

La Serie Universitaria de la Fundación Juan March presenta resúmenes, realizados por el propio autor, de algunos estudios e investigaciones llevados a cabo por los becarios de la Fundación y aprobados por los Asesores Secretarios de los distintos Departamentos.

El texto íntegro de las Memorias correspondientes se encuentra en la Biblioteca de la Fundación (Castelló, 77. Madrid-6).

La lista completa de los trabajos aprobados se presenta, en forma de fichas, en los Cuadernos Bibliográficos que publica la Fundación Juan March.

Los trabajos publicados en Serie Universitaria abarcan las siguientes especialidades:

Arquitectura y Urbanismo; Artes Plásticas; Biología; Ciencias Agrarias; Ciencias Sociales; Comunicación Social; Derecho; Economía; Filosofía; Física; Geología; Historia; Ingeniería; Literatura y Filología; Matemáticas; Medicina, Farmacia y Veterinaria; Música; Química; Teología. A ellas corresponden los colores de la cubierta.

Edición no venal de 300 ejemplares que se reparte gratuitamente a investigadores, Bibliotecas y Centros especializados de toda España.

Fundación Juan March



SERIE UNIVERSITARIA

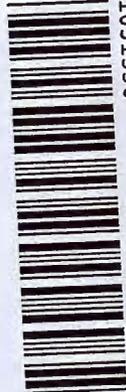


Fundación Juan March

Claudio Fernández de Heredia

Regulación de la expresión genética a nivel de transcripción durante la diferenciación de Artemia salina

Biblioteca FJM



FJM-Uni 101-Fer
Regulación de la expresión genética
Fernández de Heredia Adán, Cía
1031556

101 Regulación de la expresión genética durante la diferenciación de Artemia salina/Claudio Fernández de Heredia

FJM
Uni-
101
Fer
101

Fundación Juan March

Serie Universitaria

101



Claudio Fernández de Heredia

Regulación de la expresión
genética a nivel de transcripción
durante la diferenciación de
Artemia salina



Fundación Juan March
Castelló, 77. Teléf. 225 44 55
Madrid - 6

Fundación Juan March (Madrid)

*Este trabajo fue realizado con una Beca de la
Convocatoria de España, 1975, Investigaciones Biológicas, Genética, en equipo.
Departamento de BIOLOGIA.
Centro de trabajo: Instituto de Enzimología y Patología Molecular del C.S.I.C.
Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.*

Depósito Legal: M-32623 - 1979

I.S.B.N. 84 - 7075 - 140 - 9

Ibérica, Tarragona, 34 - Madrid - 7.

Impresión: Gráficas Ibérica, Tarragona, 34 - Madrid - 7.

I N D I C E

	<u>Página</u>
1. INTRODUCCION	7
2. METODOLOGIA	12
3. RESULTADOS	16
3.1. Caracterización bioquímica del genoma de <i>A. salina</i> y su modificación durante el desarrollo	16
3.2. Maquinaria enzimática de la transcripción y su regularización durante el desarrollo de <i>A. salina</i>	20
3.3. Enzimas activos sobre los productos de transcripción	24
3.4. Expresión de actividades enzimáticas durante el desarrollo temprano de <i>A. salina</i>	31
3.5. El comportamiento de las actividades mitocondriales durante el desarrollo de <i>A. salina</i>	34
4. CONCLUSIONES	40
5. BIBLIOGRAFIA	42

La Fundación Juan March no se solidariza necesariamente con las opiniones de los autores cuyas obras publica.

COMPOSICION DEL EQUIPO DE INVESTIGACION

A. Personal Científico

1. Investigadores

Dr. Claudio Fernández de Heredia
Director del Proyecto

Dr. Carmen García Vallejo

Dr. M^a Antonia Gunther

Dr. Pilar Llorente

Dr. Roberto Marco

Dr. Angel Pestaña

Dr. Jaime Renart

Dr. Jesús Sebastián

Dr. Antonio Sillero

2. Becarios

Amparo Cano

José Vicente Castell

Ricardo Castro

Margarita Cervera

Antonio Coloma

Jesús Cruces

M^a Carmen Dominguez

Mario Carratalá

Inmaculada Estepa

M^a Eugenia Gallego

Rafael Garesse

Josefina Miralles

Alfredo Moreno

Asunción Olalla

Carmen Osuna

M^a Dora Pascual-Salcedo

Vicente Pascual

Miguel Quintanilla

Amelia Ruiz

Leandro Sastre

B. Personal Auxiliar

Elvira Dominguez

Francisca de Luchi

M^a Carmen Moratilla

Eulalia Moreno

M^a Asunción Navarro

INTRODUCCION

Artemia salina es un crustáceo del orden Anostraea, subclase Branchiopoda, cuyo ciclo biológico es relativamente corto y puede reproducirse en el laboratorio (Fig 1). La hembra adulta puede ser vivípara u ovípara. En el último caso, los huevos fecundados se desarrollan hasta el estadio de gástrula dentro del ovisaco, se enquistan y son expulsados al exterior. Tras sufrir desecación, los quistes pueden permanecer viables durante años. Cuando estos quistes se colocan en una solución salina adecuada, pasan a animales adultos en, aproximadamente, tres semanas. El desarrollo de quiste a larva capaz de nadar, tiene lugar en unas 16-20 horas y se realiza sin división celular. Lo que parece ocurrir durante este período, es un proceso de reagrupación celular y el comienzo de la diferenciación hacia órganos y tejidos especializados.

Los procesos de diferenciación y desarrollo se pueden definir como la expresión temporal de un programa contenido en las células que da lugar a la aparición de estructuras, propiedades y funciones no presentes en las células originales. La idea básica que ha presidido es-

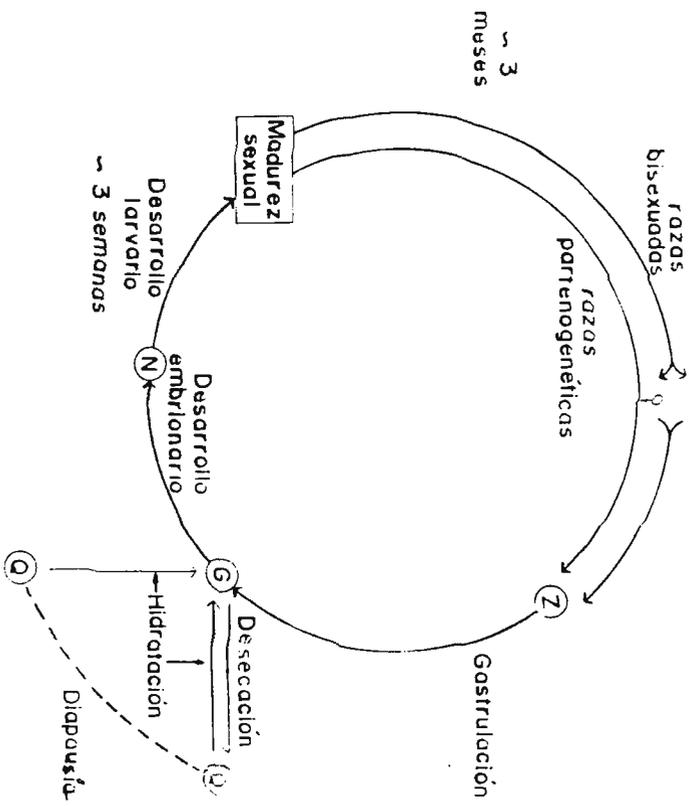


Fig. 1.- Esquema del ciclo biológico de Artemia.

te proyecto de investigación ha sido el que la explicación a nivel molecular de la diferenciación en los organismos eucariotes, radica en la modulación de la regulación de la expresión genética en sus distintos niveles. La información genética almacenada en el DNA debe ser transcrita a moléculas de RNA y posteriormente traducida a moléculas de proteínas que, a través de sus funciones e interacciones específicas, darán lugar a la síntesis de los componentes moleculares, y estos a la formación ordenada de las distintas estructuras de las células en distinto grado de diferenciación. Este flujo de información genética contenida en el DNA puede ser modulado a muy distintos niveles. La integración concertada de estos niveles de regulación serán los que en último término den cuenta del proceso de diferenciación. Como consecuencia de este planteamiento, es de importancia básica el poder ir analizando cada una de las etapas implicadas en el flujo de información y tratar de identificar los mecanismos que las regulan. Ha sido el propósito de nuestro trabajo el centrar la atención, fundamentalmente, en el estudio de la etapa de transcripción y de la identificación de factores que puedan regular esta etapa durante el desarrollo temprano del crustáceo Artemia salina.

El estudio de la transcripción ha sido abordado en un sentido amplio fijando la atención en el estudio del DNA y de la cromatina y su modificación durante el desarrollo de Artemia; en la caracterización de la propia maquinaria enzimática del proceso de transcripción y de los factores presuntamente implicados en su regulación; en la caracterización de actividades enzimáticas activas sobre los productos de transcripción. Por la importancia que parece tener durante las primeras fases del desarrollo, ha sido también abordado el estudio de enzimas activos en la degradación de proteínas y del comportamiento de las actividades mitocondriales durante el desarrollo temprano de Artemia. A lo largo del trabajo ha sido necesario desarrollar una metodología dirigida a la obtención de poblaciones sincronizadas de Artemia, al marcaje de macromoléculas con precursores radioactivos durante las primeras fases del desarrollo y al estudio de las interacciones proteína-ácidos nucleicos que puede tener aplicación a otros sistemas biológicos.

La utilización del sistema de Artemia salina, como modelo experimental para el estudio de los procesos de diferenciación y desarrollo, ha ido incrementándose durante los últimos cinco años. Los resultados obtenidos

con Artemia (por el hecho de que en el quiste están separados temporalmente los acontecimientos de división celular y morfogénesis) permitirán una mejor comprensión de fenómenos que no se han podido estudiar en otros sistemas biológicos. Distintos grupos de investigación han utilizado diversos tipos de abordajes para el estudio de aspectos concretos de este proceso. Nuestros resultados creemos que han contribuido al conocimiento bioquímico básico de este organismo. Como apuntábamos al principio, solamente la integración de los conocimientos obtenidos sobre los mecanismos que intervienen en el flujo de la información almacenada en el DNA, pueden dar respuesta satisfactoria al problema de la diferenciación celular.

METODOLOGIA

Aparte de los métodos generales utilizados en este trabajo y cuya descripción detallada podrá encontrarse en las referencias bibliográficas recogidas al final, durante la ejecución del mismo ha sido necesario desarrollar procedimientos específicos dirigidos a obtener poblaciones sincronizadas de Artemia, al marcaje de macromoléculas con precursores radioactivos durante las primeras fases del desarrollo y al estudio de las interacciones proteínas ácidos nucleicos.

Aproximadamente después de 15 horas de incubación de los quistes de Artemia en un medio salino apropiado, aparece en ellos una fisura y el embrión empieza a emerger cubierto todavía por una membrana por la que permanece unido a la cáscara. A este estadio de desarrollo denominamos prenauplias. Las prenauplias siguen desarrollándose, rompen la membrana y la nauplia libre comienza a nadar. En un cultivo de Artemia pueden por tanto coexistir quistes no viables, prenauplias y nauplias. Se ha conseguido la separación de estos tres estadios de desarrollo mediante aplicación de la mezcla, una vez concentrada por filtración a través de una gasa, a una colum-

na (95 x 3 cm) que contiene un gradiente continuo de NaCl entre 0 y 75% de saturación. La columna se cubre con papel negro excepto la parte superior que se ilumina intensamente. Después de 30 minutos en estas condiciones, los componentes de la mezcla se separan y distribuyen del modo siguiente: en la parte inferior, más densa del gradiente, se colocan los quistes no eclosionados, en la parte media del gradiente, las prenauplias y en la parte superior, en la zona más iluminada, se colocan las nauplias que migraron allí por su fototropismo positivo.

Los quistes durmientes y embriones de Artemia, son practicamente impermeables a precursores de macromoléculas. La necesidad de marcaje de estos compuestos con precursores radioactivos, hizo necesario buscar condiciones para la permeabilización de los mismos al paso de metabolitos sin que perdiesen su viabilidad. Esto se ha conseguido mediante tratamiento de los quistes con una solución de hipoclorito sódico al 2,5% durante 5 minutos. Tras eliminar el hipoclorito mediante lavados con agua, los quistes se trataban con acetona durante 5 minutos y posterior lavado hasta eliminar la acetona. Tras este tratamiento conservan más del 90% de viabilidad y son permeables a precursores de ácidos nucléicos y pro-

teínas.

Reacción de la fluorescamina y su aplicación al estudio de interacciones proteínas ácidos nucleicos.

La fluorescamina, un compuesto sintetizado por el grupo de Weigele ha sido utilizado ampliamente por Udenfriend como un reactivo muy útil de aminas primarias. Como muchas de las moléculas biológicas más importantes son aminas primarias, la fluorescamina ha encontrado amplia aplicabilidad. Hemos reexaminado los principales parámetros que afectan la reacción, incluyendo los factores que afectan el límite de sensibilidad de la reacción y puesto a punto un micrométodo que permite ahorrar gran cantidad de reactivo y determinar cuantitativamente aminas primarias en un rango muy bajo de concentraciones(1).

En estudios de biología molecular tales como estructura de cromatina, síntesis de DNA, regulación de transcripción, etc., es importante poder disponer de métodos sencillos y sensibles para estudiar interacciones entre proteínas y ácidos nucleicos. Utilizando la gran sensibilidad de la fluorescamina como reactivo específico de proteínas, pero no de DNA y del ácido diaminobenzoico como reactivo de DNA, se han desarrollado métodos que

permiten valorar la interacción entre estos dos tipos de macromoléculas. La proteína ó el DNA del complejo nucleoprotéico (previamente aislado bien por sedimentación ó por filtración a traves de filtros de nitrocelulosa), se determinan con fluorescamina ó ácido diaminobenzóico (2,3). El método de la fluorescamina ha resultado también muy útil por su gran sensibilidad para la determinación de actividades proteasicas (4).

RESULTADOS

1. Caracterización bioquímica del genoma de Artemia salina y su modificación durante el desarrollo.

El aislamiento tanto del DNA como de la cromatina de Artemia, es necesario tanto para el conocimiento de la organización estructural y secuencial del genoma, como para el estudio de la transcripción in vitro por las RNA polimerasas homólogas y la dilucidación de los mecanismos de control operativos en este paso de flujo de la información genética.

Partiendo tanto de quistes como de larvas de Artemia ha sido posible desarrollar métodos basados en los previamente utilizados por otros autores, que permiten obtener tanto DNA como cromatina en estado de gran integridad y pureza. A partir de quistes, se han obtenido dos tipos de DNA: un DNA nuclear con un peso molecular comprendido entre $10-80 \times 10^6$ y un DNA de la fracción plaquetaria (que representa aproximadamente un 20 por ciento del total) con un peso molecular de $3-5 \times 10^6$. A partir de larvas de 18 horas de desarrollo se ha obtenido DNA nuclear de más alto peso molecular entre $10-300 \times 10^6$

Estos tipos de DNA sirven como moldes para la transcripción por las RNA polimerasas de Artemia. Igualmente se han obtenido preparaciones de cromatina de alto peso molecular ($>5 \times 10^7$) que mostraron también ser funcionalmente activas por el doble criterio de servir como molde para transcripción por las RNA polimerasas, y por contener la actividad acetil transferasa capaz de producir la acetilación tanto de histonas endógenas como exógenas.

La acetilación de histonas es un tipo de modificación de estas proteínas que parece ser muy importante en los procesos de activación de la cromatina y por tanto en los procesos de regulación de la expresión génica. En este sentido hemos estudiado la evolución de una actividad enzimática, acetil transferasa, y su posible regulación durante el desarrollo embrionario y larvario temprano de Artemia (5-7). El enzima se induce durante los primeros estadios del desarrollo embrionario. Las propiedades esenciales de este enzima se resumen en la Tabla I. Existen dos características importantes que debemos resaltar. El enzima acetila mucho más eficazmente la histona H_1 que las histonas H_3 y H_4 cuando se las ofrece independientemente como sustratos. Sin embargo estudios realizados mediante electroforesis de la acetilación endógena de his-

TABLA 1

Caracterización de la acetil transferasa de A. salina

Estabilidad térmica	Pequeña (80% inactivación en 2.5 min a 40º)
Fuerza iónica óptima	Baja (0.05 M)
Optimo pH	8.5
Requerimiento de metales divalente monovalente	Ninguno (50% inhibición con 1 mM Mn^{2+}) Ninguno (50% inhibición con 80 mM Na^+ , K^+)
Requerimiento de grupos sulfhídrico	Grande
Peso Molecular	170.000 (en 0.2 M KCl; presenta agregación iónica baja)
Especificidad de sustrato	H1 > H3 > H4
Histonas acetilantes <u>in vivo</u>	H3 y H4, no H1
Datos tomados de (5-7)	

tonas en preparaciones nucleares intactas, han puesto de manifiesto que las únicas histonas acetiladas son la H_3 y H_4 y no se encuentra acetilación de la H_1 . Esto sucede también cuando el enzima purificado se le ofrece una mezcla de las cinco histonas. Hemos visto que la causa responsable de esta aparente contradicción es la fuerte inhibición que la histona H_4 a concentraciones muy pequeñas produce sobre la acetilación de la H_1 . Por tanto parece existir una regulación de la acetil transferasa por sus sustratos. Otro hecho importante que queremos resaltar en relación con la actividad acetilante de histonas es la caracterización de un potente inhibidor de este enzima, que aparece en una determinada fase del desarrollo larvario de Artemia y que ha sido identificado como un trozo corto de DNA (de aproximadamente 1500 pares de bases) que se compleja fuertemente con las histonas sustrayéndolas así a la acción de la acetil transferasa. Por tanto, parece que la acetilación de histonas durante el desarrollo de Artemia, puede ser regulada por cambios en los niveles del enzima acetilante, por la aparición durante el desarrollo de un inhibidor del enzima y por sus propios sustratos mediante un mecanismo verosimilmente de carácter alostérico.

El importante papel de las DNAsas en la replicación del DNA y su implicación en los procesos de reorganización del genoma eucariote, nos hizo centrar la atención en el estudio de estas enzimas durante el desarrollo de Artemia. Por otra parte, el conocimiento de estas DNAsas era también importante para poder impedir sus efectos deletereos durante el aislamiento y caracterización del DNA y la cromatina a que hicimos referencia anteriormente. Nuestros estudios han puesto de manifiesto que los quistes de Artemia salina contienen niveles casi indetectables de actividades DNAsicas y que estas actividades experimentan un fuerte aumento después de la eclosión de las larvas. El enzima de los quistes está localizado en la capa más externa de las plaquetas de vitelo, utiliza DNA bicatenario como sustrato y lo hidroliza preferentemente por mecanismo haplotómico, pero también por mecanismo diplotómico. El aumento de actividad DNasa después de la eclosión de las larvas parece debido más a una liberación del enzima de las plaquetas durante su metabolismo que a una síntesis de novo del enzima.

2. Maquinaria enzimática de la transcripción y su regulación durante el desarrollo de Artemia salina.

Al igual que otros organismos eucariotes, Ar-

temia salina tiene tres tipos de RNA polimerasas que pueden separarse entre sí mediante cromatografía en DEAE-Sephadex. Siguiendo el orden de elución, las tres RNA polimerasas se han denominado I, II y III respectivamente. Los tres isoenzimas han sido purificados y caracterizados (8,9,10). Como parece ser general en organismos eucariotes, cada uno de estos tres isoenzimas, sintetiza un tipo de RNA. Los RNA ribosómico, mensajero y de transferencia, son respectivamente sintetizados por las RNA polimerasas I, II y III.

La existencia en Artemia de estas tres formas de RNA polimerasas con funciones definidas, abriría la posibilidad de que un mecanismo de control de la transcripción a nivel enzimático pudiera ejercerse a través de cambios en los niveles de estos tres isoenzimas. Los resultados expuestos en la Fig 2 muestran los cambios de niveles de las RNA polimerasas durante el desarrollo embrionario y primeras fases del desarrollo larvario de Artemia. La RNA polimerasa I aumenta durante la embriogénesis y disminuye después de la eclosión de las larvas para alcanzar un nivel que se mantiene prácticamente constante durante las 50 horas siguientes de desarrollo. Los niveles de la RNA polimerasa II aumentan de un modo con-

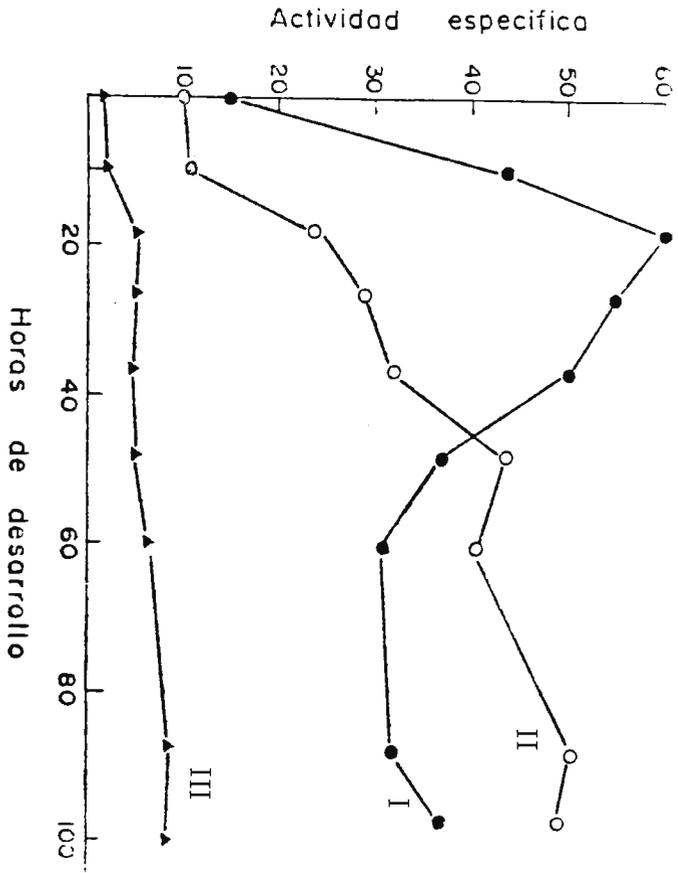


Fig. 2.- Cambios en los niveles de las RNA polimerasas durante el desarrollo de Artemia. Datos tomados de (8, 11).

tinuo hasta alcanzar una actividad específica a las 80 horas de desarrollo cinco veces mayor que en los embriones. Los niveles de la RNA polimerasa III aumentan sólo ligeramente durante la embriogénesis y el desarrollo larvario temprano. Existe amplia evidencia en distintos sistemas biológicos que demuestran una correlación directa entre niveles de las RNA polimerasas y la síntesis de RNA específicos. Las fluctuaciones en los niveles de las RNA polimerasas durante el desarrollo de Artemia pueden modular y regular la actividad transcripcional de determinados genes.

Aparte de la regulación de la transcripción por variación en los niveles de la maquinaria enzimática responsable del proceso, otro tipo de regulación puede ejercerse a través de efectores que modifiquen la actividad y/ó la especificidad de las RNA polimerasas. La evidencia de que actualmente se dispone, apunta a que algunos dinucleósido polifosfatos, como el diguanosintetrafosfato presente en grandes concentraciones en quistes de Artemia, son buenos candidatos como presuntos moduladores de la actividad de las RNA polimerasas. El interés de estos compuestos como reguladores metabólicos, nos llevó a estudiar tanto en Artemia como en otros sistemas bioló-

gicos, actividades enzimáticas que hidrolizasen estos compuestos (12, 13). Los resultados expuestos en las Tablas 2 y 3 recogen la especificidad de sustrato de dos de estas hidrolasas.

Otro tipo de regulación de la transcripción puede ejercerse a través de modificaciones estructurales durante el desarrollo de las RNA polimerasas que afecten las propiedades catalíticas de estos enzimas. En este sentido no hemos encontrado diferencias estructurales entre las RNA polimerasas procedentes de distintos estadios del desarrollo de Artemia.

3. Enzimas activos sobre los productos de transcripción.

Los productos directos de la transcripción en organismos eucariotes no son las formas maduras de los RNA ribosomales, mensajeros o de transferencia, sino moléculas de RNA de mucho mayor tamaño molecular, que deben sufrir un proceso de modificación y reordenamiento para dar lugar a las formas maduras. En estos procesos de reordenamiento actúan distintos enzimas hidrolíticos o modificantes de las moléculas de RNA. Como contribución al conocimiento de estos mecanismos de procesamiento de los productos de transcripción y de su eventual

TABLA 2

Especificidad de sustrato de la dinucleósido trifosfatasa de hígado de rata

Sustrato	Concentración (μM)	Producto Valorado	Velocidad relativa %	Km (μM)
Ap ₃ A	50	ADP	100	7
Gp ₃ G	30	GDP	46	2
Up ₃ U	200	UDP	37	25
Xp ₃ X	200	Pi	<6	-
Ap ₄ A	40	ADP	2	-
Gp ₄ G	40	GTP	2	-
Ap ₂ A	40	Inosina	2	-
Gp ₂ G	600	Pi	3	-
P ₄ A	50	ATP, ADP	3	-
A ₄ P	250	ADP	2	-
ADP	300	Pi	2	-
NADP [†]	1.700	NADP [†] residual	5	-
Bis-p-nitrofenil fosfato	3.000	p-nitrofenol	2	-

Datos tomados de (13)

TABLA 3

Especificidad de sustrato de la diguanosin tetrafosfatasa de hígado de rata y de Artemia salina.

Sustrato	Hígado		Artemia	
	Km(μ M)	Velocidad relativa %	Km(μ M)	Velocidad relativa %
Gp ₄ G	2	100	5	100
Ap ₄ A	2	62	2	88
Up ₄ U	10	33	11	30
Xp ₄ X	16	78	18	123

Datos tomados de (12)

regulación durante el desarrollo de Artemia, hemos estudiado actividades RNAsas y poli-(A) polimerasas en gástrulas durmientes y su evolución durante el desarrollo.

Los quistes de Artemia contienen niveles casi indetectables de actividades ribonucleásicas y estos bajos niveles de actividad se mantienen durante todo el desarrollo embrionario. Al poco tiempo de la eclosión de las larvas se induce la síntesis de una actividad ribonucleasa que hemos caracterizado (14). La inducción del enzima es inhibida por inhibidores de síntesis de proteínas, sugiriendo que la inducción se debe a síntesis de novo del enzima. Los resultados en la Tabla IV recogen las características más importantes de este enzima. El enzima tiene actividad sobre RNA y no es activo sobre DNA nativo o desnaturizado. El mecanismo de hidrólisis es endonucleolítico. El enzima muestra una preferencia muy marcada para hidrolizar enlaces fosfodiéster entre restos de uridina poli (U), hidroliza mucho más lentamente secuencias de poli(A) y poli(C), y no tiene actividad detectable sobre poli(G). La función fisiológica de esta nucleasa no está aún aclarada. La marcada preferencia que tiene para hidrolizar secuencias de poli(U) seguida por su capacidad para hidrolizar secuencias de poli(A), puede apuntar a su implicación en

TABLA 4

Propiedades de la Ribonucleasa de Artemia salina

pH óptimo	7,5
Requerimiento de metal	5-10 mM Mg ²⁺ ó Mn ²⁺
Estabilidad térmica	Pequeña (50% inactivación en 3 min a 54º)
<u>Especificidad de sustrato</u>	<u>Velocidades relativas</u>
rRNA (levadura)	100
rRNA (<u>A. salina</u>)	66
DNA (nativo o desnaturalizado)	indetectable
poli (U)	10 ⁴
poli (A)	1,2 x 10 ³
poli (C)	500
poli (G)	indetectable

Datos tomados de (14).

la eliminación de secuencias internas de poli (U) o poli (A) presentes en formas inmaduras de muchos RNA mensajeros y que deben ser eliminados durante el proceso de maduración.

Las poli (A) polimerasas son enzimas que están implicados en el procesamiento de RNA mensajeros mediante adición de restos de AMP al extremo 3' terminal de las cadenas de RNA. Las gástrulas durmientes de Artemia salina tienen una actividad poli (A) polimerasa que hemos purificado y caracterizado (11,15). Las propiedades más importantes del enzima se resumen en la Tabla 5. Alrededor del 80% de la actividad se encuentra en el citosol de los quistes de Artemia y esta distribución celular cambia ligeramente durante la embriogénesis. En larvas recién emergidas alrededor del 50% de la actividad es particulada. El enzima incorpora cadenas de poli(A) al extremo 3' terminal de varios poliribonucleótidos, tanto naturales como sintéticos, pero no a cadenas de DNA. El enzima sintetiza una cadena de poli (A) de unos 10 residuos de AMP. Las propiedades de la poli A polimerasa de Artemia son básicamente similares a las de otras poli (A) polimerasas encontradas en otros sistemas.

TABLA 5

Propiedades de la poli (A) polimerasa de A. salina.

Especificidad de sustrato	
Nucleótidos	ATP >> dATP >>> CTP, GTP, UTP
Cebador	RNA ₂ >>> poli (A) >>> poli (A ₂ U) >>> poli (C) >>> poli(U) >>>> DNA
Catión	Mn ²⁺ Mg ²⁺ -- Co
Tamaño de las cadenas de poli (A):	10 nucleótidos
Condiciones de la reacción	
pH óptimo	8.0-8.5
Fuerza iónica	20-50 mM KCl
Peso molecular del enzima:	70.000

Datos tomados de (11).

4. Expresión de actividades enzimáticas durante el desarrollo temprano de Artemia.

Además de centrar nuestra atención en el proceso de transcripción en sentido amplio (estudio bioquímico del genoma y su modificación, maquinaria de transcripción y su regulación y estudio de algunas actividades enzimáticas presuntamente implicadas en los mecanismos de procesamiento de los RNA) parecía conveniente desde el punto de vista de la diferenciación y desarrollo, estudiar la expresión de determinados productos génicos que nos pudieran servir: a) como marcadores de un determinado estadio del desarrollo, b) como proteínas tipo en las que la regulación de su síntesis pudiera ser objeto de estudio y finalmente, de actividades enzimáticas que por sus presuntas peculiaridades específicas (morfogenéticas, degradativas, reguladoras de vías biosintéticas importantes) pudieran tener interés potencial en el estudio de los procesos de diferenciación y desarrollo.

La conclusión de tipo un tanto general a qué han llevado estos estudios, es que el desarrollo embrionario es un período de activación nuclear y morfogénesis intensa, y que después de la eclosión de las larvas hay un período de intensa inducción de actividades enzimáticas de

funciones muy distintas. En apartados anteriores hemos visto las características de inducción de algunas enzimas como la actividad acetilante de histonas, actividades DNasa y RNasa. Durante el desarrollo larvario temprano se induce la síntesis de varias proteasas distinguibles entre sí, tanto por sus propiedades cromatográficas en DEAE-celulosa, como por su diferente expresión temporal durante el desarrollo y distinta especificidad de sustrato. Cuatro de estas actividades proteásicas (A, B, C y D) han sido purificadas (16, 17, 18) y sus características diferenciales se exponen en la Tabla VI.

Posteriormente a la aparición de las proteasas, tiene lugar durante el desarrollo larvario temprano, la inducción de una enzima que inespecíficamente hidroliza aminoacil-tRNAs libres o N-sustituídos, dando como productos de la reacción tRNA y el correspondiente aminoácido (19). La actividad de esta hidrolasa es prácticamente indetectable en quistes y durante el desarrollo embrionario, a diferencia de otro enzima que hidroliza muy específicamente N-acetilfenilalanil-tRNA (20, 21), cuyos niveles de actividad en quistes son altos y se mantienen prácticamente constantes durante las primeras 40 horas de desarrollo (19). Las características diferenciales de estas aminocil-

TABLA 6

Caracterización de las proteasas inducidas durante el desarrollo de A. salina

Substratos:	<u>A</u>	<u>B</u>	<u>C</u>	<u>D</u>
CLNE	+	-	-	-
BAPNA	-	+	+	-
TAME	-	+	+	-
Caseína	-	+	-	+
Azocaseína	-	+	+	+
Inhibidores:				
STI	+	+	+	-
CTI	+	+	+	-
PMSF	+	-	-	-
TLCK	-	+	+	-
Elución de DEAE-(KCl)	0.41 M	0.47 M	0.85 M	0.59 M
Peso molecular ($\times 10^{-3}$)	38	33	34	35

Datos tomados de (16, 17 y no publicados)

tRNA hidrolasas se expone en la Tabla 7.

Durante las primeras fases del desarrollo de Artemia tiene lugar un intenso aumento de las actividades mitocondriales. Uno de los enzimas mitocondriales inducidos durante este período es la carbamil fosfato sintetasa (Fig3). Este enzima es claramente distinto de la carbamilfosfato sintetasa constitutiva implicada en la biosíntesis de pirimidinas. El enzima constitutivo está localizado en el citosol, y el inducible en las mitocondrias siendo este último activado por N-acetilglutamato y no inhibido por uridin nucleótidos.

5. El comportamiento de las actividades mitocondriales durante el desarrollo de Artemia salina.

La puesta en marcha del proceso de desarrollo en Artemia a partir de gástrulas durmientes, implica entre otros, dos parámetros básicos: la hidratación de los quistes y la inducción de la respiración. En este contexto se ha estudiado la aparición y el comportamiento de las actividades mitocondriales durante el desarrollo temprano de Artemia (22, 23, 24). Los resultados expuestos en la Tabla 8 indican que a las 24 horas de desarrollo, hay un aumento de unas 25 veces en todas las enzimas mitocondriales ensayadas. El mayor aumento en estas activi-

TABLA 7

Propiedades de las aminoacil-tRNA hidrolasas de A. salina

	<u>Hidrolasa específica</u>	<u>Hidrolasa inespecífica</u>
Niveles durante el desarrollo	Constante	Inducida durante el desarrollo larvario
Peso Molecular	35.000	55.000
Requerimiento de metales	Activada ($\times 3$) por $\uparrow\uparrow$ Mg^{2+} , Mn^{2+} , o Ca^{++}	Requerimiento absoluto (Mg^{2+} , Mn^{2+} o Ca^{++})
Especificidad de sustrato	Restringida. Sólo activa sobre N-acetil Phe-tRNA	Amplia. Activa sobre aminoacil-tRNAs libres ó N-sustituídos
Afinidad por DEAE-Sephadex; molaridad de KCl para elución	0.25 M	0.5-0.6 M

Datos tomados de (19, 20, 21).

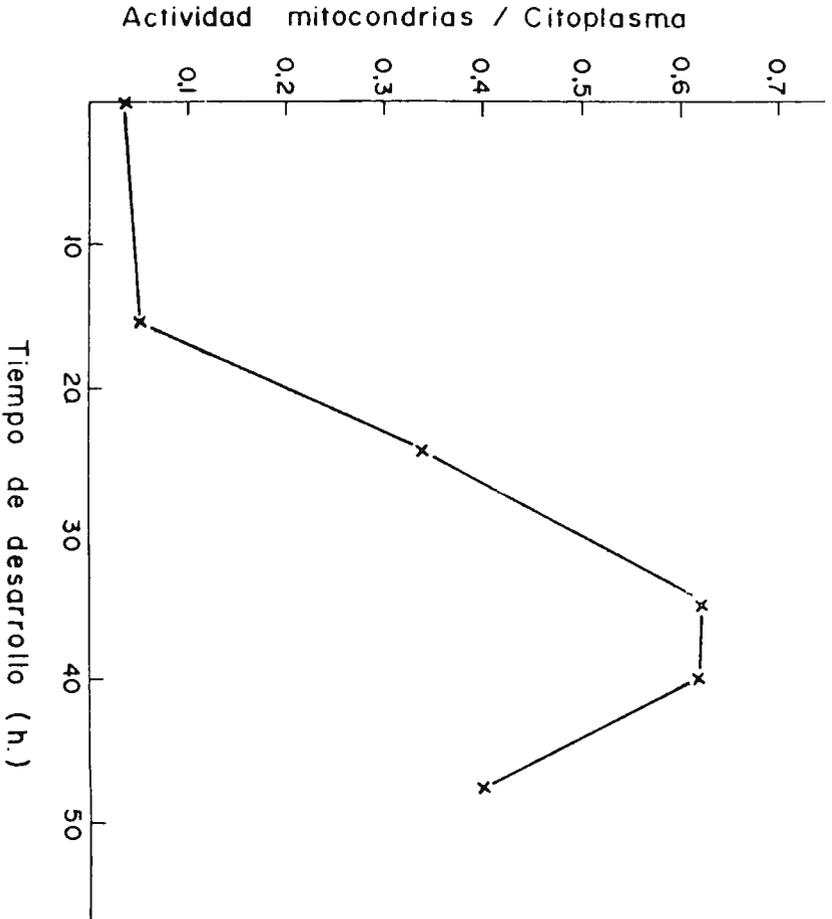


Fig. 3.- Relación de la actividad carbamillfosfato sintetasa mitocondrial y citosólica durante el desarrollo de A. salina.

TABLA 8

Comportamiento de las actividades enzimáticas mitocondriales durante el desarrollo de Artemia.

Enzimas	Unidades/10 ⁶ animales					
	Quietes (hr)			Larvas (hr)		
Citocromo oxidasa	0	4	12	16	24	43
Succinato citocromo <u>c</u> reductasa	2	4	7	18	57	111
Malato deshidrogenasa	0,8	1	2	6	13	10
Isocitrato deshidrogenasa (NADP)	33	66	62	302	837	277
Fumarasa	3	3	8	10	86	42
	4	6	16	62	97	34

Datos tomados de (23).

dades, tiene lugar alrededor de la emergencia de las nauplias (16-24 h) y esta aparición de actividades mitocondriales coincide cronologicamente con la desintegración de las plaquetas de vitelo.

Cuando extractos procedentes de animales en distintos grados de desarrollo se sometieron a fraccionamiento subcelular, se observó un aumento en la sedimentabilidad de las mitocondrias a medida que avanzaba el desarrollo, apreciándose alrededor de la emergencia de las nauplias, un claro aumento de las actividades mitocondriales en las fracciones más pesadas en que sedimentaban las plaquetas de vitelo. La observación de las distintas fracciones subcelulares al microscopio electrónico, muestra que a medida que avanza el desarrollo, en la fracción plaquetaria (2000 xg) van apareciendo plaquetas parcialmente degradadas, que presentan claros con aspecto membranoso (12 h) y ocasionalmente aparecen plaquetas rodeadas de membranas, hasta que alrededor de la emergencia, las plaquetas de vitelo han desaparecido casi completamente de esta fracción y en su lugar se observan mitocondrias. Justo antes y mejor aún inmediatamente después de la emergencia de las larvas, aparecen plaquetas de vitelo en estadios intermedios de degradación, mos-

trando en su interior estructuras semejantes a mitocondrias. La conjunción de los dos tipos de abordajes experimentales, bioquímico y morfológico, ha conducido a la conclusión de que la abrupta aparición de actividades mitocondriales, se debe a la maduración de las mitocondrias almacenadas en las plaquetas de vitelo de los quistes, y no a una biogénesis completa de toda la estructura mitocondrial.

CONCLUSIONES

Los resultados aquí resumidos, ponen de manifiesto la existencia en gástrulas durmientes de Artemia salina ó la inducción durante las primeras fases del desarrollo, de actividades enzimáticas capaces de: a) modificar la cromatina y actuar sobre el DNA; b) modificar los productos de transcripción y actuar sobre determinadas especies de aminoacil-tRNAs; c) intervenir en las vías de síntesis de precursores de ácidos nucleicos y d) actuar sobre los productos de la traducción del mensaje genético. Estas actividades enzimáticas han sido caracterizadas y parcialmente purificadas. Se apunta la posible intervención de estas enzimas como presuntos reguladores de la expresión de la información genética. Se ha caracterizado la propia maquinaria enzimática implicada en el proceso de transcripción, su variación durante el desarrollo de Artemia salina, y se ha obtenido evidencia de que un posible modo de regulación de la transcripción, puede ejercerse a través de cambios en los niveles de las RNA polimerasas implicadas en la síntesis de las distintas especies de RNAs. Aparte de este tipo de control ejercido mediante variación en los niveles de las RNA polimerasas, nuestros resultados apuntan a qué la regulación de la trans-

cripción puede lograrse también mediante cambios de niveles y regulación de la actividad de enzimas capaces de modificar la cromatina o actuar sobre los productos de transcripción. El presunto interés de los dinucleósido polifosfatos como reguladores metabólicos y la abundancia de diguanosintetrafosfato en quistes de Artemia nos llevó también a estudiar actividades enzimáticas capaces de hidrolizar estos compuestos. La puesta en marcha del proceso de desarrollo en Artemia a partir de gástrulas durmientes, implica entre otros dos parámetros básicos: la hidratación de los quistes y la inducción de la respiración. En este contexto se ha estudiado la aparición y el comportamiento de las actividades mitocondriales durante las primeras fases del desarrollo. Se ha obtenido evidencia de que junto a un proceso de maduración mitocondrial, existe como componente muy importante el desvelamiento de estas organelas almacenadas en las plaquetas de vitelo. Finalmente se ha desarrollado una metodología que no sólo es de utilidad en el estudio del desarrollo de Artemia, sino que puede tener aplicación a otros sistemas biológicos

BIBLIOGRAFIA

Incluimos solamente la lista de publicaciones a que ha dado lugar el trabajo que aquí se resume. El lector interesado podrá encontrar en ellas las referencias bibliográficas específicas e información detallada sobre la metodología utilizada.

- 1.- Castell, J.V., Cervera, M. y Marco, R. "A convenient micromethod for the assay of primary amines and proteins with fluorescamine. A reexamination of the conditions of reaction". Anal. Biochem. in the press.
- 2.- Pestaña, A., Castro, R., Castell, J.V. y Marco, R. "Fluorometric assays in the study of nucleic acid-protein interaction. I. The use of diaminobenzoic acid as a reagent of DNA" Anal. Biochem., 90, 543-550 (1978).
- 3.- Castell, J.V., Pestaña, A., Castro, R. y Marco, R. "Fluorometric assays in the study of nucleic acid-protein interaction. II. The use of fluorescamine as a reagent of proteins" Anal. Biochem., 90, 551-561 (1978).
- 4.- Garesse, R., Castell, J.V., Vallejo, C.G. y Marco, R. "A fluorescamine based sensitive method for the

assay of proteinases capable of detecting the initial cleavage steps of a protein. Eur. J. Biochem. in the press.

- 5.- Cano, A., y Pestaña, A. "Regulation of histone acetyltransferase activity during the development of Artemia salina" Develop. Biol., 54, 276-287 (1976).
- 6.- Cano, A., y Pestaña, A. "Purification and properties of a histone acetyltransferase from Artemia salina, highly efficient with H₁ histone. Eur. J. Biochem. 97, 65-72 (1979).
- 7.- Cano, A., Pestaña, A. "Regulation of histone acetylation in Artemia" Proc. Int. Symp. on the Brine Shrimp Artemia salina. Corpus Christi. (1979) in the press.
- 8.- Renart, J. y Sebastián, J. "Characterization and levels of the RNA polymerases during the embryogenesis of Artemia salina" Cell Differentiation, 5, 97-107 (1976).
- 9.- Sebastián, J., Cruces, J., Osuna, C. y Renart, J. "Role of the RNA polymerases in the regulation of transcription during the early development of Artemia

salina. Corpus Christi (1979) in press.

- 10.- Osuna, C., Renart, J. y Sebastián, J. "Proteolytic origin of a modified form of RNA polymerase I from Artemia salina larvae" Biochem. Biophys. Res. Comm. 78, 1390-1396 (1977).
- 11.- Cano, A., Cruces, J., Estepa, I., Gallego, M.E., Günther Sillero, M.A., Heredia, C.F., Llorente, P., Olalla, A., Osuna, C., Pestaña, A., Renart, J., Ruiz, A., Sastre, L., Sebastián, J. y Sillero, A. "Developmental changes of enzyme levels during Artemia salina differentiation" Proc. Symp. on Biochemistry of Artemia Development. (J.C. Bagshaw and A.H. Warner eds.) University Micro. Int. 1979. in press.
- 12.- Vallejo, C.G., Lobatón, C.D., Quintanilla, M., Sillero, A., y Sillero, M.A.G. "Dinucleosidetriphosphatase in rat liver and Artemia salina" Biochim. Biophys. Acta, 438, 304-309 (1976)
- 13.- Sillero, M.A.G., Villalba, R., Moreno, A., Quintanilla, M., Lobatón, C.D. y Sillero, A. "Dinucleosidetriphosphatase from rat liver: purification and properties" Eur. J. Biochem. 76, 331-337 (1977)

- 14.- Sebastián, J. y Heredia, C.F. "Purification and properties of a ribonuclease induced during the early larval development of Artemia salina" Eur. J. Biochem. 90, 405-411 (1978).
- 15.- Sastre, L. y Sebastián, J. "Poly (A) polymerase activity during the early development of Artemia salina" Proc. Int. Symp. on the Brine Shrimp Artemia salina. Corpus Christi (1979), in press.
- 16.- Osuna, C., Olalla, A., Sillero, A., Sillero, M.A.G. y Sebastián, J. "Induction of multiple proteases during the early larval development of Artemia salina" Develop. Biol., 61, 94-103 (1977).
- 17.- Olalla, A., Osuna, C., Sebastián, J., Sillero, A. y Sillero, M.A.G. "Purification and properties of three proteases from the larvae of the brine shrimp Artemia salina" Biochim. Biophys. Acta, 523, 181-190 (1978).
- 18.- Günther Sillero, M.A., Borillo, S.L., Dominguez, E., Olalla, A., Osuna, C., Sebastián, J. y Sillero, A. "Multiple proteolytic enzymes in Artemia salina" Proc. Int. Symp. on the Brine Shrimp Artemia salina. Corpus Christi (1979), in press.

- 19.- Miralles, J., Sebastián, J. y Heredia, C.F. "Independent temporal expression of two N-substituted aminoacyl-tRNA hydrolases during the development of Artemia salina" Biochim. Biophys. Acta, 518, 326-333 (1978).
- 20.- Coloma, A. y Heredia, C.F. "N-acetilfenilalanil-tRNA hidrolasa de levadura" en Avances de la Bioquímica en España (eds. Cornudella, L., Heredia, C.F., Oró, J. y Sols, A.) Ed. Salvat (1977) pp 83-95.
- 21.- Coloma, A., y Heredia, C.F. "N-acetylphenylalanyl-tRNA hydrolase from yeast. Purification and properties" Eur. J. Biochem., 92, 597-603 (1978).
- 22.- Vallejo, C.G. y Marco, R. "Unmasking of mitochondrial precursors stored in the yolk platelets of Artemia salina dormant gastrulae" Genetics and Biogenesis of Chloroplast and Mitochondria Th Bücher et al. eds. Elsevier/Noth Holland, Biomedical Press, Amsterdam, (1976), p. 847-850.
- 23.- Vallejo, C.G., Günther Sillero, M.A. y Marco, R. "Mitochondrial maturation during Artemia salina embryogenesis. General description of the process".

Cell Mol. Biol. in the press.

- 24.- Marco, R. y Vallejo, C.G. "Mitochondrial biogenesis during Artemia salina development: Storage of precursors in yolk platelets" J. Cell Biol., 70, 321a (1976)
- 25.- Sebastián, J., Osuna, C., Olalla, A., Renart, J., Cruces, J. y Sillero, M.A.G. "In vitro proteolytic inactivation on the RNA polymerases during the development of Artemia salina" J. Cell Biol., 70, 340a (1976)
- 26.- Cano, A., Carratalá, M., Castell, J.V., Cervera, M., Llorente, P., Manteca, M., Marco, R., Osuna, C., Pestaña, A., Renart, J., Ruiz, A., Sebastián, J., y Vallejo, C.G. "Estudios bioquímicos sobre el desarrollo de la Artemia salina en Avances de la Bioquímica en España (eds. Cornudella, Heredia, C.F., Oró, J. y Sols, A) Ed. Salvat (1977), pp. 97-109
- 27.- Olalla, A., Renart, J., Sillero, M.A.G. y Sillero, A. "Metabolismo de las plaquetas de vitelo durante el desarrollo de la Artemia salina" en Avances de la Bioquímica en España (eds. Cornudella, L.,

Heredia, C.F., Oró, J. y Sols, A.) Ed. Salvat (1977)
pp. 111-120.

28.-Coloma, A., Pascual, V. y Heredia, C.F. "Sensitivity of ribosomal bound N-acetylphenylalanyl-tRNA to hydrolysis by a specific hydrolase" Biochim. Biophys. Acta. 518, 525-529 (1978)

29.-Pestaña, A. "DNA-bound proteases: Partial characterization of proteolytic activities in commercial sources of DNA" Biochim. Biophys. Acta. 521, 547-556 (1978).



FUNDACION JUAN MARCH
SERIE UNIVERSITARIA

TITULOS PUBLICADOS

Serie Marrón

(Filosofía, Teología, Historia, Artes Plásticas, Música, Literatura y Filología)

- | | |
|--|--|
| 1 Fierro, A.:
Semántica del lenguaje religioso. | 60 Alcalá Galvé, A.:
El sistema de Servet. |
| 10 Torres Monreal, F.:
El teatro español en Francia (1935-1973). | 61 Mourão-Ferreira, D., y Ferreira, V.:
Dos estudios sobre literatura portuguesa contemporánea. |
| 12 Curto Herrero, F. Fco.:
Los libros españoles de caballerías en el siglo XVI. | 62 Manzano Arjona, M.ª:
Sistemas intermedios. |
| 14 Valle Rodríguez, C. del:
La obra gramatical de Abraham Ibn Ezra. | 67 Acero Fernández, J. J.:
La teoría de los juegos semánticos. Una presentación. |
| 16 Solís Santos, C.:
El significado teórico de los términos descriptivos. | 68 Ortega López, M.:
El problema de la tierra en el expediente de Ley Agraria. |
| 18 García Montalvo, P.:
La imaginación natural (estudios sobre la literatura fantástica norteamericana). | 70 Martín Zorraquino, M.ª A.:
Construcciones pronominales anómalas. |
| 21 Durán-Lóriga, M.:
El hombre y el diseño industrial. | 71 Fernández Bastarache, F.:
Sociología del ejército español en el siglo XIX. |
| 32 Acosta Méndez, E.:
Estudios sobre la moral de Epicuro y el Aristóteles esotérico. | 72 García Casanova, J. F.:
La filosofía hegeliana en la España del siglo XIX. |
| 40 Estefanía Alvarez, M.ª del D. N.:
Estructuras de la épica latina. | 73 Meya Llopart, M.:
Procesamiento de datos lingüísticos. Modelo de traducción automática del español al alemán. |
| 53 Herrera Hernández, M.ª T.:
Compendio de la salud humana de Johannes de Ketham. | 75 Artola Gallego, M.:
El modelo constitucional español del siglo XIX. |
| 54 Flaquer Montequí, R.:
Breve introducción a la historia del Señorío de Buitrago. | 77 Almagro-Gorbea, M., y otros:
C-14 y Prehistoria de la Península ibérica. |

- 94 Falcón Márquez, T.:
La Catedral de Sevilla.
- 98 Vega Cernuda, S. D.:
J. S. Bach y los sistemas contrapuntísticos.

- 100 Alonso Tapia, J.:
El desorden formal de pensamiento en la esquizofrenia.

Serie Verde

(Matemáticas, Física, Química, Biología, Medicina)

- 2 Mulet, A.:
Calculador en una operación de rectificación discontinua.
- 4 Santiuste, J. M.:
Combustión de compuestos oxigenados.
- 5 Vicent López, J. L.:
Películas ferromagnéticas a baja temperatura.
- 7 Salvá Lacombe, J. A.:
Mantenimiento del hígado dador in vitro en cirugía experimental.
- 8 Plá Carrera, J.:
Estructuras algebraicas de los sistemas lógicos deductivos.
- 11 Drake Moyano, J. M.:
Simulación electrónica del aparato vestibular.
- 19 Purroy Unanua, A.:
Estudios sobre la hormona Natriurética.
- 20 Serrano Molina, J. S.:
Análisis de acciones miocárdicas de bloqueantes Beta-adrenérgicos.
- 22 Pascual Acosta, A.:
Algunos tópicos sobre teoría de la información.
- 25 I Semana de Biología:
Neurobiología.
- 26 I Semana de Biología:
Genética.
- 27 I Semana de Biología:
Genética.
- 28 Zugasti Arbizu, V.:
Analizador diferencial digital para control en tiempo real.
- 29 Alonso, J. A.:
Transferencia de carga en aleaciones binarias.
- 30 Sebastián Franco, J. L.:
Estabilidad de osciladores no sinusoidales en el rango de microondas.
- 39 Blasco Olcina, J. L.:
Compacidad numerable y pseudocompacidad del producto de dos espacios topológicos.
- 44 Sánchez Rodríguez, L.:
Estudio de mutantes de saccharomyces cerevisiae.
- 45 Acha Catalina, J. I.:
Sistema automático para la exploración del campo visual.
- 47 García-Sancho Martín, F. J.:
Uso del ácido salicílico para la medida del pH intracelular.
- 48 García García, A.:
Relación entre iones calcio, fármacos ionóforos y liberación de noradrenalina.
- 49 Trillas, E., y Alsina, C.:
Introducción a los espacios métricos generalizados.
- 50 Pando Ramos, E.:
Síntesis de antibióticos aminoglicosídicos modificados.
- 51 Orozco, F., y López-Fanjul, C.:
Utilización óptima de las diferencias genéticas entre razas en la mejora.

- 52 Gallego Fernández, A.:
Adaptación visual.
- 55 Castellet Solanas, M.:
Una contribución al estudio de las teorías de cohomología generalizadas.
- 56 Sánchez Lazo, P.:
Fructosa 1,6 Bisfosfatasa de hígado de conejo: modificación por proteasas lisosomales.
- 57 Carrasco Llamas, L.:
Estudios sobre la expresión genética de virus animales.
- 59 Afonso Rodríguez, C. N.:
Efectos magneto-ópticos de simetría par en metales ferromagnéticos.
- 63 Vidal Costa, F.:
A la escucha de los sonidos cerca de T_λ en el 4_{He} líquido.
- 65 Andréu Morales, J. M.:
Una proteína asociada a membrana y sus subunidades.
- 66 Blázquez Fernández, E.:
Desarrollo ontogénico de los receptores de membrana para insulina y glucagón.
- 69 Vallejo Vicente, M.:
Razas vacunas autóctonas en vías de extinción.
- 76 Martín Pérez, R. C.:
Estudio de la susceptibilidad magnetoeléctrica en el Cr_2O_3 policristalino.
- 80 Guerra Suárez, M.^a D.:
Reacción de Amidas con compuestos organoaluminicos.
- 82 Lamas de León, L.:
Mecanismo de las reacciones de iodación y acoplamiento en el tiroides.
- 84 Repollés Moliner, J.:
Nitrosación de aminas secundarias como factor de carcinogénesis ambiental.
- 86 II Semana de Biología:
Flora y fauna acuáticas.
- 87 II Semana de Biología:
Botánica.
- 88 II Semana de Biología:
Zoología.
- 89 II Semana de Biología:
Zoología.
- 91 Viéitez Martín, J. M.:
Ecología comparada de dos playas de las Rías de Pontevedra y Vigo.
- 92 Cortijo Mérida, M., y García Blanco, F.:
Estudios estructurales de la glucógeno fosforilasa b.
- 93 Aguilar Benítez de Lugo, E.:
Regulación de la secreción de LH y prolactina en cuadros anovulatorios experimentales.
- 95 Bueno de las Heras, J. L.:
Empleo de polielectrolitos para la floculación de suspensiones de partículas de carbón.
- 96 Núñez Alvarez, C., y Ballester Pérez, A.:
Lixiviación del cinabrio mediante el empleo de agentes complejantes.

(Geología, Ciencias Agrarias, Ingeniería, Arquitectura y Urbanismo)

- | | |
|---|--|
| <p>3 Velasco, F.:
Skarns en el batolito de Santa Olalla.</p> <p>6 Alemán Vega, J.:
Flujo inestable de los polímeros fundidos.</p> <p>9 Fernández-Longoria Pinazo, F.:
El fenómeno de inercia en la renovación de la estructura urbana.</p> <p>13 Fernández García, M.^a P.:
Estudio geomorfológico del Macizo Central de Gredos.</p> <p>15 Ruiz López, F.:
Proyecto de inversión en una empresa de energía eléctrica.</p> <p>23 Bastarache Alfaro, M.:
Un modelo simple estático.</p> <p>24 Martín Sánchez, J. M.:
Moderna teoría de control: método adaptativo-predictivo.</p> <p>31 Zapata Ferrer, J.:
Estudio de los transistores FET de microondas en puerta común.</p> <p>33 Ordóñez Delgado, S.:
Las Bauxitas españolas como mena de aluminio.</p> <p>35 Juvé de la Barreda, N.:
Obtención de series aneuploides en variedades españolas de trigo común.</p> <p>36 Alarcón Alvarez, E.:
Efectos dinámicos aleatorios en túneles y obras subterráneas.</p> <p>38 Lasa Dolhagaray, J. M., y Silván López, A.:
Factores que influyen en el espigado de la remolacha azucarera.</p> <p>41 Sandoval Hernández, F.:
Comunicación por fibras ópticas.</p> | <p>42 Pero-Sanz Elorz, J. A.:
Representación tridimensional de texturas en chapas metálicas del sistema cúbico.</p> <p>43 Santiago-Alvarez, C.:
Virus de insectos: multiplicación, aislamiento y bioensayo de Baculovirus.</p> <p>46 Ruiz Altisent, M.:
Propiedades físicas de las variedades de tomate para recolección mecánica.</p> <p>58 Serradilla Manrique, J. M.:
Crecimiento, eficacia biológica y variabilidad genética en poblaciones de dípteros.</p> <p>64 Farré Muntaner, J. R.:
Simulación cardiovascular mediante un computador híbrido.</p> <p>79 Fraga González, B. M.:
Las Giberelinas. Aportaciones al estudio de su ruta biosintética.</p> <p>81 Yáñez Parareda, G.:
Sobre arquitectura solar.</p> <p>83 Díez Viejobueno, C.:
La Economía y la Geomatemática en prospección geoquímica.</p> <p>90 Pernas Galí, F.:
Master en Planificación y Diseño de Servicios Sanitarios.</p> <p>97 Joyanes Pérez, M.^a G.:
Estudios sobre el valor nutritivo de la proteína del mejillón y de su concentrado proteico.</p> <p>99 Fernández Escobar, R.:
Factores que afectan a la polinización y cuajado de frutos en olivo (Olea europaea L.).</p> |
|---|--|

Serie Azul

(Derecho, Economía, Ciencias Sociales, Comunicación Social)

- | | | | |
|----|---|----|---|
| 17 | Ruiz Bravo, G.:
Modelos econométricos en el enfoque objetivos-instrumentos. | 74 | Hernández Lafuente, A.:
La Constitución de 1931 y la autonomía regional. |
| 34 | Durán López, F.:
Los grupos profesionales en la prestación de trabajo: obreros y empleados. | 78 | Martín Serrano, M., y otros:
Seminario sobre Cultura en Periodismo. |
| 37 | Lázaro Carreter, F., y otros:
Lenguaje en periodismo escrito. | 85 | Sirera Oliag, M. ^a J.:
Las enseñanzas secundarias en el País Valenciano. |

