tetrahymena

Las líneas mutantes de Tetrahymena pueden estar afectadas en cualquiera de los tres compartimentos genéticos de esta célula: el micronúcleo, el macronúcleo y las mitocondrias. Por su estabilidad, facilidad de análisis genético por cruzamientos y diversidad de genes disponibles, los mutantes micronucleares son los más frecuentemente utilizados.

La obtención de un mutante micronuclear involucra los siguientes pasos (62):

1) Exposición a un mutágeno: Existen muchas alternativas pero el agente más usado es la nitrosoguanidina.

2) Expresión de la mutación micronuclear: Para esto es necesario un cruzamiento pues el micronúcleo no se expresa fenotípicamente hasta haber dado lugar a un macronúcleo, luego de la conjugación, es decir, en células exconjugantes. Por esta razón, debe inducirse la conjugación, utilizando una línea celular auxiliar que pertenezca a un grupo de apareamiento complementario. Para permitir la rápida selección de exconjugantes exitosos, las mutaciones se inducen sobre heterocariontes, o sea, células experimentalmente obtenidas que poseen macro y micronúcleo con distinta composición

genética. Los heterocariontes utilizados poseen una mutación micronuclear que les confiere resistencia a antibióticos, como la cicloheximida o la 6-metil purina, mientras que su macronúcleo es sensible a estos agentes. De este modo, sólo las células que hayan conjugado expresarán resistencia a antibióticos. La exposición a estos agentes, por lo tanto, matará a las células que no hayan conjugado, quedando sólo las exconjugantes. Esto asegura que todos los procedimientos utilizados posteriormente seleccionarán exclusivamente mutaciones micronucleares.

3) Aislamiento de células únicas y clonado: Esto puede realizarse por aislamiento directo con micropipeta bajo microscopio de disección, por dilución, dispersión en aerosol, etc. En el primer caso, que es el más seguro y frecuentemente utilizado, las células se clonan en placas de microtitulación conteniendo medio de cultivo.

4) Examen de los clones respecto de la mutación buscada: Este paso es, evidentemente, muy variable, dependiendo de cuál es el carácter mutante que se desea aislar. Así, la resistencia a un antibiótico es fácilmente detectada y el procedimiento de selección es simple. En el caso del mutante MS-1 utilizado en este estudio, que no libera enzimas lisosomales al medio, se han utilizado para la detección de clones no secretores bloques de agar con cavidades, semejantes a placas de microtitulación. Dicho agar contenía un sustrato fluorogénico para una de las enzimas que Tetrahymena normalmente secreta. La presencia de esta enzima en el medio da lugar a la liberación de colorante fluorescente en el agar que circunda al correspondiente clon, lo cual puede observarse bajo lámpara de UV. Los clones no secretores muestran un entorno oscuro en iguales condiciones (63).

5) Análisis genético de la mutación: Se hace por retrocruzas siguiendo los procedimientos de la genética mendeliana clásica. Estos permiten establecer si el carácter se debe a una sola mutación, si ésta es recesiva o dominante, y también permiten aislar la mutación de otras posibles mutaciones concurrentes.

Existen manipulaciones que permiten la expresión de mutaciones recesivas inmediatamente después del primer cruzamiento. Para esto es necesario que se produzca homocigosis en todos los loci génicos. Estos procedimientos se basan en la inducción de una conjugación aberrante en la que las células conjugantes no intercambian los micronúcleos después de la meiosis, sino que la fusión se verifica dentro de cada célula entre los dos micronúcleos haploides que tienen igual composición, de lo cual resulta la homocigosis.

2.1. Materiales

Se detallan a continuación los materiales empleados en este trabajo, seguidos de sus fabricantes.

Proteosa peptona y extracto de levadura: Difco Laboratories (Detroit, MI, USA) y Oxoid (Inglaterra); extracto de levadura, también de Laboratorios Britania (Argentina)

. Sequestrene: Ciba Geigy (Basel, Suiza)

. Cámara de conteo: Sedgewick Rafter Counting Cell S50 (Graticules Ltd., Tonbridge, Inglaterra)

. Filtros de nitrocelulosa de 0,45 μm : Millipore (Millipore AB, Vedbæk, Dinamarca)

. Drogas empleadas para preparar el medio definido, A23187, Quin 2, Quin 2 AM, ácido isocítrico, dibucaína, DMSO, p-nitrofenilfosforilcolina y sustratos colorimétricos para glucosidasa y manosidasa: Sigma Chemical Co. (St.Louis, MO, USA)

. NADP y p-nitrofenilfosfato: Boehringer Mannheim (Mannheim, Alemania Federal)

. EGTA, Na EDTA y p-nitrofenil-N-acetil-B-D-glucosaminido: Serva (Heidelberg, Alemania Federal)

Ionomicina: Calbiochem (CA, USA)

2.2. Cultivos

2.2.1. Cepas

Los estudios se llevaron a cabo utilizando el protozoo ciliado Tetrahymena thermophila. Se emplearon las cepas salvajes DIII, BIII y BVII y los mutantes NP1 y MS-1. La cepa NP1, derivada de la cepa DIII, tiene una mutación macronuclear por la cual es incapaz de formar vacuolas alimenticias cuando se la cultiva a la temperatura restrictiva de 38°C (64). Cultivadas a 30°C, estas células forman vacuolas normalmente, igual que el tipo salvaje. Por su parte, la cepa MS-1, que deriva de BVII, está bloqueada constitutivamente en la liberación de enzimas lisosomales al medio extracelular. Este fenotipo está causado por una mutación recesiva en un gen único (63).

2.2.2. Medios

2.2.2.1. Medio PPY

Está compuesto por 1% proteosa peptona, 0,1% extracto de levadura y 0,003% sequestrene. Porciones de 30 ml de este medio se repartieron en Erlenmeyers de 250 ml y se esterilizaron en autoclave a 121°C durante 30 min. Los cultivos se llevaron a cabo en baños termostatizados, ajustados a 30 o 37 o 38°C, según el caso. Estos cultivos fueron utilizados para los experimentos de liberación de enzimas lisosomales y detección de enzimas de superficie.

2.2.2.2. Medio definido

La composición de este medio se muestra en la Tabla 1. Este medio se prepara a partir de soluciones stock concentradas de los distintos grupos de compuestos, las cuales se esterilizan por filtración a través de filtros de nitrocelulosa de 0,45 µm y se almacenan a ~ 4°C. Luego de mezclar las cantidades necesarias de estas soluciones, se ajusta el pH a 7,0 con HCl 1N, se lleva a volumen con agua destilada y se esteriliza por filtración a través de 0,45 µm.

Tabla 1. Composición de un medio químicamente definido para el crecimiento de *T.thermophila*. Las cantidades se expresan como mg por litro de medio.

I) Aminoácidos		IV) Sales	
L-alanina	150	$K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$	250
L-arginina. HCl	300	KH_2PO_4	250
L-asparagina. HCl	200	$MgCl_2 \cdot 6 H_2O$	500
L-glutamato	400	$CaCl_2$	10
L-glutamina	100	citrato de K	650
glicina	400		
L-histidina.HCl.H ₂ O	200	V) Vitaminas	
L-isoleucina	200	ácido nicotínico	0,9
L-leucina	200	d-pantotenato de Ca ⁺⁺	0,75
L-lisina	200	tiamina.HCl	0,5
L-metionina	150	riboflavina-5. PO_4, Na^+	0,45
L-fenilalanina	150	piridoxal.HCl	0,1
L-prolina	200	DL-ácido tioctico	0,1
L-serina	150		
L-treonina	200	VI) Acido folínico, Ca ⁺	0,1
L-triptofano	150		
L-valina	100	VII) Metales traza	
		$Fe(NH_4)_2 (SO_4)_2 \cdot 6H_2O$	14
II) Nucleósidos		$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	4,5
Adenosina	20	$MnSO_4 \cdot 4 H_2O$	1,6
Citidina	20	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0,3
Guanosina	20	$Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,5
Uridina	20	$(NH_4)_6 Mo_7 O_{24} \cdot 4H_2O$	0,1
III) Glucosa	5000		

En ciertos casos, se prepararon medios sintéticos, carentes de alguno de los componentes, para realizar estudios nutricionales. Así, en un conjunto de experimentos se suprimió el fosfato inorgánico y, en su lugar, se añadieron distintos ésteres de fosfato, para estudiar su posible utilización como fuentes de fosfato por células de Tetrahymena.

Los experimentos con medio definido se realizaron en tubos de 12 ml, conteniendo 2 ml de medio cada uno.

2.2.2.3. Medios que imitan condiciones naturales

Se preparó una solución compuesta por las sales de los grupos IV y VII del medio definido, en esas mismas concentraciones. El pH de esta solución fue ajustado a 5,5 o a 7,5 con 1 N HCl o 1 N HOK y se repartieron porciones de 10 ml en Erlenmeyers de 100 ml con tapa a rosca. Se agregó a éstas dos granos de trigo o un cubo de tejido muscular de cerdo de 1 cm de lado, aproximadamente. Estos medios fueron autoclavados a 121°C durante 30 min. En el caso de la carne, los trozos fueron previamente hervidos durante 2 min y lavados dos veces con agua destilada. Estas preparaciones tienen por objeto imitar las condiciones naturales de desarrollo de Tetrahymena como organismo detritívoro.

2.2.2.4. Medio para el mantenimiento de las cepas

Tubos conteniendo 4 ml de agua destilada y un garbanzo fueron autoclavados durante 30 min a 121°C. Las distintas cepas fueron inoculadas en estos tubos con ansa bacteriológica y mantenidas a temperatura ambiente. El crecimiento de los ciliados en este medio es lento, por lo cual sólo es necesario repicar los cultivos cada 2 meses.

2.2.3. Determinación de la densidad de los cultivos

Se utilizaron dos métodos:

- a) Las células se contaron bajo microscopio en una cámara de conteo Sedgwich Rafter de 1 ml.
- b) Se utilizó un contador electrónico de células de acuerdo

al diseño del Dr L. Rasmussen, Universidad de Odense, Dinamarca. Este instrumento registra pulsos originados en elevaciones bruscas de impedancia que ocurren cuando, mediante una bomba peristáltica, se hace pasar la suspensión celular a través de un tubo, cuyo extremo posee un orificio calibrado de diámetro adecuado (75 a 100 μm). Al pasar una célula por dicho tubo, el orificio es parcialmente obstruido, dando lugar al mencionado aumento de la impedancia entre el interior y el exterior de la célula.

2.3. Determinaciones enzimáticas

Se utilizaron sustratos colorimétricos derivados del p-nitro fenol para las mediciones de las hidrolasas fosfatasa ácida, N-acetil- β -D-hexosaminidasa, α glucosidasa, α manosidasa y fosfodiesterasa. Las incubaciones consistieron en 75 μl de muestra y 75 μl de uno de estos sustratos, en concentración de 20 mM, disueltos en 0,25 M acetato de sodio, pH 5,0. Luego de incubar a 37°C durante períodos variables de tiempo, las reacciones se interrumpieron por agregado de 0,5 ml de 0,5 M glicina, pH 10,4. Se leyó la absorbancia a 410 nm y se calcularon los μmoles de p-nitrofenol liberados, utilizando un standard de p-nitrofenol.

La isocitrato deshidrogenasa se eligió como marcador citoplasmático por su alta actividad en el citosol (65). Esta enzima además es muy estable: un homogenato obtenido por sonicación no mostró cambios en la actividad de esta enzima luego de 6 h a 30°C. La determinación de esta actividad se basa en el aumento de absorbancia a 340 nm que ocurre como consecuencia de la reducción del NADP acoplada a la oxidación del ácido isocítrico. Las incubaciones se llevaron a cabo en un volumen final de 1,5 ml y contenían 0,1 M imidazol, pH 8,0. 25 mM Cl_2Mg , 0,30 mg/ml NADP, 0,90 mg/ml ácido isocítrico y 0,8 mM K_2EGTA . Este último compuesto fue agregado para evitar efectos inhibitorios del CaCl presente en algunas de las muestras. Las incubaciones se realizaron a 37°C, efectuándose lecturas a 340 nm a diferentes tiempos para calcular las variaciones de absorbancia.

Para medir la actividad total presente en las células, se prepararon homogenatos por sonicación en un sonicador Ultrasonics (50 W, 3 pulsos de 10s, T° ambiente).

Todas las determinaciones fueron lineales con respecto al tiempo y a la concentración de enzima.

2.4. Estudios farmacológicos

2.4.1. Tratamiento con dibucaína

Se preparó una solución 6 mM de dibucaína en 10 mM Tris-HCl, pH 6,0. A este pH la dibucaína se disuelve fácilmente, no así a valores superiores. No se detectaron variaciones en el pH durante el curso de los experimentos, pese al bajo poder buffer del Tris a pH 6.

Cultivos logarítmicos crecidos en PPY a 30°C fueron lavados dos veces con 10 mM Tris-HCl, pH 6,0. Alícuotas de 1 ml de estas suspensiones fueron agregadas a tubos de centrifuga de 15 ml conteniendo 2 ml de solución de dibucaína. La concentración de esta solución, antes de agregar las células, era de 1,5 veces la concentración final deseada. Los controles se trataron de igual manera pero usando buffer sin dibucaína. Los tubos se colocaron en gradillas inclinadas dentro de una estufa a 30°C. Luego de la incubación, los tubos se centrifugaron y se midieron las enzimas en los sobrenadantes del modo descrito en la sección 2.3.

2.4.2. Tratamiento con ionóforos

Para el tratamiento con los ionóforos A23187 e Ionomicina, las células provenientes de cultivos logarítmicos fueron lavadas dos veces con 10 mM Tris-HCl, pH 7,0 y finalmente resuspendidas en 20 mM Tris-HCl/125 mM sacarosa/1 mM Na₂EDTA, pH 7,0 (buffer TSE) a una densidad de 5 x 10⁶ células/ml. Se utilizó este buffer porque se encontró que la sacarosa previene el aumento de volumen y redondeamiento de las células que acompañan el tratamiento con A23187 en 10 mM Tris-HCl, pH 7,0.

Por otra parte, se añadió el Na_2EDTA para tener condiciones más definidas en cuanto a la concentración de Ca^{++} ya que puede haber contaminación de este ión por el material de vidrio o las sustancias buffer utilizadas. Así, el agregado de 2 mM Cl_2Ca o Cl_2Mg resulta en una concentración de ~ 1 mM Ca^{++} o Mg^{++} libres. De esta forma, se pueden comparar los efectos de los ionóforos en ausencia total de iones bivalentes en el medio extracelular con lo que ocurre cuando éstos están presentes en una concentración de 1 mM.

Las soluciones de ionóforos, o igual cantidad de solvente en los controles, se agregaron con una microjeringa Hamilton, bajo agitación continua. A tiempo 0 y luego de incubar a 25°C por los tiempos indicados, las suspensiones celulares se centrifugaron y los sobrenadantes se guardaron para determinaciones enzimáticas. En algunos experimentos se agregó CaCl_2 o MgCl_2 a las suspensiones celulares previo al agregado de los ionóforos, a partir de soluciones stock 100 mM.

En el caso del A23187, se preparó una solución stock 6 mM en etanol/dimetilsulfóxido (DMSO) (3:1, v/v) que se conservó a -20°C . La ionomicina se disolvió en DMSO en una concentración de 10 mM que se conservó a 4°C .

Tanto estos experimentos como los de dibucaína se repitieron al menos 3 veces. Todas las determinaciones se hicieron por duplicado.

2.5. Medición del Ca^{++} libre citosólico

El Ca^{++} libre citosólico se midió utilizando el marcador fluorescente Quin 2-AM. Este compuesto, en su forma de acetoximetil éster (AM éster) permea libremente las membranas y es hidrolizado intracelularmente a la forma Quin 2 libre, que queda atrapada en el interior de las células. La fluorescencia del Quin 2 aumenta al aumentar la concentración de Ca^{++} libre en el citoplasma (66,67).

Para estos experimentos, las células fueron lavadas dos veces con 10 mM Tris-HCl, pH 7,0, y resuspendidas en el mismo buffer. Se les agregó Quin 2-AM en una concentración final de

100 μ M, a partir de una solución stock 10 mM en DMSO. Como control, se utilizó una suspensión celular idéntica, a la que se agregó igual volumen de DMSO. Esta suspensión sirve para descontar la fluorescencia no debida a Quin 2, como la contribuida por las células y por el A23187.

Las suspensiones fueron incubadas durante 90 min a 25°C, luego de lo cual las células se lavaron con 10 mM Tris-HCl, pH 7,0, y se resuspendieron en buffer TSE. Procediendo de este modo, se encontró que las células incorporan más del 80% del Quin 2-AM agregado. Se requiere una concentración relativamente alta de Quin 2-AM así como también una exposición prolongada a esta sustancia para obtener señales lo suficientemente altas como para distinguirlas claramente de los cambios de fluorescencia debidos a la adición e incorporación de A23187.

Sólo parte del Quin 2-AM tomado por las células fue hidrolizado a Quin 2 libre ya que, a pesar que la fluorescencia (F 339 \rightarrow 492) aumentó luego del período de incubación, el espectro de emisión (F 339 \rightarrow λ) no alcanzó el pico a 492 nm característico del Quin 2 libre. La presencia de la forma Quin 2, sin embargo, se verificó por los grandes cambios en la fluorescencia obtenidos al agregar CaCl_2 o EGTA a homogenatos de células incubadas con Quin 2-AM como se describió. El agregado de Ca^{++} a Quin 2-AM, por otra parte, no tiene efectos sobre la fluorescencia.

La fluorescencia se midió en un espectrofluorómetro Aminco Bowman en cubetas de cuarzo de 3 ml, termostatizadas a 25°C, con agitación permanente. Se excitó a 339 nm y se registró la fluorescencia emitida a 492 nm (F 339 \rightarrow 492). Los registros se llevaron a cabo en un registrador LKB 2000.

Al finalizar los experimentos, la fluorescencia máxima se leyó a las mismas longitudes de onda, luego de sonicar las células en presencia de 0,02% Tritón X-100 y de agregar 2 mM CaCl_2 . Este último se omitió en el caso de las muestras que ya contenían 2 mM Ca^{++} . La fluorescencia mínima se midió luego de agregar 3 mM EGTA y 30 mM Tris base libre (TRIZMA) a los mismos sonicados celulares. La fluorescencia máxima

corresponde, así, a una concentración de Ca^{++} libre de aproximadamente 1 mM, mientras que la fluorescencia mínima corresponde a una concentración de Ca^{++} menor que 1 nM (66). De estos valores, se sustrajo la fluorescencia no debida a Quin, medida en las células no cargadas con este indicador.

2.6. Medición del ritmo de egestión de vacuolas

Las vacuolas alimenticias se visualizaron por exposición de los ciliados a una suspensión de tinta china. Las células concentran partículas de tinta china en sus vacuolas alimenticias, las cuales se observan así bajo microscopio óptico como círculos negros y pueden contarse fácilmente. Para las determinaciones del ritmo de egestión, los cultivos en PPY se incubaron con una suspensión de 0,05% de tinta china (concentración final) durante 20 min a 30°C. Al cabo de este tiempo, las células (conteniendo un promedio de 10 vacuolas marcadas cada una) se lavaron dos veces con PPY, se resuspendieron en este medio y se incubaron durante 30 min adicionales a 30°C. Al cabo de este período, las vacuolas marcadas se hallan concentradas en la parte posterior de la célula, cerca del citoprocto, por donde luego serán egestadas. Luego de este último período de incubación, las células se lavaron nuevamente y se resuspendieron en nuevo medio PPY, en los experimentos en los cuales se comparó la cepa salvaje con el mutante MS-1, y en 10 mM Tris-HCl, pH 6,0, con o sin agregado de dibucaína, en los experimentos en los cuales se estudiaron los efectos de esta droga. Luego de distintos tiempos de incubación, se extrajeron alícuotas de las suspensiones, las cuales se fijaron con 1% Formol/0,15 M NaCl, para el conteo de vacuolas por célula y, por otra parte, se obtuvieron sobrenadantes libres de células por centrifugación, los cuales fueron usados para mediciones de hidrolasas ácidas liberadas. Los conteos de vacuolas se efectuaron bajo microscopio, en 60 células elegidas al azar para cada muestra y con los valores obtenidos, se calculó el número medio de vacuolas por célula.

2.7. Observación microscópica de mucocistos

La visualización de los mucocistos en los sobrenadantes se logró por exposición a ferritina cationizada, en presencia de 1 mM MgCl₂. Las observaciones se llevaron a cabo con óptica de Nomarski, en un fotomicroscopio Zeiss.

Para la microscopía electrónica, las muestras se extendieron sobre grillas cubiertas de carbono y se les practicó una tinción negativa con una solución acuosa al 1% de uranil acetato. La observación fue llevada a cabo con un equipo Siemens Elmiskop, a 60 kV.

2.8. Determinación de actividades enzimáticas de superficie

Para estas determinaciones, las células se lavaron tres veces con PPY ajustado a pH 6,0 y se resuspendieron en el mismo medio en una concentración de 7×10^5 células/ml. A esta suspensión se agregó un igual volumen de una solución 20 mM en el mismo medio del sustrato correspondiente a la actividad a determinar. Las incubaciones se llevaron a cabo a 37°C. Se extrajeron alícuotas a los distintos tiempos, las que fueron brevemente centrifugadas, e inmediatamente se tomaron muestras de 0,15 ml de los sobrenadantes, a las que se añadió 0,5 ml de 0,5 M glicina, pH 10,4, para interrumpir las reacciones. Se determina así la cantidad de producto liberado por acción combinada de la enzima presente sobre la superficie celular más la liberada al medio. Se observó que se obtienen resultados idénticos si, en lugar de utilizar sobrenadantes de centrifugación, se agrega el buffer glicina directamente a porciones de 0,15 ml del cultivo entero.

El resto de sobrenadante obtenido fue utilizado para medir las actividades enzimáticas liberadas al medio. Para ello, se incubó este sobrenadante por tiempos adicionales, al cabo de los cuales se tomaron alícuotas de 0,15 ml, a las que se agregó buffer glicina como en el caso anterior. De este modo, es posible determinar las actividades presentes en el sobrenadante al tiempo de la centrifugación.

Se midió la absorbancia a 410 nm de todas las muestras. Los

valores, expresados en μ moles de p-nitrofenol liberados, se grafican determinando curvas cuyas pendientes son las actividades enzimáticas en μ moles/min. Las actividades sobre la superficie celular se obtienen como diferencia entre la actividad observada en el cultivo entero menos la actividad medida en el sobrenadante en el mismo instante.

2.9. Análisis de los datos

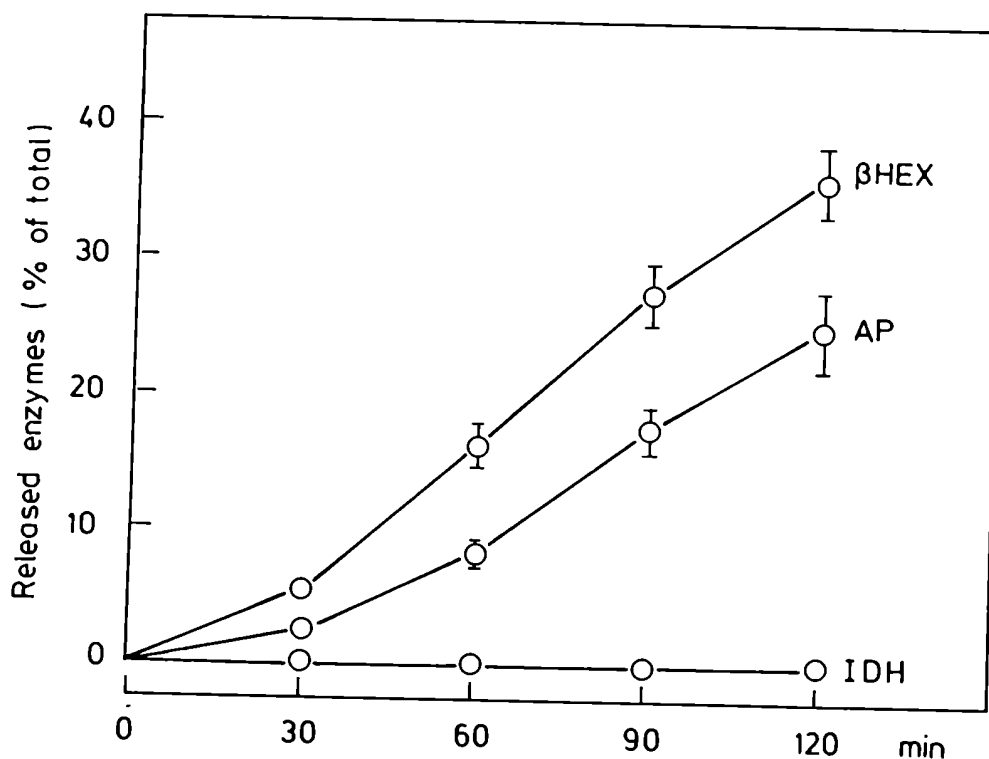
Los estudios descriptos en esta Tesis se llevaron a cabo utilizando dos suspensiones celulares paralelas independientes para cada condición. Todos los experimentos se repitieron al menos 3 veces y todas las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado. Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el test t de Student para contraste de medias.

3.1. Selectividad de la liberación de hidrolasas ácidas

La cinética de la liberación de hidrolasas ácidas (LHA) puede observarse al transferir un cultivo de Tetrahymena thermophila a medio nuevo nutritivo o inorgánico.

En el experimento que se muestra en la Fig.4, las células de un cultivo de 24 h de la cepa BIII fueron lavadas por centrifugación con 10 mM Tris-HCl, pH 7,0, resuspendidas en este mismo buffer e incubadas a 25°C. A distintos tiempos, se extrajeron alícuotas, las que fueron centrifugadas y se midieron las actividades fosfatasa ácida (AP), β -hexosaminidasa (β hex) e isocitrato deshidrogenasa (IDH) en los sobrenadantes. Esta última se utilizó como marcador citoplásmico para detectar una posible ruptura celular.

Fig.4. Actividades extracelulares halladas en el sobrenadante de una suspensión de células de T.thermophila, cepa BIII, en 10 mM Tris-HCl, pH 7,0, a 25°C. AP=fosfatasa ácida, β hex= β -hexosaminidasa, IDH= isocitrato deshidrogenasa. Los valores se expresan como porcentajes del total de cada actividad presente en el homogenato celular a tiempo 0.



Puede verse que la actividad de las hidrolasas ácidas aumenta en los sobrenadantes con el tiempo de incubación, no detectándose, en cambio, actividad IDH en los mismos. Estos resultados indican que la aparición de hidrolasas ácidas en el medio extracelular no es consecuencia de ruptura de las células o pérdida masiva de componentes celulares, sino que la liberación de estas enzimas es un proceso selectivo.

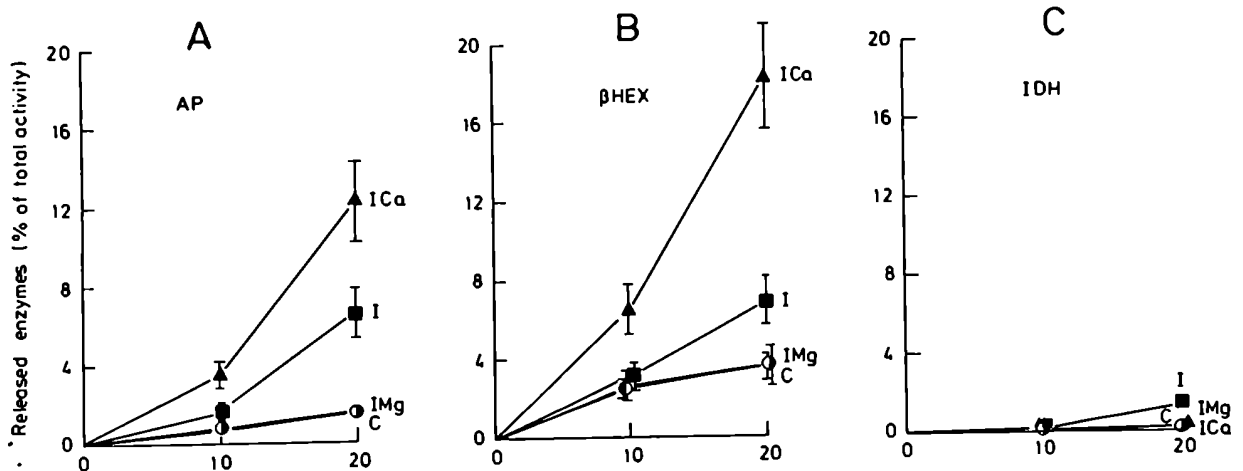
3.2. Efecto de un aumento de Ca^{++} citosólico sobre la LHA

Para profundizar el estudio sobre la naturaleza de la LHA, es decir si ésta tiene las características de una verdadera secreción, se estudio el efecto de agentes que producen aumento en la concentración de Ca^{++} citosólico, como los ionóforos A23187 y Ionomocina. Las incubaciones con estos agentes se llevaron a cabo en una solución buffer compuesta por 20 mM Tris-HCl/125 mM sacarosa/1 mM Na_2EDTA , pH 7,0 (buffer TSE), como se describe en la sección 2.4.2. La Fig. 5, A y B muestra la liberación de AP y β hex inducida por la exposición a 3 μ M A23187 durante 10 y 20 min. Los controles fueron incubados con igual volumen del solvente del ionóforo. Las incubaciones se realizaron a 25°C.

Puede observarse que el A23187 estimula marcadamente la liberación de las dos hidrolasas ácidas. Esta estimulación es máxima cuando la incubación con ionóforo se realiza en presencia de 2 mM Ca^{++} pero también ocurre en ausencia de este ion. El Mg^{++} , por otra parte, en concentración de 2 mM, previene completamente la estimulación por A23187. Cabe señalar que el agregado de estas concentraciones de Ca^{++} o Mg^{++} a suspensiones celulares control no produce variaciones en la LHA. En la Fig. 2C se muestran los valores de actividad IDH presente en las mismas muestras. Los resultados indican que el efecto del A23187 es específico sobre la LHA, ya que no va acompañado de un aumento paralelo de IDH. La IDH sólo es significativamente distinta del control a los 20 min de incubación con A23187 en ausencia de Ca^{++} . De todos modos, aún en este caso, el porcentaje liberado de esta enzima con respecto al total es mucho menor que los porcentajes de AP y

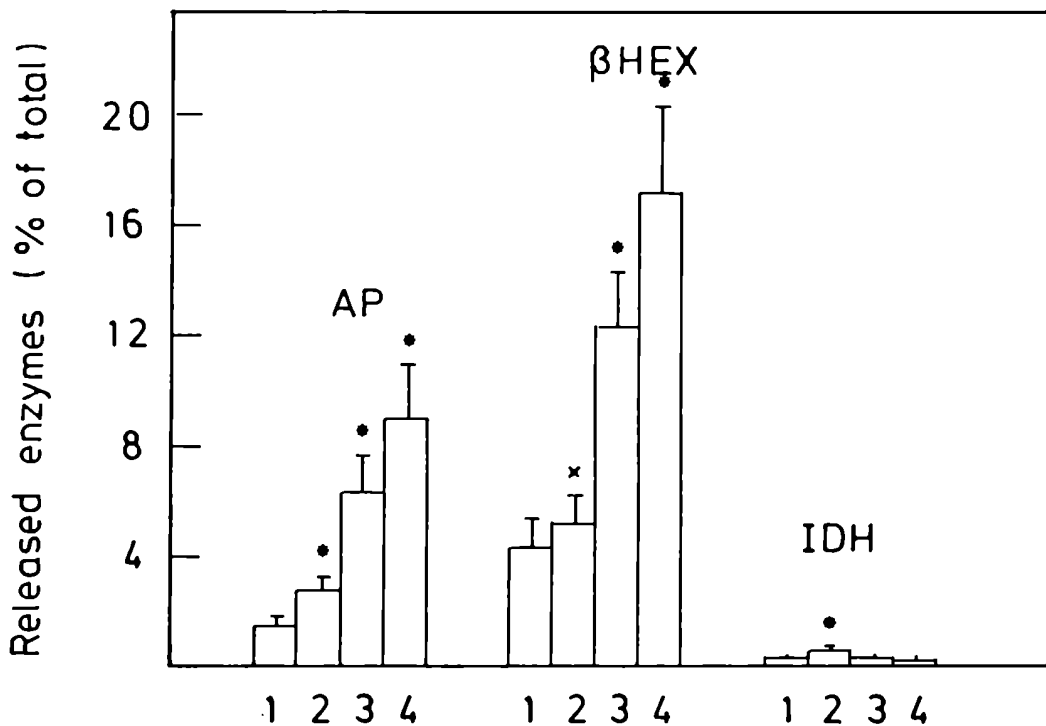
Bhex presentes en los sobrenadantes. Junto al aumento de IDH, puede verse en estas muestras un 2% de células redondeadas, indicando cierto grado de daño celular. Si se aumenta la concentración de A23187 a 5 μM , se produce lisis de un número considerable de células y un gran aumento de IDH en los sobrenadantes.

Fig. 5. LHA inducida por 3 μM A23187 en presencia y ausencia de Ca^{++} y Mg^{++} . Las células fueron incubadas a 25°C en buffer TSE conteniendo solvente del ionóforo (control, C, \circ), 3 μM A23187 (I, \blacksquare), 3 μM A23187 + 2 mM CaCl_2 (ICa, \blacktriangle) o 3 μM A23187 + 2 mM MgCl_2 (IMg, \bullet). A los 10 y 20 min se extrajeron alícuotas para determinar las actividades AP, Bhex e IDH extra-celulares. Los resultados se expresan como porcentajes de la actividad total presente en los homogenatos.



Al elevar la concentración de Ca^{++} en el medio de incubación, se produce un aumento en la estimulación de la LHA causada por A23187. Esto se ilustra en la Fig. 6, donde se hallan graficados los valores de actividades AP, β hex e IDH presentes en los sobrenadantes, luego de incubar las células con A23187 en buffer TSE, durante 20 min, en presencia y ausencia de 2 y 3 mM CaCl_2 .

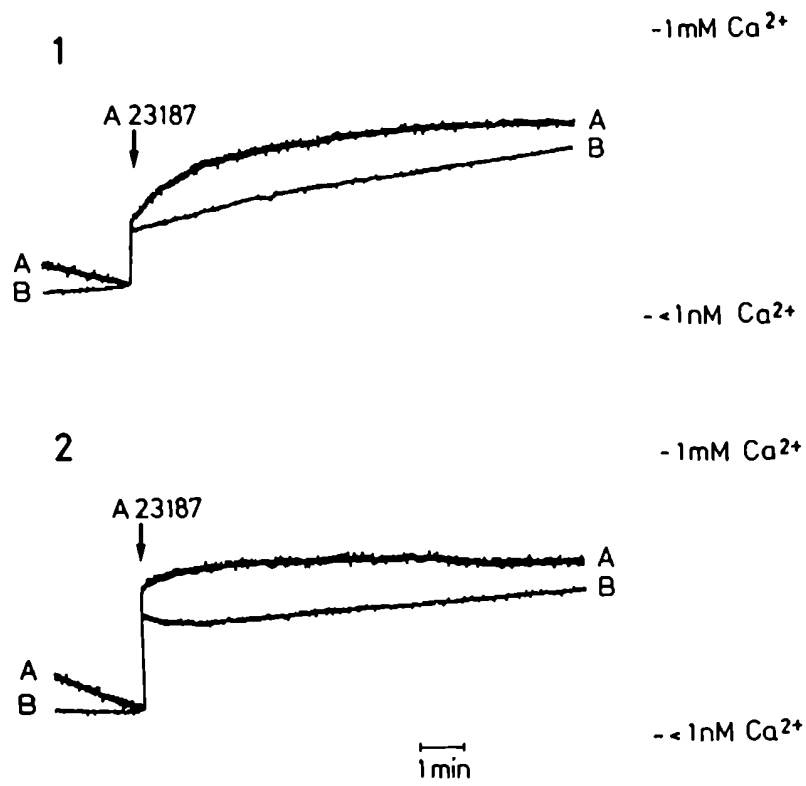
Fig. 6. Efecto de concentraciones crecientes de Ca^{++} en la estimulación de la LHA causada por A23187. Las células fueron incubadas durante 20 min a 25°C en buffer TSE conteniendo: 1) solvente del ionóforo, 2) $2\ \mu\text{M}$ A23187, 3) $2\ \mu\text{M}$ A23187 + 2 mM CaCl_2 , 4) $2\ \mu\text{M}$ A23187 + 3 mM CaCl_2 . Los resultados se expresan como porcentajes de los totales de enzimas. Las marcas * y x señalan los valores que difieren del control con $P < 0,05$ y $P < 0,1$, respectivamente.



Debido a que se observa aumento de la LHA por exposición a A23187 aún en ausencia de Ca^{++} extracelular, se consideró importante establecer si, en estas condiciones, el ionóforo produce o no aumento de Ca^{++} citosólico. Con este fin, se utilizó el marcador fluorescente Quin 2-AM. La incubación con este compuesto y los registros de fluorescencia se llevaron a cabo como se describe en la sección 2.5. La Fig. 7 muestra registros típicos de los cambios de fluorescencia (F 339 \rightarrow 492) observados al agregar 3 μM A23187 a una suspensión de células cargadas con Quin. La incubación se realizó en buffer TSE en ausencia (1) y en presencia (2) de 2 mM CaCl_2 . Puede verse que en ambos casos, se produce un aumento brusco de fluorescencia al agregar el ionóforo, el cual es mayor en el caso de las células cargadas con Quin (A) que en las células no cargadas, utilizadas como blanco (B). En estas últimas, el aumento de fluorescencia que se detecta se debe a la fluorescencia propia del A23187, que varía por la presencia de iones bivalentes y por la unión a membranas.

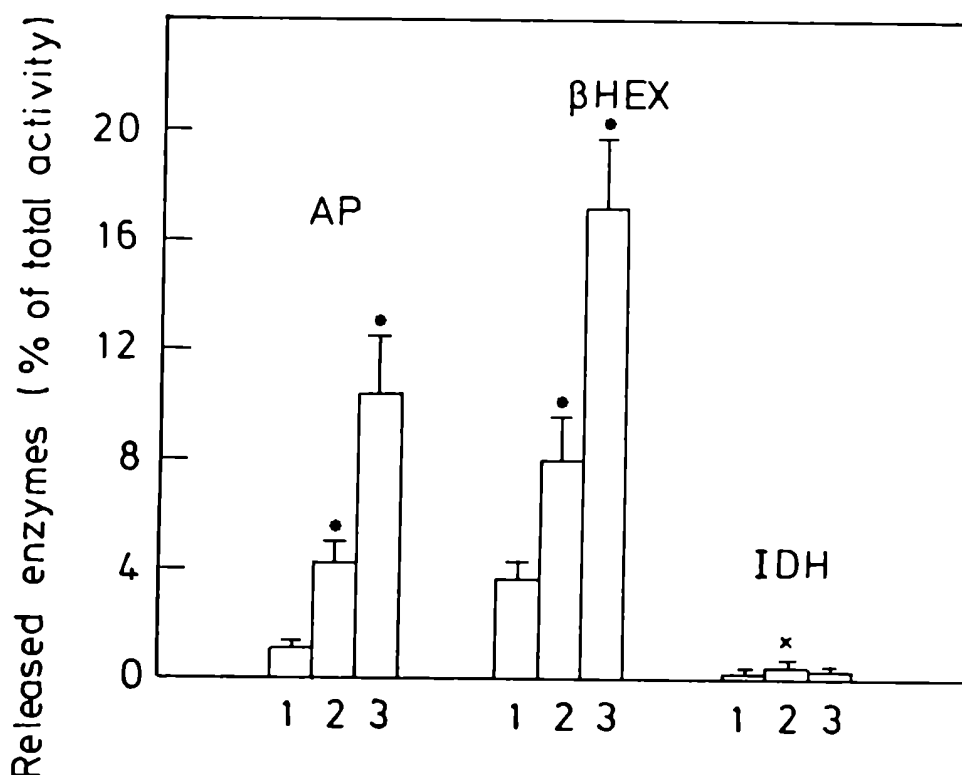
Nótese asimismo que el aumento de fluorescencia en las células cargadas con Quin es más rápido en presencia de Ca^{++} , pero de aproximadamente la misma magnitud que en ausencia de este ion.

Fig. 7. Cambios en la fluorescencia de células cargadas con Quin (A) y células control (B), expuestas a $3 \mu\text{M}$ A23187 a 25°C en buffer TSE (1) o en buffer TSE + 2 mM CaCl_2 (2). La flecha indica el instante en el que se agregó el ionóforo. Los registros de fluorescencia se muestran luego de haber sustraído el nivel correspondiente al momento de la aplicación del ionóforo, a fin de facilitar la comparación de los cambios ocurridos en cada caso. Los niveles marcados como $< 1 \text{ nM}$ Ca^{2+} y 1 mM Ca^{2+} indican puntos de calibración que fueron obtenidos como se describe en la sección 2.5.



Se estudió la acción sobre la LHA de un segundo ionóforo de Ca^{++} , la Ionomicina. La Fig. 8 muestra las actividades extracelulares de AP, Bhex e IDH, obtenidas al exponer una suspensión celular a Ionomicina, en buffer TSE, en presencia y ausencia de 2 mM Ca^{++} . Puede observarse que los resultados son semejantes a los obtenidos con A23187: la Ionomicina estimula la LHA, siendo este efecto más marcado en presencia de Ca^{++} externo. Por otra parte, esta estimulación es selectiva para las hidrolasas ácidas, ya que no se produce, tampoco en este caso, una liberación paralela de IDH. La concentración de Ionomicina requerida para producir la estimulación es, sin embargo, mayor que en el caso del A23187, lo cual puede estar relacionado con su eficiencia como transportador de Ca^{++} .

Fig. 8. Efecto de la incubación con Ionomicina sobre la LHA. Las células se incubaron durante 20 min a 25°C en buffer TSE conteniendo 1) solvente del ionóforo, 2) 80 μM Ionomicina, 3) 80 μM Ionomicina + 2 mM CaCl_2 . Los resultados se expresan como porcentajes de los totales para cada enzima. * y x señalan los valores que difieren del control con $P < 0,05$ y $P < 0,1$, respectivamente.



3.3. Estudio de la relación entre la LHA y la egestión de vacuolas alimenticias.

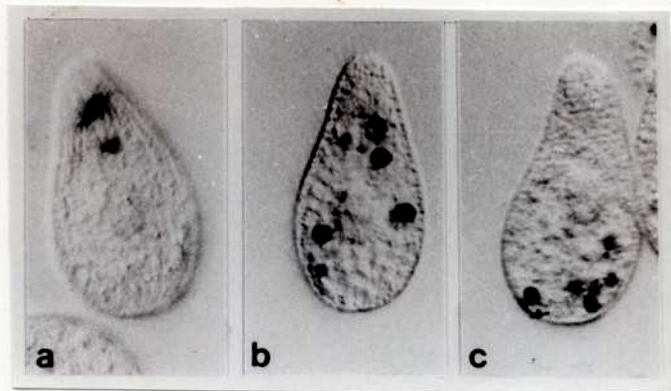
Se investigó este aspecto para analizar la validez de las hipótesis de otros autores, quienes propusieron que la aparición de hidrolasas ácidas en el medio extracelular ocurre por la egestión de vacuolas alimenticias, conteniendo enzimas todavía activas.

Se efectuaron dos tipos de estudios. Por un lado, se investigó la egestión de vacuolas en presencia y ausencia de dibucaína, la cual, según hemos observado, produce estimulación de la LHA. Por otra parte, se comparó la egestión de vacuolas de una cepa salvaje con la de un mutante no secretor de hidrolasas ácidas.

3.3.1. Tratamiento con dibucaína

Se incubaron células de la cepa BIII con una suspensión de tinta china durante 20 min, como se describe en la sección 2.6., con el objeto de marcar las vacuolas alimenticias. Al cabo de este período, las células se transfirieron a un medio sin tinta china, en el que se las incubó por 30 min adicionales. De este modo, se obtienen células con sus vacuolas marcadas cerca del extremo posterior, región donde se encuentra el citoprocto. Gracias a este procedimiento, puede seguirse fácilmente la egestión de vacuolas, determinando el número medio de vacuolas marcadas remanentes por célula, al cabo de distintos tiempos. La Fig. 9 muestra células a los 0 (a) y 20 min (b) de incubación con tinta china y 30 min después de lavar las células y resuspenderlas en medio nuevo sin tinta china (c).

Fig.9. Observación microscópica de células de *T.thermophila* conteniendo vacuolas marcadas con tinta china. Las fotos corresponden a los 0 (a) y 20 min (b) de exposición de las células a una suspensión 0,05% de tinta china y a los 30 min de seguimiento en medio sin partículas de tinta china (c). Nótese en c la acumulación de vacuolas en el extremo posterior de la célula.



Una suspensión celular tratada de este modo fue lavada con 10 mM Tris-HCl, pH 6,0, y las células fueron incubadas durante 15 min a 25°C en este buffer con y sin agregado de 100 y 200 μ M dibucaína, del modo como se describe en la sección 2.4.1. Se determinó el número de vacuolas por célula al comienzo y al final de la incubación y se midió la actividad de cuatro hidrolasas ácidas en los sobrenadantes: AP, β hex, α -glucosidasa y α -manosidasa. La Tabla 2 muestra los valores obtenidos en estas mediciones. Se observa que la dibucaína estimula considerablemente la liberación de estas cuatro enzimas en las dos concentraciones probadas. El número de vacuolas por célula, por otra parte, disminuyó en todos los casos con respecto al valor inicial ($11,3 \pm 0,3$), demostrando que se produjo la egestión de vacuolas durante este período. No hubo diferencias significativas entre los números de vacuolas por célula de las suspensiones tratadas con dibucaína con respecto a los controles, es decir que el aumento en la LHA registrado no fue acompañado por un aumento en la egestión de vacuolas.

Tabla 2. Influencia de la dibucaína en la LHA y la egestión de vacuolas . Las actividades enzimáticas se expresan como mU/ml, definiéndose 1 mU (1 miliunidad) como la cantidad de enzima que produce la liberación de 1 nmol de p-nitrofenol por minuto a 37°C. Para evaluar la egestión de vacuolas se presenta el número medio de vacuolas por célula determinado al finalizar el período de exposición a dibucaína. Este valor al comenzar la incubación fue de $11,3 \pm 0,3$.

	AP	Bhex	α -gluc	α -man	V/cel'
Control	$1,07 \pm 0,04$	$1,12 \pm 0,07$	$1,33 \pm 0,09$	$1,83 \pm 0,10$	$8,3 \pm 0,8$
100 μ M dibuc.	$3,18 \pm 0,27$	$2,50 \pm 0,03$	$4,36 \pm 0,35$	$3,52 \pm 0,14$	$8,9 \pm 0,4$
200 μ M dibuc.	$5,33 \pm 0,11$	$3,16 \pm 0,13$	$7,12 \pm 0,64$	$5,0 \pm 0,19$	$8,98 \pm 0,62$

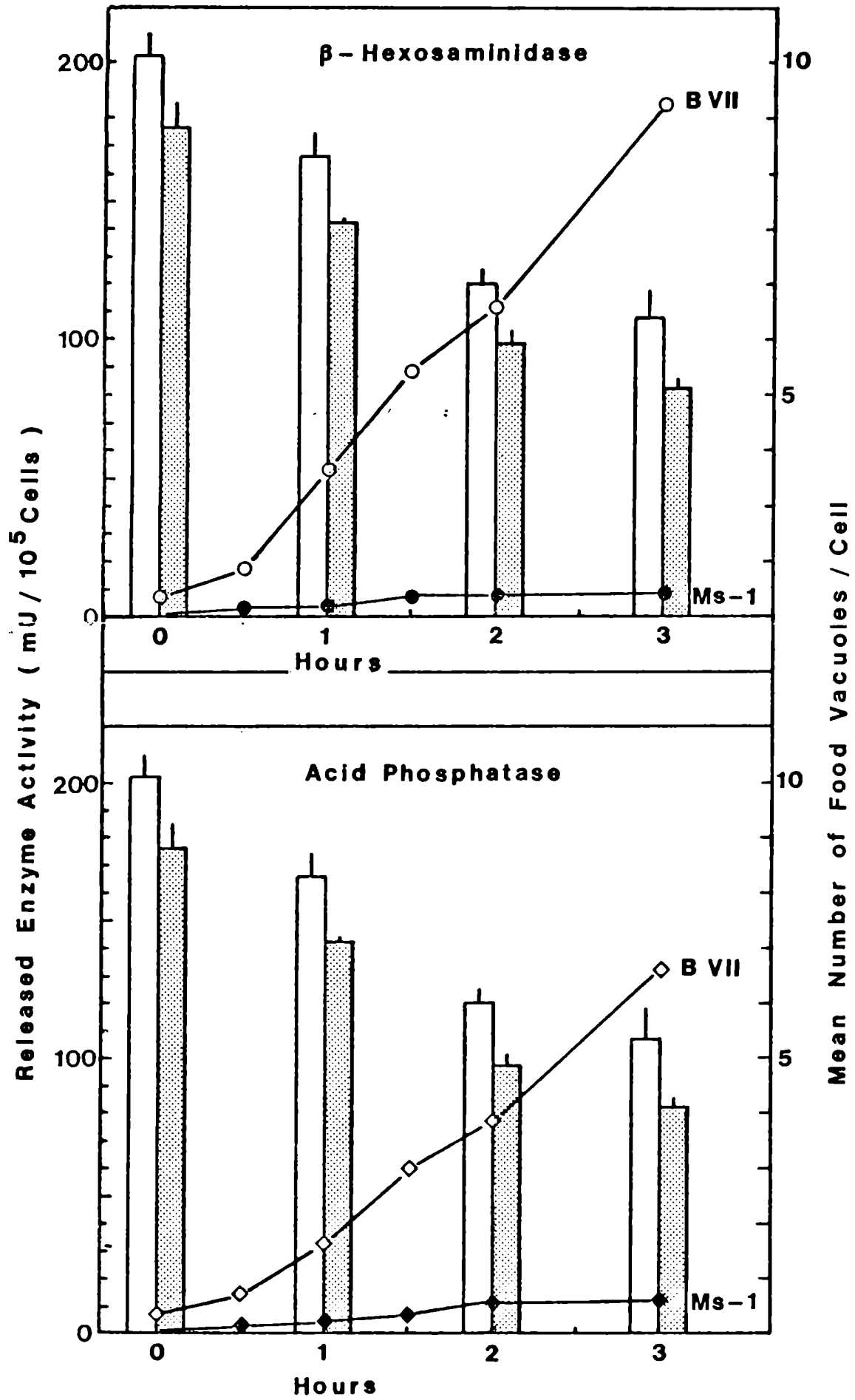
(V/cel= número medio de vacuolas por célula)

La liberación de las cuatro hidrolasas fue significativamente mayor ($P < 0,005$) en las células tratadas con ambas concentraciones de dibucaína. Los números medios de vacuolas por célula, en cambio no difirieron significativamente.

3.3.2. LHA y egestión de vacuolas en la cepa salvaje BVII y en un mutante no secretor de hidrolasas ácidas

Se marcaron las vacuolas de células tipo salvaje BVII y del mutante MS-1 con tinta china, procediendo de igual modo que en el caso anterior. Al cabo del período de seguimiento en medio sin tinta china, cuando las vacuolas marcadas se hallaban concentradas en el extremo posterior, se lavaron las células y se resuspendieron en nuevo medio PPY. Se midieron las actividades AP y Bhex en los sobrenadantes de las suspensiones en muestras extraídas cada 30 min y se determinó el número de vacuolas por célula a las 0, 1, 2 y 3 h de incubación a 30°C. Los datos obtenidos se hallan graficados en la Fig. 10. Los diagramas de barras representan los números de vacuolas por célula y las curvas, las actividades enzimáticas presentes en los sobrenadantes a cada tiempo.

Fig. 10



Puede observarse en la Fig.10 que los números de vacuolas por célula van disminuyendo en función del tiempo, en ambas cepas, indicando la egestión de vacuolas alimenticias. A pesar de que el número inicial de vacuolas fue ligeramente mayor en el tipo salvaje (10 por célula) que en el mutante (9 por célula), ambas cepas liberaron un número similar de vacuolas por unidad de tiempo. En contraste, las actividades AP y Bhex halladas en el medio extracelular de estas dos cepas fueron muy diferentes, ya que MS-1 libera cantidades mínimas de estas hidrolasas, como puede verse en la misma Figura.

3.4. Relación entre LHA y formación de vacuolas

Para estudiar esta relación, se investigó el efecto sobre la LHA de un tratamiento que bloquea la formación de vacuolas alimenticias. Se lavaron células de la cepa BIII con 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, y se incubaron durante 30 y 60 min, a 25°C, en el mismo buffer con y sin agregado de 0,2 M sacarosa. A tiempo 0 se agregó a la mitad de las muestras una suspensión de 0,05% de tinta china para estudiar la formación de vacuolas alimenticias. En la otra mitad, se investigó la LHA. Los resultados se muestran en la Tabla 3, donde se observa que la formación de vacuolas se halla bloqueada por el tratamiento con 0,1 M sacarosa, no así la LHA. En efecto, los valores de actividades AP y Bhex hallados en los sobrenadantes no son significativamente distintos para células tratadas y no tratadas.

· Tabla 3. Efecto de la exposición a 0,1 M sacarosa sobre la LHA y la formación de vacuolas. Las actividades enzimáticas se expresan como mU por cada 10^5 células.

		AP	Bhex	Vac/cel
Control	30 min	16,2±1,8	24,3±2,2	7,5±0,6
	60 min	35,7±3,1	53,4±4,8	10,6±0,8
0,1M sacarosa	30 min	18,0±2,4	25,8±2,6	0,0±0
	60 min	33,4±2,9	52,7±5,4	0,1±0,02

3.5. Relación entre LHA y exocitosis de mucocistos

Se investigó el posible rol propuesto para los mucocistos en la LHA. Con este fin, células de la cepa BIII, lavadas en 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, fueron expuestas a 0,15 M NaCl en el mismo buffer. Este tratamiento produce exocitosis masiva de mucocistos, como se observa en la Fig. 11, que muestra células de Tetrahymena rodeadas de una copiosa secreción de mucocistos descargados, como consecuencia de la exposición a 0,15 M NaCl.

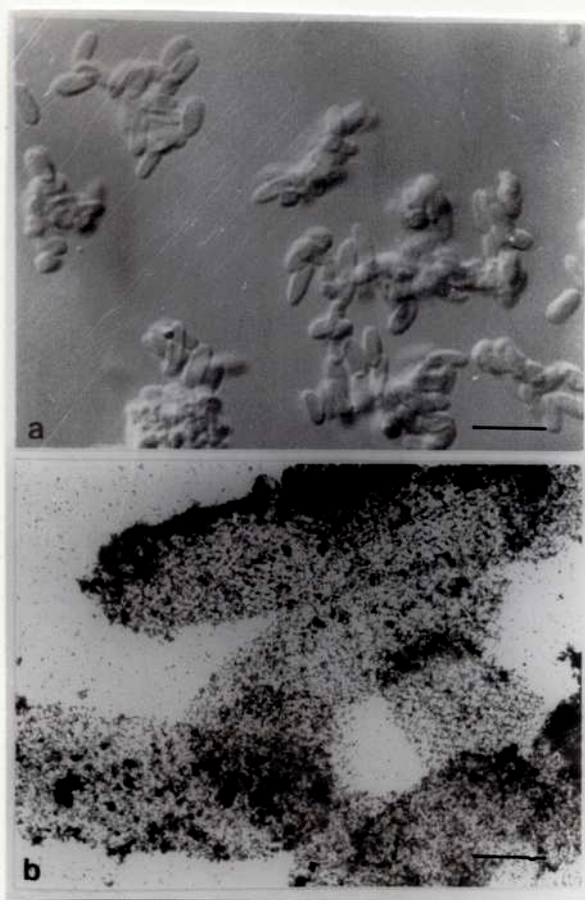
Fig.11. Exposición de Tetrahymena a 0,15 M NaCl. La observación microscópica se realizó con óptica de Nomarski



Luego de 2 min de exposición a NaCl, las células se centrifugaron y se separaron los sobrenadantes para estudiar en ellos presencia de hidrolasas ácidas y de mucocistos. La Fig.12 A muestra un preparado del sobrenadante de células así tratadas, luego de tinción negativa con ferritina cationizada.

Se observan numerosos mucocistos descargados que se reconocen por su forma de barras o cigarrillos. La identidad de estos cuerpos fue confirmada por observación con microscopio electrónico, luego de tinción negativa con uranil acetato (Fig. 11 B). En estos preparados se observó la estructura fibrilar regular característica de las matrices decondensadas de mucocistos. En los sobrenadantes de las células control se observaron mucocistos descargados sólo ocasionalmente.

Fig.11. Mucocistos en el sobrenadante de células de Tetrahymena expuestas a 0,15 M NaCl durante 2 min. Una muestra del sobrenadante se mezcló con igual volumen de 2 mM MgCl₂ y se le practicó una tinción negativa con a) ferritina cationizada o b) uranil acetato. Las barras corresponden a a)11µm y b)1µm.



Las actividades AP y Bhex en los sobrenadantes de las células control y expuestas a NaCl, luego de los 2 min de

exposición se encuentran en la Tabla 4. Las actividades en las células expuestas a NaCl son significativamente menores ($P < 0,005$) que en las células control. En otras palabras, a pesar de la notable estimulación en la exocitosis de mucocistos, la LHA no fue estimulada paralelamente, indicando la independencia de estos dos fenómenos.

Tabla 4. LHA en Tetrahymena luego de una incubación de 2 min en 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, con y sin agregado de 0,15 M NaCl. Las actividades se expresan en mU/ml.

	AP	Bhex
Control	0,83±0,07	0,80±0,09
NaCl	0,55±0,06	0,43±0,04

3.6. Estudios nutricionales

3.6.1. Utilización de fosfatos orgánicos

Para realizar estos estudios se utilizó un medio químicamente definido, preparado como se describe en la sección 2.2.2.2., en el cual se omitieron los fosfatos inorgánicos. Porciones de este medio fueron suplementadas con una de las siguientes fuentes de fosfato, en concentración final de 3 mM: 1) ortofosfato; 2) trimetafosfato; 3) α -glicerofosfato; 4) fosforiletanolamina; 5) fosforilcolina y 6) ácido 2-aminoetil fosfónico. A una porción de medio no se agregó ningún fosfato y fue utilizada como control para evaluar el aporte de fosfato acarreado con el inóculo (muestra 7). Se emplearon la cepa salvaje DIII y el mutante NP1, derivado de ésta. NP1 no forma vacuolas cuando se la cultiva a 38°C por lo cual los experimentos se llevaron a cabo a esta temperatura.

Las células fueron cultivadas en medio definido común (conteniendo fosfatos inorgánicos) y luego transferidas a un

medio carente de fosfatos, en el cual fueron incubadas durante 24 h. Estas células fueron inoculadas en los medios 1 a 7 descritos en una densidad inicial de 5000 células/ml. La transferencia a medio sin fosfatos previa a la inoculación se realizó porque las células tienen reservas internas de fosfatos y con el inóculo se acarrean pequeñas cantidades de estos compuestos, lo cual les alcanza para realizar 5 a 6 duplicaciones en ausencia de fosfato suministrado. Si estas células deprivadas de fosfato durante 24 h se inoculan en un nuevo medio carente de fosfatos, pueden todavía realizar una duplicación más.

A las 18, 42 y 66 h luego de la inoculación en los medios 1 a 7, se sacaron muestras, se calculó el número de duplicaciones y se graficaron los valores como se muestra en la Fig.12. Los resultados indican que Tetrahymena puede aprovechar una variedad de fuentes de fosfato para su crecimiento y multiplicación. El ortofosfato, trimetafosfato y α -glicerofosfato (medios 1,2 y 3, respectivamente) permiten el crecimiento a un ritmo de más de 6 generaciones en 18 h, tanto en el tipo salvaje como en el mutante. La fosforiletanolamina (4) permite un mejor crecimiento en el salvaje que en el mutante y la fosforilcolina (5) sólo puede ser aprovechada por el tipo salvaje. Esto indica que las vacuolas alimenticias deben jugar un rol importante en la utilización de estos dos compuestos. Por su parte, el ácido 2-aminoetilfosfónico (6) no puede ser utilizado por Tetrahymena como fuente de fosfato. Esto está de acuerdo con la elevada resistencia a la hidrólisis que ha sido descrita para este compuesto (68). Las células no crecen si no se les suministra ninguna fuente de fosfato (medio 7).

El crecimiento de la cepa no formadora de vacuolas en medio conteniendo trimetafosfato, α -glicerofosfato o fosforiletanolamina como única fuente de fosfato, está evidenciando una digestión extracelular de estos compuestos por hidrolasas secretadas.

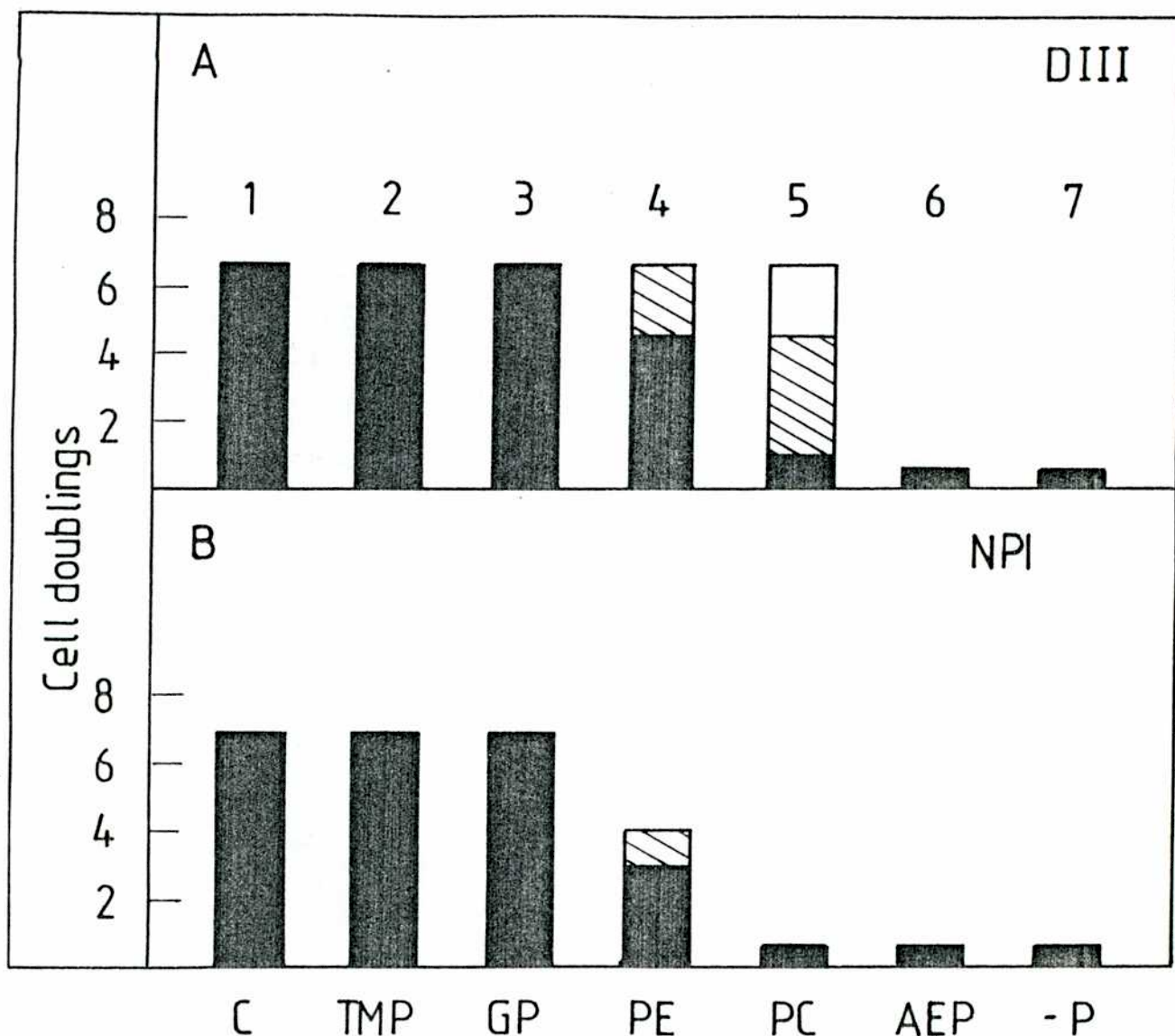


Fig.12. Utilización de varias fuentes de fosfato por *T.thermophila*. Células de la cepa salvaje DIII (A) y del mutante no formador de vacuolas, NPI (B) fueron inoculadas en medio definido preparado sin agregado de fosfatos inorgánicos, conteniendo 1) ortofosfato; 2) trimetafosfato; 3) α -glicero-fosfato; 4) fosforiletanolamina; 5) fosforilcolina; 6) ácido 2-aminoetilfosfónico (un análogo de la fosforiletanolamina pero que tiene un enlace P-C en lugar de P-O-C) y 7) ningún fosfato. La concentración de las fuentes de fosfato fue, en todos los casos, de 3 mM. Los diagramas muestran el número de duplicaciones a las 18 h ■, 42 h ▨ y a las 66 h □.

3.6.2. Crecimiento en medios que imitan condiciones naturales

Se estudió el crecimiento de la cepa salvaje BVII y del mutante no secretor de hidrolasas ácidas MS-1, teniendo como única fuente de nutrientes sustratos complejos como granos de trigo o trozos de tejido animal, a dos valores de pH 5,5 y 7,5. Estos medios fueron preparados como se describe en la sección 2.2.2.3. Las células utilizadas para la inoculación fueron cultivadas por 24 h en PPY. Luego de lavarlas dos veces con agua destilada estéril, fueron inoculadas a una densidad de 5000 células/ml. Se sacaron muestras cada 24 h durante 5 días y se midieron las densidades celulares bajo microscopio, utilizando una cámara de conteo.

Las Fig. 13 y 14 muestran el número de duplicaciones de la cepa BVII utilizando granos de trigo y trozos de carne, respectivamente, como fuentes de nutrientes. Se observa que en ambos casos la multiplicación es ampliamente mayor al valor ácido de pH.

El mutante no secretor, por su parte, es incapaz de crecer en estos medios, tanto a pH 5,5 como a 7,5. Puede, sin embargo formar vacuolas normalmente.

Estos resultados indican que la secreción de hidrolasas es indispensable para la digestión de estas fuentes complejas de nutrientes y su utilización para el desarrollo de las células. Muestran, por otra parte, que esta utilización es más eficiente a pH ácido.

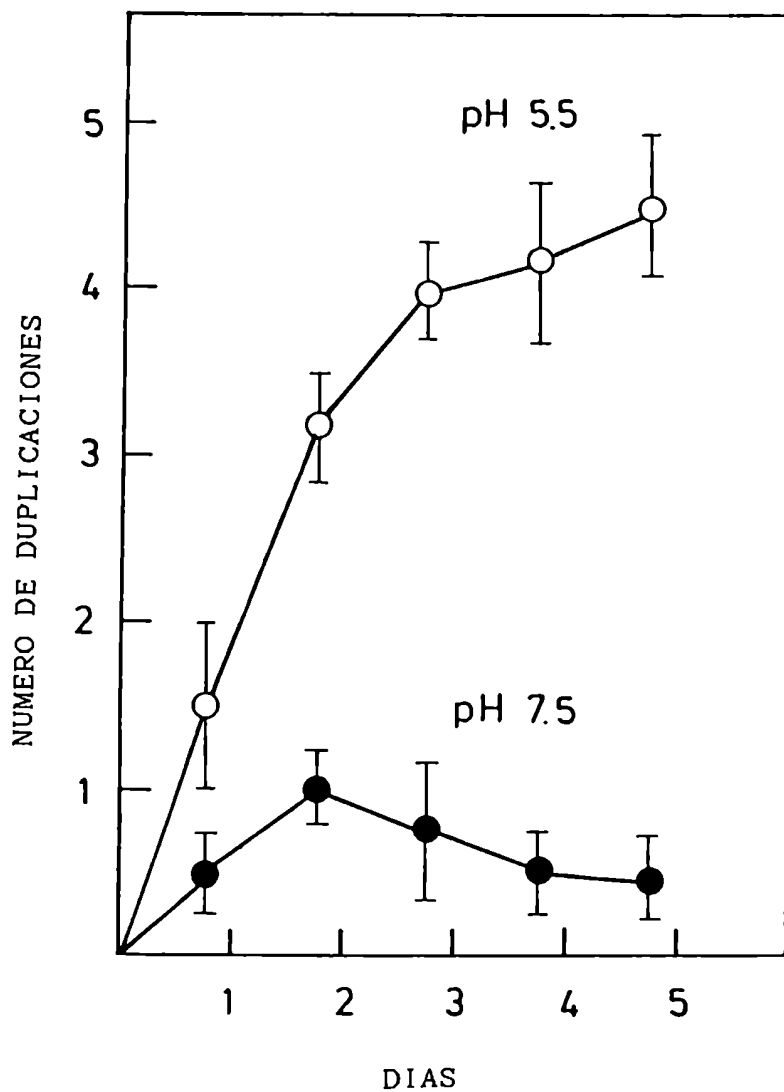


Fig.13. Crecimiento de la cepa salvaje BVII en un medio conteniendo las sales presentes en el medio definido y dos granos de trigo como única fuente nutritiva. El pH del medio fue ajustado a 5,5 o a 7,5 con 1 N HCl o 1 N HOK, respectivamente. La densidad inicial fue de 5000 células/ml y la temperatura de cultivo fue de 30°C.

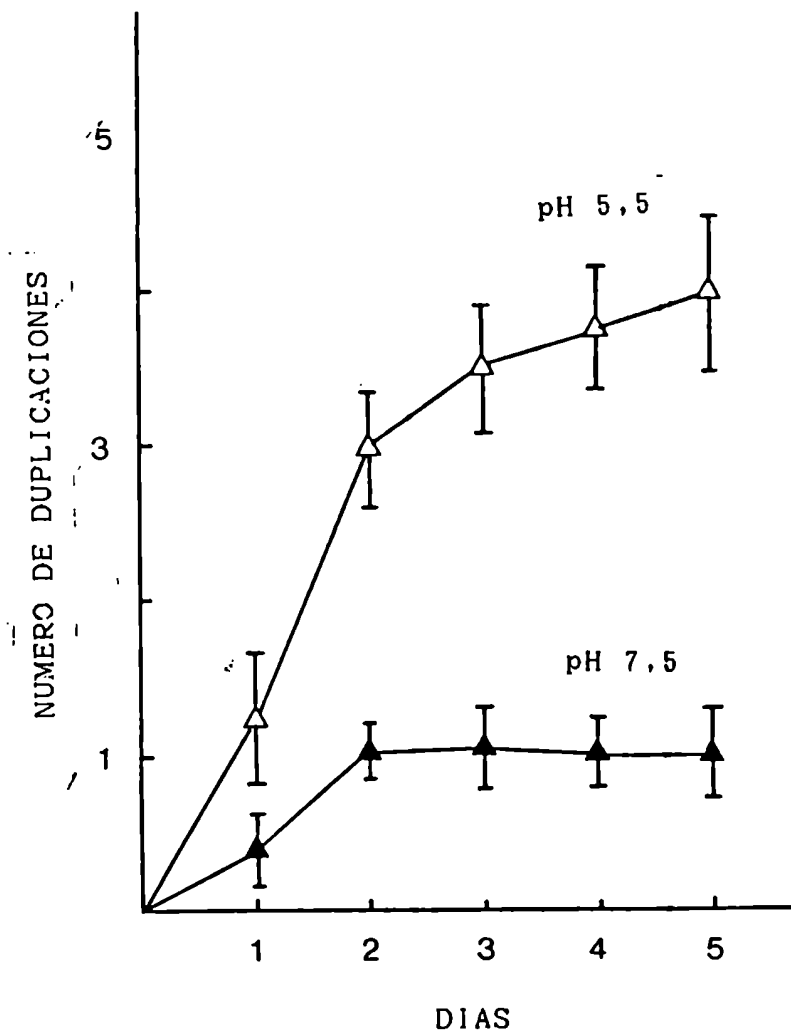


Fig.14. Crecimiento de la cepa BVII teniendo como única fuente nutritiva un trozo de carne de cerdo. Las condiciones fueron las mismas que las del experimento anterior.



3.7. Actividades enzimáticas sobre la superficie celular de T.thermophila

3.7.1. Detección

Las actividades enzimáticas presentes sobre la superficie celular son aquéllas actividades ligadas a células intactas, capaces de hidrolizar sustratos que no permean la membrana plasmática. Este tipo de ensayo ha sido utilizado por otros autores para la detección de estas enzimas en Leishmania donovani (88) y también en otros organismos. El método se basa en medir la hidrólisis del sustrato en suspensiones celulares enteras y en los correspondientes medios una vez eliminadas las células por centrifugación. La actividad de superficie es la diferencia entre ambas actividades (actividad total - actividad del sobrenadante). Debido a que la secreción de enzimas en Tetrahymena es un proceso relativamente rápido, van acumulándose cantidades apreciables de enzimas en el medio durante los tiempos de incubación requeridos para determinar las actividades de superficie. Estas variaciones en la actividad extracelular deben ser tomadas en consideración al calcularse la actividad sobre la superficie.

3.7.2. Modelo utilizado para el cálculo de las actividades de superficie en suspensiones celulares

Este modelo se basa en las siguientes observaciones experimentales:

1) Las células secretan hidrolasas al medio a un ritmo constante durante períodos de tiempo (al menos 6h) que exceden ampliamente los períodos en los que se miden las actividades de superficie (aproximadamente 1h). Esto significa que las actividades enzimáticas acumuladas en el medio extracelular crecen linealmente con el tiempo. Es decir:

$$A_m = A_o + R_s.t \quad (1)$$

donde A_m es la actividad extracelular al tiempo t , A_o es la

actividad presente a tiempo 0 y R_s es el ritmo de secreción de hidrolasas al medio.

2) La actividad presente sobre la superficie de las células también es constante durante el período de tiempo estudiado.

3) El número de células no se altera durante el tiempo que duran los experimentos, lo cual se cumple cuando se utilizan cultivos en fase estacionaria temprana.

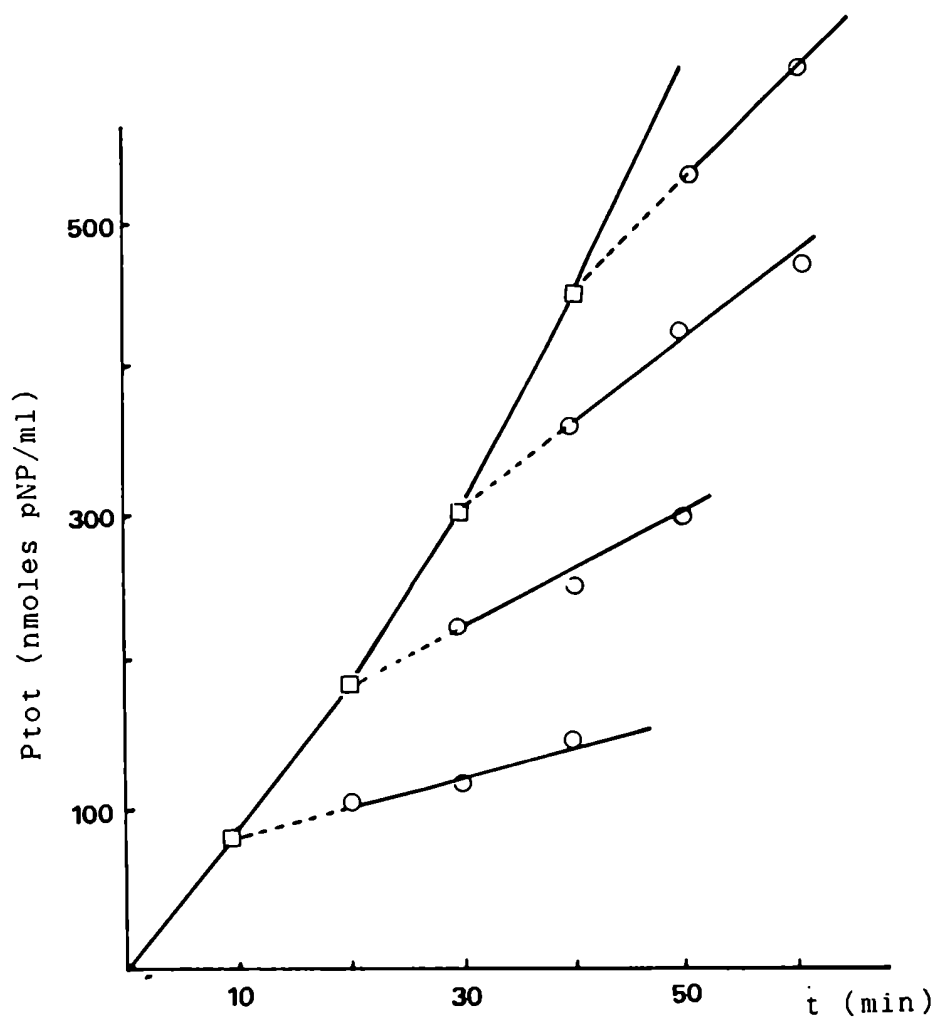
Dadas estas condiciones, se analizará lo que ocurre al añadir un sustrato no permeante en concentraciones de saturación ($[S] \gg K_M$), como 20 mM p-nitrofenilfosfato (pNP), para la fosfatasa ácida, a una suspensión celular que ha sido lavada y resuspendida en medio PPY ajustado a pH 6,0. El producto total formado (P_{tot}), en este caso, pNP, en cada momento, será la suma del producto formado por la enzima presente en el medio P_m más el formado por la enzima de superficie (P_{sup}):

$$P_{tot} = P_{sup} + P_m \quad (2)$$

P_{tot} puede medirse a cada tiempo tomando muestras del cultivo, al cual se añadió el sustrato, y midiendo el producto formado. Para esto, se centrifugan las muestras brevemente y se mezcla una alícuota del sobrenadante con buffer glicina, pH 10,4, como se indicó en la sección 2.8. Leyendo la absorbancia de estas muestras a 410 nm, se obtiene un gráfico como el que se muestra en la Fig. 15.

Fig.15. Producción de p-nitrofenol (pNP) en función del tiempo por una suspensión celular de *T.thermophila*,BIII, incubada en medio PPY conteniendo 20 mM p-nitrofenilfosfato.

□—□ : P_{tot} ; ○—○: P_m: producción de pNP en función del tiempo en sobrenadantes libres de células, obtenidos a los 10, 20, 30 y 40 min de incubación de la suspensión celular con el sustrato. La pendiente de cada recta así determinada es la actividad fosfatasa ácida presente en el medio al tiempo en que fue obtenido cada sobrenadante.



Por definición, la actividad es producto formado por unidad de tiempo: $A = \frac{dP}{dt}$

Por consiguiente, derivando los términos de la ecuación 2 respecto del tiempo:

$$\frac{dP_{tot}}{dt} = A_{tot} = A_{sup} + A_m \quad (3)$$

Reemplazando A_m de acuerdo a la ecuación 1:

$$\frac{dP_{tot}}{dt} = A_{sup} + A_o + R_s \cdot t$$

En estos términos, por haber sido las células lavadas, A_o , la actividad en el medio extracelular al comienzo del experimento, se desprecia, por ser mucho menor que A_{sup} ($A_o < 0,01 A_{sup}$).

$$\frac{dP_{tot}}{dt} = A_{sup} + R_s \cdot t$$

$$\text{luego,} \quad dP_{tot} = A_{sup} dt + R_s t dt$$

Integrando entre 0 y t:

$$\int_0^P dP = \int_0^t A_{sup} dt + \int_0^t R_s t dt$$

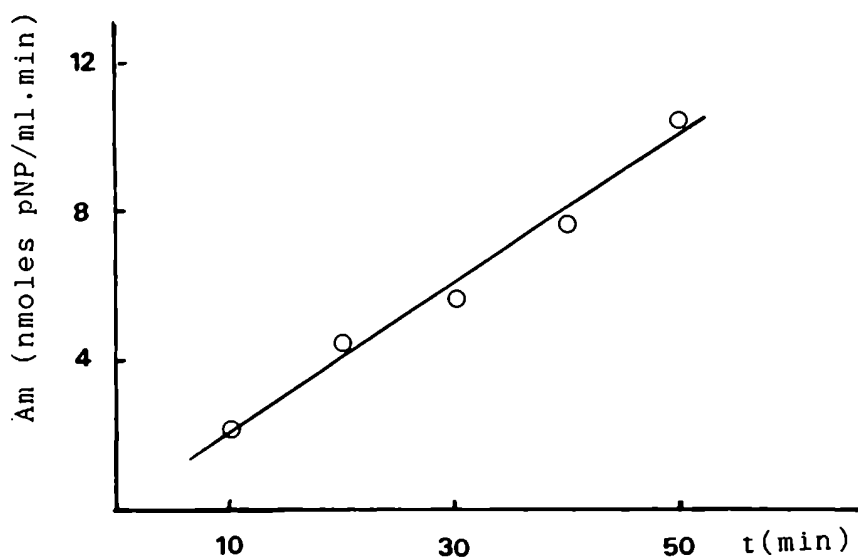
Es decir,

$$P_{tot} = A_{sup} \cdot t + \frac{1}{2} R_s t^2 \quad (4)$$

Se observa que, en esta ecuación, la enzima de superficie contribuye un término lineal y la secretada, un término cuadrático. Los parámetros de este término cuadrático pueden estimarse separadamente, ya que se puede determinar la tasa de secreción, midiendo las actividades presentes en el medio extracelular a distintos tiempos. Esto puede hacerse simplemente extrayendo muestras de la suspensión celular, centrifugándolas para eliminar las células y siguiendo la formación de producto en función del tiempo en los sobrenadantes libres de células. En la Fig. 15 se muestra un experimento

en el cual, además del producto total formado por la suspensión celular entera, se midió la actividad presente en muestras de medio extracelular obtenidas cada 10 min. Se comprueba que, en cada uno de los sobrenadantes, la formación de producto varía linealmente con el tiempo, tal como corresponde a condiciones de saturación de la enzima. Las pendientes de estas rectas son las actividades enzimáticas presentes en el medio a los distintos tiempos. Estas actividades se representan luego graficamente en función del tiempo, originando una recta cuya pendiente es el ritmo de secreción R_s . Esto se muestra en la Fig. 16.

Fig.16. Ritmo de secreción de la fosfatasa ácida. Las pendientes obtenidas en la Fig.15 (actividades en el medio extracelular) se grafican en función del tiempo. Se obtiene así una recta, cuya pendiente es el ritmo de secreción (R_s) para esta enzima.



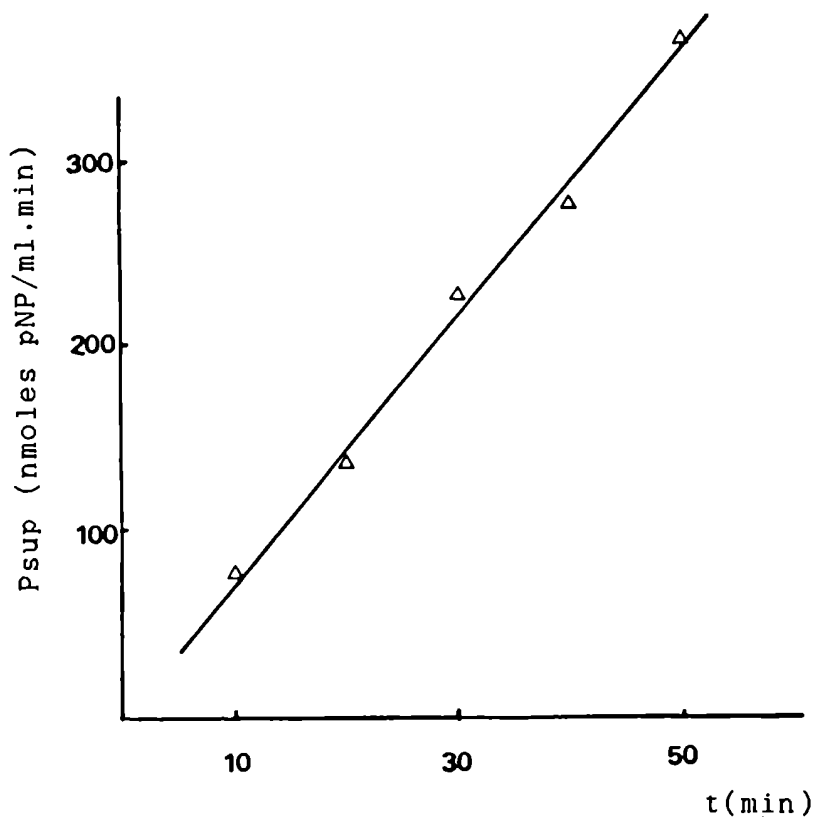
Con el valor de R_s obtenido, es posible entonces calcular el término $\frac{1}{2} R_s t^2$ de la ecuación 4 para distintos tiempos. Pueden luego hallarse los valores del término $A_{sup} \cdot t$ a los distintos tiempos, por sustracción entre los valores de P_{tot} , leídos a partir de alícuotas enteras del cultivo (ver Fig.15), y los valores correspondientes de $\frac{1}{2} R_s \cdot t^2$.

Como predicción del modelo, los valores de $A_{sup} \cdot t$ (= P_{sup}) obtenidos, graficados en función del tiempo, deben caer en una recta cuya pendiente es, precisamente, A_{sup} . Esto se ha comprobado experimentalmente, como se muestra en la Fig.17, verificando la validez del modelo utilizado.

Cabe añadir que un método alternativo para la medición de la actividad de superficie sería la determinación de la pendiente de la curva P_{tot} en función del tiempo (Fig.15) para un determinado tiempo. Esta pendiente es dP_{tot}/dt . Si se determina la actividad en el medio extracelular para el mismo tiempo, puede calcularse la actividad en la superficie usando la ecuación 3: $A_{sup} = \frac{dP_{tot}}{dt} - A_m$

Este último método, sin embargo, involucra determinar gráficamente la pendiente de una curva no lineal y, por tanto, es menos preciso que el método desarrollado utilizando las ecuaciones integradas que se describió anteriormente. En éste, sólo se requiere determinar la pendiente de líneas rectas.

Fig.17. Cálculo de la actividad fosfatasa ácida presente sobre la superficie celular. Se grafican los valores de $A_{sup} \cdot t$ (= P_{sup}), en función del tiempo. Estos valores resultan de la diferencia entre P_{tot} y $\frac{1}{2} R_s \cdot t^2$ para cada tiempo. Los puntos caen dentro de una recta cuya pendiente es A_{sup} .



3.7.3. pH óptimo de la actividad fosfatasa ácida de superficie

Utilizando el método basado en las ecuaciones integradas descripto más arriba, se investigó la variación con el pH de la actividad fosfatasa ácida de superficie (APsup). Para ello, se preparó medio PPY ajustado a pH 5,5, 6,5 y 7,5, luego de habersele agregado un buffer 10 mM histidina (pK 6,1)/ 10 mM Tris (pK 8,1) (concentraciones finales). Se determinó la actividad APsup en suspensiones de la cepa BIII resuspendidas en cada uno de estos medios. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 5. Se observa que esta actividad aumenta considerablemente al disminuir el pH.

La observación microscópica de las células mostró que éstas se hallaban en perfecto estado a los tres valores de pH. No pudieron hacerse mediciones a pH 5 o valores inferiores, pues estos pH tienen efectos deletéreos sobre células no adaptadas.

Tabla 5. Variación de la actividad fosfatasa ácida de superficie (APsup) con el pH. Se utilizaron células de la cepa BIII cultivadas durante 24 h en medio PPY a 37°C. Para la determinación de la APsup, las células se lavaron y resuspendieron en medio PPY conteniendo 10 mM histidina/10 mM Tris, ajustado a los distintos valores de pH.

	pH 5,5	pH 6,5	pH 7,5
APsup (nmol pNP/min 10 ⁵ cels)	4,4±0,6	2,7±0,4	1,1±0,1

3.7.4. Variación de la actividad APsup con la edad del cultivo

Se midió el ritmo de secreción Rs y la fosfatasa ácida de superficie, APsup, en suspensiones celulares provenientes de cultivos a 37°C de 24, 48 y 72 h en PPY. Se inocularon medios tres días sucesivos, de tal forma de medir las actividades de los tres cultivos al mismo tiempo. En la Tabla 6 se muestran los resultados obtenidos en este experimento. Nótese que tanto el ritmo de secreción de fosfatasa ácida como la actividad de esta enzima sobre la superficie celular aumentan con la edad del cultivo.

Tabla 6. Variación del ritmo de secreción de fosfatasa ácida (Rs) y de la actividad de esta enzima sobre la superficie celular (APsup) con la edad del cultivo. Se utilizaron células de la cepa BIII cultivadas y resuspendidas en medio PPY a 37°C.

	Edad del cultivo		
	24h	48h	72h
Rs	0,24±0,04	0,36±0,06	0,54±0,08
APsup	3,8 ±0,68	5,7 ±0,74	11,5 ±1,84

Rs se expresa como nmoles pNP/min. 10^5 cels y Asup como nmoles pNP/min 2 . 10^5 cels

3.7.5. Efecto sobre APsup y Rs de la incubación prolongada en medio no nutricio

En este experimento, células de un cultivo de BIII de 24 h fueron lavadas y resuspendidas en 10 mM Tris-HCl, pH 7,4, e incubadas en este buffer a 37°C durante 12h. Previo a la incubación, una parte del cultivo se resuspendió en nuevo medio PPY, ajustado a pH 6,0, y se determinaron en esta suspensión el ritmo de secreción de AP y la actividad AP de superficie del modo ya descrito.

Luego del incubar el resto del cultivo durante 12 h en buffer Tris, las células se lavaron y transfirieron a 10 mM histidina, pH 6,0, y se determinaron los valores de Rs y APsup en esta suspensión. Los resultados están representados en la Tabla 7 donde puede observarse que, al cabo de las 12 h en medio no nutricio, el ritmo de secreción de AP ha disminuido considerablemente. Cabe destacar que, durante ese tiempo, un 70% de la actividad AP presente en los homogenatos al comienzo del experimento se ha perdido por secreción al medio extracelular. Si estas células son transferidas a medio PPY, se registra a las 2h un aumento en el contenido total de AP en las células y, paralelamente, se eleva el ritmo de secreción de esta enzima. Esto ocurre antes de iniciarse la división celular.

La actividad AP presente sobre la superficie celular, aunque aún detectable, también está disminuida al cabo de las 12 h de incubación en medio no nutricio, como puede verse en la Tabla 7.

Tabla 7. Efecto de 12 h de incubación en 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 sobre la actividad AP de superficie y el ritmo de secreción de esta enzima.

	Previo	Luego de 12h en 10 mM Tris-HCl, pH 7,4
Rs	0,26±0,028	0,06±0,011
APsup	4,10±0,49	1,17±0,22

3.7.6. Otras actividades enzimáticas presentes sobre la superficie celular

Utilizando los mismos procedimientos descritos para la fosfatasa ácida se investigó la presencia sobre la superficie celular de Tetrahymena de otras dos hidrolasas ácidas: β -hexosaminidasa y fosfodiesterasa, utilizando como sustratos, p-nitrofenil-N-D-glucosaminido y p-nitrofenilfosforilcolina, respectivamente. Se utilizaron cultivos de 24h a 37°C de la cepa BIII. Los resultados se muestran en la Tabla 8, donde se observa que estas dos actividades se hallan representadas sobre la superficie celular.

Tabla 8. Actividad β -hexosaminidasa (β hex) y fosfodiesterasa presentes sobre la superficie celular de Tetrahymena

	β hex	fosfodiesterasa
Asup (nmoles pNP/10 ⁵ cels.min)	0,43±0,064	2,5±0,4

La observación de actividad β hex sobre la superficie de Tetrahymena coincide con los resultados de Tiedtke quien detectó la presencia de esta enzima utilizando técnicas de inmunocitoquímica con anticuerpos específicos contra la enzima purificada a partir de medio extracelular (Tiedtke, A. J. Protozool. 30, 44A, 1983).

SCUSIO

La existencia de enzimas lisosomales es un rasgo universal en células animales, incluyendo al ciliado Tetrahymena (5). Estas enzimas también son liberadas al medio extracelular por este organismo (47,48,59,69). En un principio, la presencia de hidrolasas en el medio fue considerada como una consecuencia inevitable de la exocitosis de lisosomas secundarios, es decir, debido a la egestión de vacuolas digestivas conteniendo enzimas aún activas. Además, se pensaba que dichas enzimas carecían de significado biológico, debido a la gran dilución que sufrirían en medios naturales (47,49,70). Los hallazgos presentados en esta Tesis indican que la discusión sobre estos temas debe ser reabierta: las enzimas liberadas, junto con otras presentes sobre la superficie celular, para las que proponemos el término colectivo de exoenzimas, pueden jugar importantes roles en la biología de Tetrahymena. Estas conclusiones son probablemente también válidas para otros eucariotas inferiores, incluyendo protozoos parásitos, como Entamoeba histolytica y Trypanosoma cruzi.

En primer lugar, se ha sentado sobre bases firmes el concepto de la liberación de hidrolasas ácidas (LHA) en T.thermophila como un auténtico proceso secretorio, descartándose que este fenómeno sea consecuencia de una pérdida generalizada de componentes celulares. Es un hecho bien establecido que las vesículas secretorias de las células eucariotas responden a un aumento en la concentración de Ca^{++} citoplásmico fusionándose con la membrana plasmática y volcando su contenido al espacio extracelular. En este proceso, no ocurre pérdida de elementos del citoplasma (71,72) En esta Tesis, utilizando la sonda fluorescente Quin 2, se demuestra que el ionóforo A23187 provoca un aumento del Ca^{++} citoplásmico. Este ionóforo, en las mismas condiciones, estimula considerablemente la LHA, siendo este efecto específico para las hidrolasas ácidas, ya que no se observa pérdida de la enzima citosólica isocitrato deshidrogenasa. Resultados similares se observan con otro ionóforo de Ca^{++} , la

Ionicina. Estas observaciones son una fuerte indicación que la LHA tiene lugar por exocitosis, es decir, que una población de lisosomas en T.thermophila tiene las propiedades características de las vesículas secretorias de las células eucariotas. Esta aseveración es coherente con la observación de Müller sobre la correlación existente entre la LHA y la desaparición de una población de lisosomas de alta densidad en los correspondientes homogenatos (48). Hemos efectuado estudios de microscopía electrónica para la detección de figuras exocitóticas. Sin embargo, no se las ha podido demostrar por el momento. Esto puede ser debido a que, precisamente por su alta densidad, que sugiere una elevada concentración de enzimas, la liberación de unos pocos lisosomas signifique un alto nivel de actividades enzimáticas extracelulares. Por otra parte, el fenómeno puede ser extremadamente rápido, lo cual contribuiría a dificultar su detección morfológica. Como hemos señalado, los sacos parasomales son sitios de activa endocitosis, proceso que, por ser relativamente lento, es fácilmente observado en secciones del ciliado. A nivel de los sacos parasomales, la capa ectoplásmica, que separa la película (sistema de membranas externas) del citoplasma, está reducida o no existe (9). Esta característica hace que los sacos parasomales puedan ser considerados como sitios posibles también para la exocitosis. En este sentido, estas estructuras, que se hallan por delante de cada cilia, podrían ser comparables a los bolsillos flagelares encontrados en protozoos flagelados, como Trypanosoma cruzi, a nivel de los cuales se ha documentado la liberación de fosfatasa ácida, como asimismo, procesos endocitóticos (74).

Como se muestra en la sección 3.2., el A23187 provoca aumento del Ca^{++} libre citoplásmico, aún cuando no hay Ca^{++} extracelular disponible. En este caso, el ionóforo podría actuar liberando Ca^{++} de reservorios internos, como el retículo endoplásmico o los sacos alveolares (36). Nozawa (75) ha mostrado que microsomas obtenidos de Tetrahymena son, en efecto, capaces de acumular Ca^{++} cuando se les suministra

ATP y que este ion puede ser liberado por exposición a A23187.

La LHA surge, por otra parte, como un proceso celular independiente, al demostrarse que está desvinculado de otros eventos secretorios. Los experimentos que aquí se presentan demuestran categóricamente que la LHA es esencialmente independiente de la secreción de mucocistos y de la egestión de lisosomas secundarios, a través del citoprocto. Otros autores habían observado previamente que la LHA era independiente de la formación de vacuolas (48,55), lo cual coincide con lo documentado en este estudio, utilizando diferentes métodos. La independencia de la LHA de la liberación de mucocistos y de la egestión de vacuolas no había sido analizada experimentalmente en ningún trabajo previo. Es importante señalar que la exocitosis de mucocistos y la formación y egestión de vacuolas son los procesos más importantes a través de los cuales recicla la membrana plasmática de Tetrahymena. Estos procesos son esencialmente normales en el mutante MS-1 que, sin embargo, no libera hidrolasas al medio. Este resultado indica que la LHA no es mera consecuencia del reciclado de membranas. En otras palabras, el reciclado de la membrana plasmática no es condición suficiente para la LHA. Esta situación es distinta de la propuesta para Acanthamoeba castellani por Hohman y Bowers (76). En síntesis, la LHA, en Tetrahymena al menos, debe ser vista, a partir de nuestros resultados, como un fenómeno celular por derecho propio.

En este estudio también se documenta la presencia de hidrolasas sobre la superficie celular de Tetrahymena. Estas enzimas tienen pH óptimo ácido y aumentan con la edad del cultivo, lo que también ocurre con las enzimas secretadas. Si las células son mantenidas en medio no nutritivo, disminuye el ritmo de secreción de enzimas y también disminuye la actividad observada sobre la superficie. Esta correlación entre actividades secretadas y actividades de superficie sugieren una vinculación entre ambas: las enzimas secretadas podrían provenir, en parte, del pool de superficie, por disociación de

un complejo enzima-receptor, como el mecanismo que existe en células de mamíferos (60). Esto sería consecuencia de la llegada a la superficie de vesículas (lisosomas secretorios) conteniendo enzimas libres en su interior, así como también asociadas a receptores ubicados hacia el interior de las vesículas. Aún después de prolongada permanencia en medio no nutritivo, la liberación de enzimas y, especialmente, la presencia de enzimas sobre la superficie permanecen en valores detectables. Las enzimas de superficie, en contraste con las secretadas, no se diluyen en el medio y dan lugar al clivaje de sustratos en íntima vecindad con los sistemas de transporte de la membrana. Estos hechos confieren particular importancia a las enzimas de superficie en la biología de este ciliado.

Es posible demostrar un rol efectivo para las exoenzimas en la nutrición de Tetrahymena? Nuestro enfoque experimental, utilizando medios sintéticos químicamente definidos y líneas mutantes con defectos funcionales seleccionados, nos permite contestar nítidamente esta pregunta. Así, hemos hallado que el mutante NP1 puede crecer y multiplicarse en medios en los cuales se le suministran ésteres orgánicos de fosfato como única fuente de fosfato para su desarrollo. Dado que estos ésteres no permean la membrana celular, y que esta línea de mutantes, por no formar vacuolas, solamente puede incorporar nutrientes a través de la membrana, el resultado obtenido implica que los ésteres han debido ser hidrolizados fuera de la célula previo a su incorporación y que esta digestión extracelular ha ocurrido a una velocidad suficiente como para dar lugar al rápido crecimiento de la célula. Es decir, que la actividad de la exoenzima fosfatasa ácida es suficientemente alta como para resultar decisiva en una situación en la que las alternativas son el crecimiento y la proliferación o la muerte por inanición.

Otros resultados experimentales apoyan estas conclusiones. Así, en medios que imitan condiciones naturales en los cuales las células, para crecer, deben poder utilizar sustratos

orgánicos complejos, como una semilla de trigo o un fragmento de tejido animal, el crecimiento es siempre notablemente más rápido cuando el pH del medio es 5,5, contrastando con lo que se observa a pH 7,5. La explicación más probable de este resultado es la mayor actividad de las exoenzimas a valores bajos de pH. Más aún, la importancia de las exoenzimas es señalada por el hecho de que el mutante no secretor de hidrolasas, MS-1, es incapaz de crecer en estos medios complejos.

En la Naturaleza, como organismo de vida libre, Tetrahymena tiende a encontrarse y crecer en número en ambientes ricos en material orgánico. Esto ha sido demostrado por Leick (77), quien documentó acabadamente el comportamiento quimiotáctico de estos ciliados. Este comportamiento tenderá a concentrar a las células dispersas. Por otra parte, Tetrahymena puede exhibir tiempos de generación extremadamente cortos, de hasta menos de 2 h (78), siendo así la célula animal de crecimiento más rápido conocido. Esto asegura una rápida elevación de la densidad de ciliados en un microambiente natural nutricionalmente adecuado. En estas condiciones, las células pueden aunar sus exoenzimas, dando lugar a actividades enzimáticas efectivas. Este aspecto de Tetrahymena se asemeja a la estrategia de "manada de lobos" mostrada por las myxobacterias (79). Es de interés destacar que, en los cultivos de Tetrahymena las células normalmente no se hallan dispersas en el volumen disponible, sino que se encuentran formando pequeños grupos. En éstos, las células nadan vigorosamente pero permanecen agrupadas en cúmulos estables (80). Tal comportamiento debe necesariamente dar lugar a concentraciones locales elevadas de exoenzimas, especialmente en lo que se refiere a actividades sobre la superficie. La formación de grupos en cultivos de Tetrahymena ha sido descrita por diversos autores (80,81,82) que, sin embargo, no han formulado explicaciones en lo que se refiere a su valor adaptativo. En esta Tesis se propone que este rasgo permite un mejor aprovechamiento de las exoenzimas en Tetrahymena.

Existen otros datos que pueden ayudar a apreciar el rol que pueden desempeñar las exoenzimas en la ecología de *Tetrahymena*. Eisen y Tallan (83) observaron que una proteasa extracelular de propiedades semejantes a la papaína cliva anticuerpos anti-*Tetrahymena* cuando las células son expuestas a los mismos. Este clivaje conduce a la formación de fragmentos univalentes, perdiendo así las inmunoglobulinas su capacidad inmovilizante. Esta proteasa parece estar presente tanto en el medio extracelular como sobre la membrana plasmática. Los mencionados autores han sugerido que éste puede ser un mecanismo natural de defensa en células parasitarias. Por otra parte, en trabajos no comprendidos en esta Tesis, hemos hallado que *Tetrahymena* secreta un sistema de enzimas lipolíticas al medio extracelular (84,85,86). Una de estas enzimas, con actividad fosfolipasa C, está asociada a actividad citolítica, mostrada por su capacidad de hemolizar glóbulos rojos de carnero (85). Es notable que en el mismo medio en el que rápidamente son destruidos los eritrocitos, las células de *Tetrahymena*, que no presentan ningún revestimiento o cobertura de su membrana plasmática, puedan crecer y multiplicarse normalmente. Hemos propuesto (87) que, en este aspecto, es decisiva la presencia de un tipo especial de fosfolípidos, los fosfonolípidos, que se encuentran altamente enriquecidos en la membrana externa de este ciliado (27). Una característica peculiar de estos compuestos es precisamente su elevada resistencia a la hidrólisis enzimática por fosfolipasa C (24). Este rasgo destaca la profunda adaptación de *Tetrahymena* a la LHA, ya que su particular membrana plasmática puede ser considerada como una coadaptación a la secreción de hidrolasas. Esta constituiría un sistema de ataque y defensa mediante el cual *Tetrahymena* podría lisar otras células siendo ellas mismas resistentes.

Las exoenzimas probablemente desempeñen un importante rol en el parasitismo, coadyuvando en la invasión y también en la


nutrición de Tetrahymena en su relación con sus hospedadores. Estos son especialmente larvas acuáticas de insectos y, en muchos casos, la infección conduce a la destrucción del organismo infectado (30).

Otros protozoos parásitos, como Leishmania donovani (88) y Trypanosoma cruzi (89), llevan actividades hidrolíticas sobre su superficie. En el caso de Trypanosoma cruzi, la fosfatasa ácida de superficie puede jugar un rol crucial en la nutrición ya que estos flagelados son parásitos intracelulares y deben encontrar la glucosa y otros nutrientes clave, predominantemente como ésteres de fosfato, que deben ser hidrolizados para poder ser incorporados (90). En forma similar, las membranas de Leishmania poseen 3' y 5' nucleotidasas, las que pueden liberar purinas esenciales para el crecimiento de este organismo a partir de los nucleótidos del huésped (91). Se han encontrado exoenzimas en Acanthamoeba castellani (76) y Entamoeba histolytica (92). Estas enzimas pueden ser importantes en la patogenicidad de estos organismos. Parte de los conceptos discutidos para Tetrahymena probablemente sean válidos, también, para el mixomicete Dictyostelium discoideum un organismo que también libera cantidades considerables de exoenzimas (93).

Esta Tesis demuestra la utilidad de Tetrahymena como modelo para estudios en biología celular. Son especialmente importantes la facilidad con que pueden obtenerse mutantes afectados en funciones específicas y también la capacidad del ciliado de crecer en medios sintéticos perfectamente definidos. Las conclusiones obtenidas trascienden el marco de la especie, dando indicios útiles sobre fenómenos similares de la biología de otros organismos eucarióticos inferiores.



Mónica O. Jacobsen de Florin-Christensen



Leif Rasmussen, dr. phil.

Director de Tesis

1. Levine, N.D. & Corliss, J.O. J. Protozool. 27: 37-58, 1980.
2. Nanney, D.L. & McCoy, J.W. Trans. Am. Microsc. Soc. 95: 664-682, 1976.
3. Corliss, J.O. Parasitology 43: 49-87, 1953.
4. Corliss, J.O. Parasitology 50: 111-153, 1960.
5. Elliott, A.M. & Kennedy, J.R. en "Biology of Tetrahymena" (ed. A.M.Elliott) pp. 57-87, Dowden, Hutchinson & Ross, Inc., Stroudsburg, 1973.
6. Rasmussen, L. Carlsberg Res. Commun. 41: 145-167, 1976.
7. Hill, D.L. "The Biochemistry and Physiology of Tetrahymena" (ed. A.M.Elliott) pp. 57-87, Academic Press, New York, 1972.
8. Suhr-Jessen, P. "Model Systems in Cell Biology", Odense University, Denmark, 1982.
- 9. Allen, R.D. J. Protozool. 14: 553-565, 1967.
10. Satir, B. & Wissig, E. J. Cell Sci. 55: 13-33, 1982.
11. Satir, B., Schooley, C. & Satir, P. Nature 235: 53-54, 1972.
12. Satir, B., Schooley, C. & Satir, P. J. Cell Biol. 56: 153-176, 1973.
13. Satir, B. Scient. Amer. 233: 29-37, 1975.
14. Maihle, N.J. & Satir, B.H. J. Cell. Biochem. 31: 195-202, 1986
15. Hausmann, K. Int. Rev. Cytol. 52: 197-276, 1978.
16. Tokuyasu, K. & Scherbaum, O. J. Cell Biol. 27: 67-81, 1965.
17. Tiedtke, A. Naturwiss. 63: 93, 1976
18. Satir, B. Cell Biol. Internat. Rep. 1: 69-73, 1977.

19. Wissig,S.L. & Satir,B.H. J. Submicrosc. Cytol. 12: 1-16, 1980.
20. Tiedtke,A. Comp. Biochem. Physiol. 75B: 239-243, 1983.
21. Nilsson,J.R. Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg 39: 83-83-110, 1972.
22. Liang,C.R. & Rosenberg,H. Biochim. Biophys. Acta 125: 548-562, 1966.
23. Berger,H., Jones,P. & Hanahan,D.J. Biochim. Biophys. Acta 260: 617-629, 1972.
24. Rosenthal,A.F. & Pousada,M. Biochim. Biophys. Acta 164: 226-237, 1968.
25. Thompson,G.A.,Jr. Biochim. Biophys. Acta 176: 330-338, 1969.
26. Pagano,R.E. & Sleight,R.G. TIBS 10: 421-425, 1985.
27. Kennedy,K.E. & Thompson,G.A.,Jr. Science 168: 989-991, 1970.
28. Smith,J.D.,Snyder,W.R. & Law,J.H. Biochem. Biophys. Res. Commun. 39: 1163-1169, 1970.
29. Nozawa,Y. & Thompson,G.A.,Jr. J. Cell Biol. 49: 722-730, 1971.
30. Corliss,J.O. en "Biology of Tetrahymena" (ed. A.M. Elliott), pp. 1-56, Dowden, Hutchinson & Ross,Inc., Stroudsburg, 1973.
31. Holz,G.G. en "Biology of Tetrahymena" (ed. A.M.Elliott) PP. 89-98, Dowden, Hutchinson & Ross, Inc., Stroudsburg, 1973.
32. Elliott,A.M. & Clemmons,G.L. J. Protozool. 13: 311-323-1966

33. Rasmussen,L.,Buhse,H.E.,Jr & Groh,K. J. Protozool. 22: 110-111, 1975.
34. Fok,A.K.,Lee,Y.,Allen,R.D. J.Protozool. 29: 409-414, 1982
35. Nilsson,J.R. J. Protozool. 34:1-7, 1987.
36. Nilsson,J.R. & v.Deurs,B. J.Cell Sci. 63: 209-222, 1983.
37. Crockett,R.L.,Dunham,P.B. & Rasmussen,L. Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg 34: 451-486, 1965.
38. Hoffmann,E.K. & Rasmussen,L. Biochim. Biophys. Acta 226: 206-216, 1972.
39. Freeman,M. & Moner,J.G. J.Protozool. 21: 433, 1974.
40. Cirillo,V.P. J.Bacteriol. 84: 754-758, 1962.
41. Fauré-Fremiet,E. en "Chemical Zoology" (ed. M.Florkin & B.J.Scheer), vol.I: Protozoa (ed. G.W.Kidder),pp. 21-24, Academic Press, NY, 1967.
42. Corliss,J.O. J.Protozool. 1: 156-159, 1954.
43. Corliss,J.O. J.Protozool. 17: 198-209, 1970.
44. Elliott,A.M. J.Protozool. 17: 162-168, 1970.
45. Elliott,A.M. Science 149: 640-641, 1965.
46. Müller,M.,Baudhuin,P. & De Duve,C. J.Cell Physiol. 68: 165-176, 1966.
47. Blumm,J.J. & Rothstein,T.L. en "Lysosomes in Biology and Pathology" (ed. J.T.Dingle & R.T.Dean), cp.2, North Holland Publishing Co., Amsterdam, 1975.
48. Müller,M. J.Cell Biol. 52: 478-487, 1972.
49. Rothstein,T.L. & Blum,J.J. J.Cell Biol. 62: 844-859, 1974.

50. Müller, M., Röhlich, P. & Törö, I. *J. Protozool.* 12: 27-34, 1965.
51. Smith, J.B. Ph.D. Thesis, Columbia University, New York, 1961.
52. Dickie, N. & Liener, I.E. *Biochim. Biophys. Acta* 64: 41-51, 1962.
53. Dickie, N. & Liener, I.E. *Biochim. Biophys. Acta* 64: 52-59, 1962.
54. Rothstein, T.L. & Blum, J.J. *Exptl. Cell Res.* 87: 168-174, 1974.
55. Silberstein, G.B. *J. Protozool.* 26: 519-524, 1979.
56. Tiedtke, A. & Görtz, H.-D. *Eur. J. Cell Biol.* 30: 254-257, 1983.
57. Tariguchi, Y. et al. *J. Biol. Chem.* 260: 13941-13946, 1985.
58. Hünseler, P., Tiedtke, A. & von Figura, K. *Biochem. J.* 252: 837-842, 1988.
59. Banno, Y., Sasaki, N. & Nozawa, Y. *Exptl. Cell Res.* 170: 259-268, 1987.
60. Hasilik, A. *TIBS* 5: 237-240, 1980.
61. Pannell, R., Wood, L. & Kaplan, A. *J. Biol. Chem.* 257: 9861-9865, 1982.
62. Orias, E. & Bruns, P.J. en "Methods in Cell Biology" (ed. D.M. Prescott), vol. 10, pp. 247-282, Academic Press, NY, 1975.
63. Hünseler, P., Schidgen-Kleyboldt, G. & Tiedtke, A. *J. Cell Sci.* 88: 47-55, 1987.
64. Orias, E. & Pollock, N.A. *Exptl. Cell Res.* 90: 345-349, 1975.

65. Borden,D.,Miller,E.T. & Nanney,D.L. Evolution 31: 91-102, 1975.
66. Pozzan,T.,Artsan,P.,Tsien,R. & Rink,T. J.Cell Biol. 94: 335-340, 1982.
67. Tsien,R.,Pozzan,T. & Rink,T. J.Cell Biol. 94:325-333, 1982
68. Kittredge,J.S. & Roberts,E. Science 164: 37-42, 1969.
69. Nielsen,T.,Villadsen,I.S. J.Protozool. 32: 634-639, 1985.
70. Nilsson,J.R. en "Biochemistry and Physiology of Protozoa" (ed. M.Levandowsky & S.H.Hutner) vol.2,p.339, Academic Press,NY, 1979.
71. Douglas,W.W. en Methods in Cell Biology (ed. A.R. Hand & C. Oliver) vol. 23, p.483, Academic Press, NY, 1981.
72. Plattner,H. Cell Biol. Intern. Rep. 5:435-459, 1981.
73. Scorza,C.,Scorza,J.V. & van Noorden,S. Rev. Micr. Electr. 1(1): 26-27, 1972.
74. Opperdoes,F. J.Protozool. 1988, en prensa.
75. Muto,Y. & Nozawa,Y. Biochim. Biophys. Acta 815: 410-416, 1985.
76. Hohman,T.C. & Bowers,B. J.Cell Biol. 98: 246-252, 1984.
77. Leick,V. & Hellung-Larsen,P. J.Protozool. 32: 550-553, 1983.
78. Zdzwanoski,M.K. & Rasmussen,L. Comp.Biochem.Physiol. 62A: 331-334, 1979.
79. Alberts,B.,Bray,D.,Lewis,J.,Raff,H.,Roberts,K. & Watson,J.D. Molecular Biology of the Cell, p. 674, Garland Publishing,Inc., NY and London, 1983.
80. Hill,D.L. The Biochemistry and Physiology of Tetrahymena, p.14, Academic Press, NY, 1972.

81. Loefer, J.B. & Mefferd, R.B. Jr. *Amer. Natur.* 86: 325, 1952.
82. Jahn, T.L. & Brown, M. *Amer. Zool.* 1:454, 1961.
83. Eisen, H. & Tallan, J. *Nature* 270: 514-515, 1975.
84. Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M., Knudsen, J. & Rasmussen, L. *J. Protozool.* 32: 657-660, 1985.
85. Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M., Rasmussen, L., Knudsen, J. *Comp. Biochem. Physiol.* 85B: 143-148, 1986.
86. Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M., Rasmussen, L., Knudsen, J., Hansen, H.O. *Comp. Biochem. Physiol.* 85B: 148-153, 1986.
87. Florin-Christensen, J., Florin-Christensen, M., Knudsen, J. & Rasmussen, L. *TIBS Trends Biochem. Sci.* 11: 354-355, 1986.
88. Gottlieb, M. & Dwyer, D.M. *Science* 212: 939-941, 1981.
89. Letelier, M.E., Repetto, Y., Aldunate, J. & Morello, A. *Comp. Biochem. Physiol.* 81B: 47-51, 1985.
90. Nagakura, K., Tachibana, H. & Kaneda, Y. *Comp. Biochem. Physiol.* 81B: 815-817, 1985.
91. Blackwell, J., McMahon, D. & Shaw, J. *Parasitol. today* 2: 45-53, 1986.
92. Eaton, R.D.P., Meerovitch, E. & Costerton, J.E. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* 64: 299-304, 1970.
93. Dimond, R.L., Burns, R.A. & Jordan, K.B. *J. Biol. Chem.* 256: 6565-6572, 1981.

