

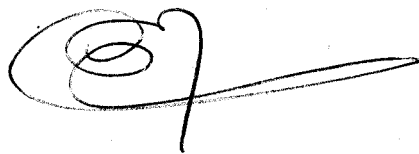
TD 521

R. 3237

DPO. ZOOLOGIA
FAC. BIOLOGIA

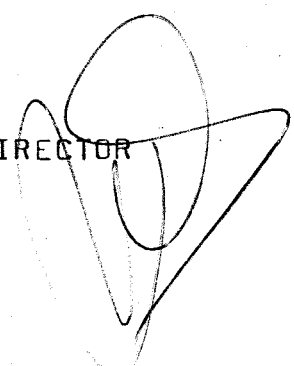
DISTRIBUCION DEL ADN EN LA
AMITOSIS MACRONUCLEAR DE
LAURENTIA ACUMINATA (CILIA-
DO HIPOTRICO).

Trabajo presentado para optar al Grado de Doctor
en Ciencias, sección de Biológicas, por la Licen-
ciada CONCEPCION MORENZA AGUAYO




Sevilla, junio de 1.979

DIRECTOR



Dr. Antonio Torres

PONENTE



Prof. Dr. Julio Pérez-
Silva

A mis padres

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Biología de la Universidad de Sevilla.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento al Profesor D. Julio Pérez-Silva y al Dr. Antonio Torres Rueda por su orientación, así como por la formación científica recibida durante el desarrollo de esta Tesis.

Asimismo, quiero agradecer su desinteresada ayuda a la Dra. Concepción Fedriani Iriso y a mis compañeros Joaquín Nieto Gutierrez y J. Carlos Gutierrez Fernández.

Igualmente, doy las gracias al resto de mis compañeros por el inapreciable apoyo moral recibido.

Por último, agradezco el apoyo económico prestado por la Universidad de Sevilla.

I N D I C E

1.- INTRODUCCION	1
1.1.- Ciclo celular de Ciliados	3
1.1.1.- División nuclear en Ciliados	4
1.1.2.- Interfase de Ciliados	7
1.2.- Regulación del ciclo celular	12
2.- MATERIAL Y METODOS	24
2.1.- Materiales	25
2.1.1.- Organismos utilizados	25
2.1.2.- Sustancias químicas	25
2.2.- Métodos	26
2.2.1.- Cultivo de los organismos	26
2.2.1.1.- Cultivo de <u>Chlorogonium</u> .	26
2.2.1.2.- Mantenimiento de <u>Lau-</u> <u>rentia acuminata</u>	27
2.2.1.2.1.- Medio de cultivo	27

2.2.1.2.2.- Preparación	
del alimento ..	27
2.2.1.2.3.- Condiciones	
de cultivo	27
2.2.1.3. Cultivo de <u>Laurentia</u>	
<u>acuminata</u> para el estu-	
dio del contenido de ADN	
macronuclear y su reparto	
durante la división	27
2.2.2.- Observaciones "in vivo"	28
2.2.2.1.- Observaciones al micros-	
copio estereoscópico	28
2.2.2.2.- Observaciones al micros-	
copio óptico	28
2.2.3.- Tinciones citológicas	29
2.2.3.1.- Tinción con orceína	
acética	29
2.2.3.2.- Tinción de Feulgen	30
2.2.3.3.- Tinción de orgánulos	
superficiales	32

2.2.4.- Tratamiento con urea	35
2.2.5.- Determinación del contenido de ADN en los núcleos	35
3.- RESULTADOS	36
3.1.- Variabilidad del contenido de ADN en cultivos de <u>Laurentia acuminata</u>	39
3.2.- Reparto de ADN macronuclear durante la división de <u>L. acuminata</u>	41
3.3.- Evolución del contenido de ADN macro- nuclear en cultivos clónicos	52
3.4.- Reparto de ADN macronuclear en una división desigual provocada por daño cortical	57
3.5.- Evolución del contenido de ADN macro- nuclear en cultivos clónicos de los productos de la división desigual	64
3.6.- Regulación del contenido de ADN	76
4.- DISCUSION	101

5.- CONCLUSIONES	116
6.- BIBLIOGRAFIA	121

1. INTRODUCCION.

La división celular, como es bien sabido, lleva consigo dos tipos de procesos: reparto citoplasmático y reparto del material genético entre las dos células hijas resultantes. La distribución del material citoplasmático se realiza por el proceso de "citocinesis". El reparto de material genético se efectúa a través de la división nuclear, que puede ser mitótica o amitótica.

El periodo comprendido entre dos divisiones sucesivas se denomina "interfase" y durante él tienen lugar una serie de procesos importantes como son la síntesis de ADN, ARN y proteínas mediante las cuales se duplica el material celular.

La síntesis de ADN se produce durante un periodo de la interfase, estando intercalada entre los periodos G_1 y G_2 (26), por tanto la interfase quedaría dividida en:

G_1 : Período comprendido entre el final de la división y el comienzo de la síntesis de ADN.

S: Período de síntesis de ADN.

G₂: Período postsintético, comprende desde el final del periodo S hasta el comienzo de la división.

Al conjunto de la interfase y la división, se denomina ciclo celular.

1.1.- Ciclo celular de Ciliados

En Ciliados, el ciclo celular también se compone de interfase y división. En este grupo de protozoos, la división es transversal dando una célula hija anterior que se llama "prótero" y otra posterior denominada "opisto".

Los procesos que tienen lugar durante el ciclo celular de Ciliados, se pueden dividir en dos grandes grupos: corticales y nucleares.

Los procesos corticales reciben el nombre de "morfo genéticos" y durante ellos se forma una dotación completa de los orgánulos corticales del opisto y una dotación total o parcial del prótero.

Como es sabido, los Ciliados poseen dos tipos de núcleos: macronúcleo y micronúcleo. Debido a esta dualidad nuclear, los fenómenos cariológicos en estos protozoos, son bastante más complejos que en otro tipo de células.

1.1.1.- División nuclear en Ciliados

En cuanto a la división nuclear, no existe sincronía entre macro y micronúcleo, dividiéndose normalmente el micronúcleo antes que el macronúcleo (58).

Por otra parte, el micronúcleo se divide mitóticamente produciéndose dos micronúcleos hijos con idéntica cantidad de ADN, mientras que el macronúcleo presenta una división amitótica que, generalmente, consiste en una fragmentación en dos mitades. Debido a este tipo de división sin aparato mitótico, los macronúcleos hijos reciben aproximada pero no exactamente, la misma cantidad de ADN (53).

Antes de la fragmentación macronuclear se produce una condensación de la cromatina que, en el caso de que en la célula vegetativa haya más de un macronúcleo, va precedida de una fusión en un solo cuerpo macronuclear (51).

Inmediatamente antes de la división macronuclear, o al comienzo de la misma, se ha observado que los nucleolos se fragmentan en pequeños gránulos que acaban desapareciendo. Mientras tanto, la síntesis de ARN puede anularse y reaparecer en estados posteriores de la división (59). Así, en el ciliado Khalia simplex reaparecen los nucleolos y comienza la síntesis de ARN, cuando ya están formados los macronúcleos hermanos (46).

Otro cambio observado frecuentemente en el macronúcleo durante la división, es el paso de la cromatina de

una estructura granular uniforme a una estructura alineada en la dirección de su alargamiento (39, 59). En otros casos, la cromatina forma agregados esféricos denominados unidades de segregación o "subnúcleos" (45).

En algunos ciliados se han descrito estructuras filamentosas que aparecen durante la elongación del macronúcleo. En 1957, SCHWARTZ (60) encontró que durante la división de Paramecium aurelia aparecía en la misma dirección del alargamiento macronuclear, una sustancia fibrilar birrefringente que parecía ser el sistema motor de dicho alargamiento.

Este hecho ha sido corroborado en Tetrahymena pyriformis por TAMURA y col. (67), y WILLIAMS y WILLIAMS (75) que observaron la presencia de microtúbulos orientados paralelamente al eje del macronúcleo en división.

La microscopía electrónica (35, 54), revela la existencia de uniones de estos microtúbulos con la membrana nuclear y la cromatina, sin embargo, se duda de que estas conexiones sean decisivas en la segregación del genoma entre las células hijas, pues hay pruebas de la ausencia de un mecanismo preciso de reparto del ADN macronuclear. Así, en 1958 Mc DONALD (39) y en 1968 CLEFFMANN (7), mediante estudios citofotométricos encuentran que en Tetrahymena pyriformis la diferencia media de contenido de ADN macronuclear entre células hermanas es de 8%.

KIMBALL y BARKA (47), también hallan en el ciliado Paramecium aurelia una diferencia media de 8% entre las dos células hijas de una división.

CHEISSIN y col. en Paramecium caudatum (6) y KUDRJAUTSEN en Paramecium putrinum (37), encontraron diferencias del mismo orden de magnitud.

RUTHMANN en 1964 (55), y ZECH en 1966 (81) observaron que en Bursaria truncatella, esta diferencia en contenido entre las dos células hermanas, podía alcanzar valores muy altos; una célula podía tener 2-4 veces más ADN que su hermana.

EIDE en 1968 (15), observa en Ichthyophthirius multifiliis (que experimenta división múltiple), que unas células hijas pueden recibir una cantidad de ADN hasta tres veces mayor que otras.

También se han hallado diferencias en contenido de ADN entre células hermanas de Euplotes eurystomus, WITT en 1977 (76) da una diferencia media de un 11,6%. Este ha sido el único ciliado hipotrico que hasta la fecha ha sido estudiado en este sentido.

Por otra parte, no está claro que esta distribución desigual esté inclinada a favor del prótero o del opisto, ya que estos estudios se han realizado por medidas de ADN en preparaciones teñidas previamente según el método de Feulgen,

y en tales preparaciones, es difícil distinguir cual es el producto anterior o posterior de la división.

Sin embargo, en Bursaria truncatella (81), el prótero se distingue perfectamente del opisto por su menor tamaño. En este caso, se ha observado que el prótero recibe menos cantidad de ADN en la división.

Así mismo, DOERDER y FRANKEL (13) utilizando un mutante de forma cónica de Tetrahymena pyriformis, que al dividirse daba un opisto de menor tamaño que el prótero, encontraron que el reparto de ADN era desigual y aleatorio entre prótero y opisto.

La división macronuclear, por el hecho de ser desigual, implica necesariamente una segregación al azar del genoma.

ORIAS y FLAKS en 1975 (47) observaron que en Tetrahymena pyriformis la razón de aparición de un mutante termosensible recesivo no era significativamente diferente de una segregación al azar y concluyeron que si la segregación era aleatoria para este gen, podría serlo para todos los genes de este individuo.

1.1.2.- Interfase de Ciliados

Debido a la dualidad nuclear que presentan los Ciliados, al efectuar el estudio de la interfase, hay que esta-

blecer los períodos G_1 , S y G_2 tanto para el macronúcleo como para el micronúcleo.

Para fijar los distintos períodos interfásicos de ambos núcleos, hay que determinar en que momento empieza y acaba la síntesis de ADN, cuestión que se puede abordar por medio de técnicas autorradiograficas o citofotométricas.

El primer hecho notable es la falta de sincronismo entre los períodos interfásicos correspondientes del macro y micronúcleo; de tal manera que el periodo S del macronúcleo puede no coincidir con el del micronúcleo tanto en su comienzo como en su duración (40, 50). Normalmente, la síntesis de ADN en el micronúcleo es mucho más breve que en el macronúcleo (52, 77). En Stentor (25), el período S macronuclear es especialmente largo, ocupa practicamente toda la interfase y los periodos G_1 y G_2 son practicamente nulos.

A pesar de los numerosos trabajos sobre la interfase de Ciliados, nos centraremos exclusivamente en los Ciliados Hipotricos por ser este el grupo al que pertenece el protozoo objeto de nuestro estudio.

La fase S macronuclear en Hipotricos, es fácil de determinar debido a que durante la replicación del ADN, los núcleos son recorridos por las "bandas de replicación", facilmente visualizables empleando métodos sencillos de tinción.

El número de bandas por núcleo y el sentido en que se desplazan, suele ser característico de cada género. Así, en Euplotes (73) aparecen dos bandas, una en cada extremo del núcleo, que avanzan hasta el centro. En Aspidisca (67) sin embargo, el movimiento es opuesto, parten del centro y se dirigen a los extremos.

Cuando hay varios macronúcleos, las bandas de reorganización, aparecen simultáneamente en todos.

TURNER en 1930 (73), estudió la estructura de las bandas en Euplotes, y observó dos zonas: la anterior, que se coloreaba intensamente con Feulgen, y la posterior que lo hacía debilmente.

El significado de las bandas de reorganización, no fué establecido hasta 1959 por GALL (23), el cual por medio de la citofotometría y la autorradiografía demostró que el ADN era duplicado al paso de las mismas.

Más tarde, PRESCOTT y KIMBALL (49) con pulsos cortos de material radiactivo, demostraron que el ADN de Euplotes se sintetizaba en la parte más anterior de la zona posterior de la banda.

Mediante estudios al microscopio electrónico (36) se ha observado que inmediatamente delante de la banda de reorganización, los cuerpos cromatínicos macronúcleares se de-

sintegran en microfibrillas densamente empaquetadas de un grosor de $110 \overset{0}{\text{Å}}$.

En la zona posterior de la banda, las fibrillas desaparecen bruscamente, probablemente debido a la excisión en subfibrillas que presentan un diámetro de $50 \overset{0}{\text{Å}}$ y una baja densidad electrónica. Es precisamente en esta zona, donde tiene lugar la replicación del ADN.

En cuanto a los estudios sobre la duración de los distintos períodos del ciclo celular, de los Ciliados Hipotricos, cabe destacar una serie de ellos:

JERKA-ÓZIADOSZ y FRANKEL (31) encontraron que Urostyla weissei, tiene un período G_1 macronuclear de seis horas, el período S dura cuatro horas, el G_2 la hora siguiente y la división una hora y media. En cambio el micronúcleo presenta un ciclo diferente; su período G_1 comprende las nueve horas primeras y su período S dura aproximadamente una hora y media. Este núcleo no posee período G_2 .

AMMERMANN (1), ha demostrado mediante autorradiografía y citofotometría que en Stylonychia mytilus el período S macronuclear, ocupa la segunda mitad de la interfase y que no hay período G_2 en el macronúcleo. Por el contrario, el período G_1 del micronúcleo es muy largo, ocupa las tres cuartas partes del ciclo celular, el S una hora y media y tampoco existe el G_2 .

RUTHMANN (56) encontró que en Keronopsis rubra el período S macronuclear está situado en la segunda mitad de la interfase, no teniendo el macronúcleo período G_2 . La síntesis de ADN micronuclear se produce durante el período G_1 macronuclear y tampoco existe fase G_2 en el micronúcleo.

PRESCOTT y col. (50) han demostrado que en Euplotes eurystomus, la síntesis de ADN micronuclear comienza inmediatamente después de la telofase y se prolonga hasta inmediatamente antes de la división macronuclear. El período S macronuclear ocupa el 75% del ciclo celular, y no existe período G_2 .

SALVANO (57), por medio de estudios citofotométricos con Euplotes crassus, obtiene resultados similares a los que obtienen PRESCOTT y col. con E. eurystomus.

NIETO y TORRES (44), estudiaron con ayuda de la citofotometría el ciclo celular de Gastrostyla steinii y encontraron que el período G_1 macronuclear dura aproximadamente cinco horas, el S las siguientes cuatro horas y no hay G_2 apreciable. El período S micronuclear coincide con la segunda mitad del S macronuclear, y tampoco existe período G_2 .

Estos resultados, son similares a los encontrados en el ciclo celular de Laurentia acuminata (71) en el cual, el período G_1 macronuclear dura cuatro horas y media, el S unas cuatro horas y el período G_2 es prácticamente inaprecia-

ble. El micronúcleo en este hipotrico, comienza la síntesis a las siete horas del ciclo y tiene una duración aproximada de hora y media, el período G_2 no existe.

1.2.- Regulación del ciclo celular

Otro aspecto, quizás el más interesante, del estudio del ciclo celular es el que se refiere a la determinación de las dependencias entre los diferentes períodos del ciclo, y de los factores que inducen el comienzo de los mismos. Estos estudios se han abordado utilizando mutantes, que tienen alterado su ciclo celular, o bien provocando alteraciones en el ciclo mediante agentes físicos o químicos o por micromanipulación.

Parece claro, que la replicación del macro y micronúcleo, están sujetas a mecanismos de control diferentes. La síntesis de ADN y la mitosis del micronúcleo están estrechamente relacionadas con la morfogénesis oral y son independientes de la división celular.

En efecto, en Urostyla weissei (31), Stylonychia mytilus (61) y Laurentia acuminata (70), cuando se produce una morfogénesis de regeneración por daño cortical, hay síntesis de ADN y mitosis micronuclear, bloqueándose la síntesis de ADN macronuclear y la división celular.

También, en Tetrahymena pyriformis (18) empleando

mutantes termosensibles, se ha observado que la morfogénesis oral está siempre acoplada a una división micronuclear y es independiente de la división macronuclear.

En cuanto a la división macronuclear, a diferencia de la micronuclear, puede acontecer sin previa síntesis de ADN. Así, se han observado amitosis macronucleares durante el exquistamiento y la regeneración de L. acuminata sin que exista una previa duplicación del ADN (24, 70).

Se ha visto también que la línea de citocinesis es independiente de la de fragmentación macronuclear. DOERDER y col. en 1975 (13) observa en un mutante de forma cónica de T. pyriformis que la línea de fragmentación del macronúcleo no coincide con la línea de división celular. Un resultado similar se ha obtenido con L. acuminata (70). Cuando este ciliado se somete a un tratamiento con urea durante el último tercio del período S macronuclear, se produce una división desigual que da lugar a un prótero desprovisto de la parte anterior de la ZAM (zona adoral de membranelas) y de menor tamaño que el opisto. En esta división, la línea de citocinesis está desplazada hacia la zona anterior de la célula madre mientras que la línea de fragmentación macronuclear, ocupa una posición central.

Al igual que ocurre en las demás células, la iniciación de la replicación del ADN es sensible a la Actinomicina D y a inhibidores de la síntesis de proteínas (9, 80).

Algunos experimentos con Stentor (19) han demostrado una emigración de proteínas desde el citoplasma al núcleo; estas proteínas parecen ser enzimas necesarias para la iniciación de la síntesis de ADN.

Hay numerosas pruebas que apoyan la existencia de un control citoplasmático sobre la síntesis de ADN macronuclear. Así, DE TERRA (68), trabajando con Stentor, observó que, cuando se trasplanta un macronúcleo que no está sintetizando ADN a un citoplasma cuyo núcleo estaba en período S, se produce una activa síntesis de ADN en el núcleo trasplantado. De manera complementaria, cuando se trasplanta un macronúcleo en síntesis a un citoplasma de una célula que no está en síntesis, se bloquea el período S del macronúcleo trasplantado.

Por otra parte, el comienzo del período S parece estar relacionado con un desequilibrio de la relación núcleo/citoplasma. Así, trabajando con Tetrahymena pyriformis, WORTHINGTON y col. (79) encuentran que el cociente del contenido de ADN macronuclear y el peso seco del citoplasma en G₁ tiene un valor constante; cuando esta relación baja, comienza el período S macronuclear. El descenso de este valor se debe a que, durante el período G₁ macronuclear, hay un crecimiento citoplasmático no acompañado por un aumento en la cantidad de ADN. Cuando células en G₁ se exponen durante 10 horas a HU (hidroxiurea, inhibidor de la síntesis de ADN), la razón núcleo/citoplasma baja puesto que el citoplasma no detiene su crecimiento. Cuando el inhibidor es retirado, hay un periodo de recuperación

que se caracteriza por una síntesis activa de ADN, de tal manera que el contenido de ADN se cuadriplica y se restablece la relación núcleo/ citoplasma.

FRAZIER, en 1973 (19), también muestra la importancia de la relación N/C en el comienzo de la síntesis de ADN macronuclear en Stentor coeruleus. En este ciliado, al disminuir la relación N/C, eliminando nódulos nucleares, se desencadena la síntesis de ADN. Si la razón N/C se restablece (introduciéndole los nódulos de nuevo), se impide dicha síntesis.

Existen numerosos trabajos que sugieren que un bajo contenido de ADN del macronúcleo permite una rápida iniciación de la síntesis de ADN pero, antes de abordar esta cuestión, nos parece interesante resaltar que una de las características del macronúcleo de los ciliados es la considerable variabilidad en el contenido de ADN que existe en los diferentes individuos de una población.

En 1959, KIMBALL y BARKA (33), trabajando con Paramecium aurelia, encontraron un coeficiente de variación de contenido de ADN del 11% entre diferentes individuos de la misma población y teñidos en el mismo portaobjetos. En principio pensaron que esta variabilidad era debida a errores en las medidas pero, efectuando medidas sobre un mismo núcleo, comprobaron que el método tenía un error máximo de un 2%.

CLEFFMANN, en 1968 (7), encontró una variabilidad de un 18% entre los macronúcleos de una población de Tetrahymena pyriformis, resultados que fueron confirmados en 1972 por

ANDERSEN (2) y en 1973 por JEFFERY y FRANKEL (30).

MORAT (42), mediante estudios citofotométricos, encuentra una alta variabilidad en el contenido de ADN de los macronúcleos en G₁ de Colpidium campylum. Asimismo, TORRES (71) encuentra resultados similares en el ciliado hipotrico Laurentia acuminata.

Se ha establecido la hipótesis de que esta variabilidad en contenido se debe a la distribución desigual de ADN macronuclear en la división (33).

Algunos autores han estudiado las diferencias en contenido de ADN entre células hermanas y entre pares de individuos tomados al azar de una población en G₁, y han observado que la diferencia poblacional es mayor que la que hay entre pares hermanos (33, 7,76).

Según WITT (76), estos resultados sugieren que, puesto que los pares hermanos son producto de una misma división y los pares escogidos al azar, presumiblemente, están separados por más de una división, la mayor variabilidad poblacional puede deberse a la acumulación de pequeñas diferencias en las divisiones.

Como anteriormente hemos expuesto, la división desigual que se da en el macronúcleo de los ciliados, puede ser la causante de la variabilidad en cuanto al contenido de ADN de las células en G₁. Si la distribución desigual del ADN macronuclear no va acompañada de una distribución desigual de

material citoplasmático entre las células hijas, lógicamente se producen células con distinta relación N/C. Si se admite que un cociente N/C bajo es el que determina la iniciación del periodo S, las células de menor contenido en ADN comenzarán antes su período S, teniendo un G_1 de menor duración. Esto parece estar de acuerdo con el hecho de que el periodo G_1 es la porción más variable del ciclo celular (41).

SEYFERT, en 1977 (64), observó en Tetrahymena que el coeficiente de variación del contenido de ADN macronuclear decrecía cuando una población sincrónica entraba en fase S. La reducción de este coeficiente de variación se produce porque los macronúcleos de menor contenido de ADN son los que empiezan primero el período S.

En esta misma línea de investigación, WORTHINGTON (79), encuentra que en I. pyriformis cuando la relación N/C es muy baja comparada con la de una población de individuos en G_1 , en crecimiento exponencial, se produce el período S sin que exista un previo periodo G_1 .

Como acabamos de ver, una relación N/C baja desencadena la síntesis de ADN pero, esto no implica que dicho cociente, por sí mismo, desencadene el período S; más bien, se debe hablar de una alta correlación entre el cociente N/C y la iniciación de síntesis de ADN.

Parece ser que la cantidad de ADN se hace sentir en la célula por la intensidad de la transcripción ya que, según CLEFFMANN (62), ambos parámetros están positivamente corre-

lacionados en las células en G₁. Por tanto, la iniciación de la replicación estaría determinada por la relación entre el nivel de transcripción y el tamaño celular, lo cual está de acuerdo con los resultados obtenidos por JAUKER en 1975 (27) que observó que, reduciendo el nivel de transcripción, la síntesis de ADN comenzaba antes en el ciclo siguiente.

Ya que la iniciación de síntesis depende de la comparación de los dos parámetros antes citados, cabe esperar que en algunas condiciones haya división celular sin período S macronuclear o bien períodos S consecutivos sin división celular. Efectivamente, existen numerosos datos en la bibliografía que muestran que en los ciliados no existe una estricta alternancia de síntesis de ADN y división celular. Esta alternancia se puede romper experimentalmente por tratamientos con inhibidores de la división celular, por choques térmicos y por micromanipulación.

Así, en Tetrahymena, se ha comprobado que un tratamiento con viblastina (62), que desorganiza los microtúbulos, bloquea la división celular y nuclear sin afectar a la síntesis de ADN, con lo cual hay un período S extra.

ZEUTHEN (82) y JEFFERY y col. (28, 29, 30) encuentran que, cuando se someten los cultivos de T. pyriformis a seis choques intermitentes de calor (28°C-34°C), se produce una sincronización de la población celular. De estas células que entran simultáneamente en la división, hay un 30-50% de ellas que previamente experimentan dos períodos S consecutivos.

Por otro lado, hay un 20-50% que comienzan la siguiente división sin que tenga lugar el período S. Estos autores afirman que las células que tienen dos períodos S consecutivos son las mismas que entran en la siguiente división sin período S.

WORTHINGTON (79) interpreta estos resultados y admite que las células que han tenido dos replications en una sola interfase poseen un cociente N/C alto y que este cociente se compensa en el siguiente ciclo celular suprimiéndose el período S.

Por otra parte, cuando Urostyla weissei (31) se corta en dos mitades se produce una regeneración cortical, acabada la cual, el macronúcleo experimenta dos períodos S sin que ocurra división celular entre ellos.

La ausencia de estricta alternancia entre replicación de ADN y división celular también se ha observado en cultivos celulares no sometidos a ningún tratamiento experimental.

CLEFFMANN (7) encuentra que, durante el ciclo celular normal de T. pyriformis, en un 2% de la población pueden darse dos vueltas consecutivas de replicación de ADN sin división celular.

Posteriormente, este autor, por medio de citofotometría y autorradiografía (8), demuestra que las células que tienen dos períodos S consecutivos son las que poseen más bajo contenido en ADN.

ANDERSEN (2) encuentra que en los cultivos norma-

les de T. pyriformis se pueden producir divisiones celulares sin síntesis de ADN. Las células que presentan este fenómeno son las de mayor contenido en ADN.

KIMBALL y PRESCOTT (34) observaron también en Euplotes la ausencia de una alternancia estricta de síntesis de ADN y división celular, durante su crecimiento normal.

Otro fenómeno que ha recibido atención por parte de muchos investigadores es la presencia de los llamados "cuerpos de extrusión" en células que tienen un alto contenido de ADN.

El cuerpo de extrusión es una porción de material cromatínico que se separa del macronúcleo, bien durante la división, como es el caso de Tetrahymena (14), Glaucoma (10), Colpidium (12) y Frontonia (11), o después de la misma, como ocurre en Ichthyothirius (43) y algunos Colpódidos (48) y que, normalmente, termina por reabsorberse en el citoplasma.

El tamaño del cuerpo de extrusión es variable y su cromatina es metabólicamente activa antes de su segregación pues se ha visto que se marca con Timidina tritiada cuando aún está unido al macronúcleo (65). Una vez que se ha separado, no responde al marcado.

El significado del cuerpo de extrusión ha sido muy discutido: KIDDER, en 1933 (32), afirma que representa una "purificación" del macronúcleo ya que sirve para expulsar "productos de desecho del metabolismo de la cromatina".

SESHACHAR, en 1947 (63), asegura que el cuerpo de

extrusión es un "medio de transporte del ADN al citoplasma, donde se convierte en ARN". A la luz de los conocimientos actuales, estas dos interpretaciones no se pueden admitir.

FAURÉ- FREMIET (16) considera la naturaleza del macronúcleo y establece que el cuerpo de extrusión es un sistema de reajuste de la poliploidía macronuclear ya que el macronúcleo presenta tendencia a la hiperploidización. Esta hiperpoliploidía, afirma, probablemente surge como resultado de la replicación repetida del ADN durante una sola interfase celular. Esta hipótesis ha sido corroborada posteriormente. En efecto, sometiendo un cultivo de Tetrahymena a irradiaciones ultravioleta, se produce un exceso de síntesis de ADN que, durante las tres divisiones siguientes, se elimina por grandes cuerpos de extrusión (65). También se ha observado en Tetrahymena (79) que las células que tienen un alto contenido en ADN macronuclear presentan cuerpos de extrusión con mayor frecuencia y de mayor tamaño que en las células normales.

La importancia del cuerpo de extrusión es cuantitativa y no cualitativa ya que la composición del ADN del macronúcleo y del cuerpo de extrusión es la misma (78).

El significado del cuerpo de extrusión es pues, la eliminación del exceso de ADN macronuclear y el restablecimiento de una relación N/C normal.

CLEFFMANN, estudiando la evolución de clones de Tetrahymena (7), encuentra que la media y la varianza del contenido de ADN macronuclear se mantienen constantes entre cier-

tos límites a lo largo de las generaciones. Este resultado sugiere la existencia de un mecanismo de regulación del contenido de ADN en Ciliados.

El control se puede efectuar, como anteriormente mencionamos, aumentando el contenido de ADN, si este es bajo, por medio de fases de síntesis extras o, por el contrario, si el contenido es alto, se prescinde del período S o se forman cuerpos de extrusión. Estos dos mecanismos contrapuestos y que operan esporádicamente son los que contrarrestan la variación continua y acumulativa en el contenido de ADN macronuclear como consecuencia de un reparto desigual en las sucesivas divisiones y, por tanto, mantienen la varianza dentro de unos límites.

Estos mecanismos de regulación se han descrito, además de en T. pyriformis, en : Colpidium campylum (42), Ichthyophthirius multifiliis (74), Tillina magna (21), Colpoda steinii (20) y Tetrahymena patula (22).

Existen otros hechos experimentales que sugieren la existencia de otros mecanismos de regulación. Así, ZECH en 1966, observó que en Bursaria truncatella (81) la síntesis de ADN macronuclear comenzaba antes y duraba más tiempo en el prótero (de menor tamaño y contenido en ADN) que en el opisto, igualándose la cantidad de ADN de ambas células para la siguiente división. BERGER, en 1972 (3), comprobó que en Paramecium aurelia, la alta variabilidad de contenido de ADN en G₁ disminuía al prepararse las células para la siguiente división, es decir, en el período G₂.

Estos resultados sugieren que en B. truncatella y P. aurelia, durante el período S no se duplica exactamente el ADN, pudiendo no alcanzar o rebasar el doble de la cantidad que tenía en G₁.

2. MATERIAL Y METODOS.

2.2.- Materiales

2.1.1.- Organismos utilizados.- Como material de trabajo se ha utilizado el ciliado Hipotrico Laurentia acuminata, aislado en 1971 por FEDRIANI (17) de una muestra de agua colectada en el Parque de María Luisa de Sevilla y que, desde entonces, se viene cultivando en nuestro Departamento.

Como alimento para esta especie hemos empleado Chlorogonium sp., alga verde unicelular, cedida por el Pr. AMMERMANN, de la Universidad de Tubingen (Alemania).

2.1.2.- Sustancias químicas.- La urea empleada era de la casa MERCK.

El proteinato de plata utilizado en la tinción de protargol era de la marca ROQUES (París).

2.2.- Métodos

2.2.1.- Cultivo de los organismos

2.2.1.1.- Cultivo de Chlorogonium.- Para el cultivo de Chlorogonium se empleó el siguiente medio:

Acetato sódico	1g
Extracto de carne (Oxoid)	1g
Bacto Triptona (Difco)	2g
Extracto de Levadura (Difco)	2g
Solución de Pringsheim	1000 ml

Este medio de cultivo fué esterilizado en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

La solución de Pringsheim tiene la siguiente composición:

$PO_4HNa_2 \cdot 2H_2O$	30 mg
$SO_4Mg \cdot 7H_2O$	30 mg
$(NO_3)_2Ca \cdot 4H_2O$	300 mg
ClK	26 mg
$SO_4Fe \cdot 7H_2O$	2 mg
Agua destilada	1000 ml

Los cultivos fueron incubados a 20°C, sometien-
dolos a periodos alternativos de luz y oscuridad de 12h.
de duración.

El aislamiento y los controles de pureza de

Chlorogonium, así como la conservación de los inóculos se realizó utilizando el medio anteriormente descrito, solidificado con agar al 2%.

2.2.1.2.- Mantenimiento de *Laurentia acuminata*

2.2.1.2.1.- Medio de cultivo.- El medio de cultivo fue solución de Pringsheim, esterilizado en autoclave a 121°C durante 20 minutos, a la que se añadió como alimento una suspensión de Chlorogonium.

2.2.1.2.2.- Preparación del alimento.- Para alimentar a *Laurentia acuminata* se utilizaron cultivos de Chlorogonium, incubados durante una semana, al cabo de la cual las células fueron lavadas tres veces con solución de Pringsheim.

2.2.1.2.3.- Condiciones de cultivo.- Los cultivos de *L. acuminata* fueron mantenidos en tazas de Böveri en cámara climatizada a 20 1°C.

2.2.1.3.- Cultivo de *Laurentia acuminata* para el estudio del contenido de ADN macronuclear y su reparto durante la división.- Para los estudios de contenido de ADN macronuclear y su reparto durante la división, se realizaron cultivos en pocillos con solución de Pringsheim a la que se añadía un volumen igual de una suspensión de Chlorogonium de una densidad óptica de 0,9 a 640 nm.

Dado que para realizar nuestro trabajo necesitábamos cultivos sincrónicos y los de mantenimiento de

L. acuminata no lo son, procedimos a su sincronización de dos formas diferentes: por selección de individuos en las últimas fases de la división o bien manteniendo los cultivos durante un período de tiempo sin alimento. En el primer caso, aislamos mediante una pipeta los individuos que se encontraban en la última etapa de la división celular, es decir, poseían la típica forma de "ocho". Naturalmente, para el estudio del reparto de ADN en la división, empleamos individuos así seleccionados.

Por otra parte, la sincronización por medio de períodos de hambre, aunque no tan precisa, tiene la ventaja de poder trabajar con cultivos mas numerosos; este tipo de sincronización lo hemos empleado para el estudio de contenido de ADN en poblaciones en G₁ de L. acuminata.

Conviene señalar que en algunos experimentos hemos empleado cultivos clónicos.

2.2.2.- Observaciones "in vivo"

2.2.2.1.- Observaciones al microscopio estereoscópico. - La observación del estado de los cultivos, así como la selección de las células adecuadas, se efectuó mediante el empleo de una lupa binocular.

2.2.2.2.- Observaciones al microscopio óptico. - Las observaciones "in vivo" al microscopio óptico fueron realizadas por microscopía de contraste de fases, utilizando la técnica de la gota pendiente. A fin de disminuir

la velocidad de desplazamiento de los individuos, se añadía a la preparación una cierta cantidad de metilcelulosa, con lo que se conseguía aumentar la viscosidad del medio y, en consecuencia, hacer mas lentos los movimientos de las células.

2.2.3.- Tinciones citológicas

2.2.3.1.- Tinción con orceína acética.- Esta tinción se ha utilizado para colorear los núcleos y determinar la posición de las bandas de reorganización.

Hemos seguido la técnica descrita por TJIO y LEVAN (69).

El colorante se prepara disolviendo 2g de orceína sintética GURR'S en 55ml de ácido acético glacial, que se mantienen en ebullición durante 10 minutos, transcurridos los cuales, se deja enfriar y se añade agua destilada hasta 100ml. Esta solución se deja reposar durante 24 horas, se filtra y se le añade una parte de ClH 1N por cada nueve partes de la solución.

El colorante así preparado se puede diluir hasta la proporción deseada con ácido acético glacial al 45% en agua destilada.

El procedimiento de coloración que hemos seguido es el siguiente: Las preparaciones se realizaron colocando sobre un portaobjetos una gota de cultivo abun-

dante de protozoos y, con ayuda de una pipeta fina, se va retirando el líquido hasta que la preparación queda casi seca. A continuación, se añaden una o dos gotas de orceína, que se deja actuar durante cinco minutos, colocando seguidamente el cubreobjetos.

Esta técnica presenta la ventaja de su gran rapidez y de provocar un ligero hinchamiento de los núcleos que los hace fácilmente visibles y, por tanto, se pueden distinguir bien las bandas de reorganización; pero, sin embargo, presenta el inconveniente de que las preparaciones no son permanentes y, en consecuencia, solo pueden ser observadas durante algunas horas.

2.2.3.2.- Tinción de Feulgen.- Para esta tinción hemos utilizado los siguientes reactivos:

- Solución acuosa de formol al 10%
- ClH 5N
- Reactivo de Schiff, que se prepara como sigue:

A 200 ml de agua destilada hirviendo se le añade 1g de fucsina básica, se deja enfriar hasta 50°C, se filtra, se agrega 20ml de ClH 1N y se deja enfriar hasta 25°C. En este momento, se añade 1g de metabisulfito sódico ($S_2O_5Na_2$) y se deja reposar durante 24 horas, a temperatura ambiente y en oscuridad. Transcurrido este tiempo, se añade 1g de carbón activo, se agita durante 10 minutos y, por último, se filtra.

Para mantener en buen estado este reactivo es

preciso conservarlo en la oscuridad y a bajas temperaturas.

- Agua sulfurosa, que se prepara mezclando 90ml de agua destilada con 5ml de una solución de Cl 1N y 5ml de una solución de metabisulfito sódico al 10% en agua.

El método de tinción adoptado ha sido el siguiente: La fijación se hace con formol al 10% en un pocillo durante 10 minutos. Una vez fijados, y en el mismo pocillo de fijación, se lava tres veces con agua destilada y, posteriormente, se colocan las células en un portaobjetos albuminado, retirándose el agua sobrante con la ayuda de una pipeta fina. A continuación, se pasan los portas por tres cubetas con agua destilada (cinco minutos en cada paso) para eliminar los posibles restos del fijador. El último paso se hace a 20°C, que es la temperatura a la que se realizará la hidrólisis.

Para determinar las condiciones óptimas de hidrólisis, ha sido ensayada ésta con ClH 5N a 20°C durante tiempos que oscilaron entre 15 y 60 minutos, siendo éste último el empleado en nuestros experimentos.

Después de la hidrólisis, las preparaciones fueron sometidas a tres lavados sucesivos con agua destilada los dos primeros de tres minutos de duración y de cuatro minutos el último. Seguidamente, las preparaciones se sumergen en el reactivo de Schiff durante una hora,

transcurrida la cual se pasan sucesivamente por tres cubetas con agua sulfurosa, manteniéndolas tres minutos en las dos primeras y cuatro en la tercera.

Las preparaciones se lavan tres veces con agua destilada, se deshidratan y, finalmente, se montan en Caedax.

2.2.3.3.- Tinción de orgánulos superficiales.-

Hemos utilizado la tinción de impregnación argéntica con protargol de BODIAN (4, 5), modificada por TUFFRAU (72), para la que hemos empleado los siguientes reactivos:

- Fijador de Bouin
- Hipoclorito sódico al 10% en agua
- Solución de protargol (proteinato de plata) al 1%.
- Solución acuosa de tiosulfato sódico al 5%
- Hidroquinona al 1% en solución acuosa de sulfito sódico al 5%
- Solución acuosa al 1% de cloruro de oro
- Acido oxálico al 2% en agua

El procedimiento de tinción ha sido el siguiente: Se colocaron en un pocillo unas gotas de un cultivo abundante de ciliados, que se fijaron con el fijador de Bouin durante 10 minutos y, seguidamente, se sometieron a tres o cuatro lavados con agua destilada en el mismo

pocillo de fijación. Una vez que las células están bien lavadas, se deja el pocillo hasta la mitad de agua y se añaden dos gotas de hipoclorito sódico al 10% con una pipeta, de tal manera que el hipoclorito caiga próximo a las células, pero no encima de ellas, para evitar un aclaramiento muy rápido; una vez echado el hipoclorito, el citoplasma celular va perdiendo color hasta tomar un aspecto translúcido; en ese momento, se retira el líquido que las rodea y se añade agua destilada para detener la decoloración. Las células se recogen con una pipeta y se depositan sobre un portaobjetos limpio y desengrasado. Posteriormente, se coloca una gota de albúmina glicerizada sobre las células y se homogeniza todo con cuidado de no romper los protozoos.

Una vez retirado todo el líquido de la preparación, se coloca ésta en un desecador, donde permanece como mínimo 24 horas; transcurrido este tiempo, se añade al porta una gota de alcohol-formol (4:1) y se calienta suavemente hasta que se evapore a fin de coagular la albúmina. A continuación, se hidrata la preparación y se procede a la impregnación con el protargol.

La solución de protargol se prepara inmediatamente antes de ser utilizada. La impregnación se hace a 50°C durante 30 minutos y, acabada ésta, los portas

se lavan para quitar el exceso de protargol y cada preparación se revela introduciéndola en la solución de hidroquinona. Dado que con esta tinción pretendíamos observar los detalles de la ciliación y la infraciliación, permitimos que el revelador actuara hasta que se ponían de manifiesto con la necesaria nitidez dichos detalles. En el momento adecuado se paró el revelado lavando las preparaciones con agua destilada.

Posteriormente, se vira con oro al 1%. Este paso ha de ser rápido e inmediatamente después ha de lavarse abundantemente con agua destilada. Los orgánulos ciliares después del paso por el oro toman color gris.

A continuación, se sumergen las preparaciones en la solución de ácido oxálico, durante un periodo de tiempo de aproximadamente dos minutos, con lo que se consigue que los orgánulos tomen un color violeta. Después se lava moderadamente en agua destilada.

Posteriormente, se pasan a la disolución de tiosulfato, donde permanecen un tiempo mínimo de dos minutos, con lo que se consigue una mayor nitidez de las imágenes, así como la detención del proceso.

Por último, después de lavar de nuevo, las preparaciones se deshidratan y se montan en Caedax.

2.2.4.- Tratamiento con urea.- A fin de eliminar parcialmente la zona adoral de membranelas, sometimos una suspensión abundante de células a un tratamiento con urea, del modo siguiente: Se concentró una gran cantidad de células en poco medio líquido y se añadió igual volumen de una solución de urea al 6 %; a los treinta segundos se interrumpió el tratamiento diluyendo bruscamente con abundante cantidad de solución de Pringsheim.

2.2.5.- Determinación del contenido de ADN en los núcleos.- Para ello nos hemos valido de técnicas citofotométricas, utilizando un citofotómetro densitómetro VICKERS M 85 con integrador de área, con el que se midió la absorbancia de los núcleos después de ser coloreados mediante la tinción de Feulgen.

3. RESULTADOS.

Como ya hemos mencionado en los apartados anteriores, el ciliado objeto de nuestro estudio es el hipotrico oxitrichido Laurentia acuminata. Este ciliado fué descrito como una nueva especie del género Laurentia por Fedriani en 1974 (17). Entre 1974-1977 se estudió la morfogénesis cortical (38) y el comportamiento macro y micronuclear durante el ciclo celular y la regeneración (70).

Con estos datos preliminares, comenzamos el estudio sobre la distribución, división y regulación del ADN macronuclear en poblaciones de L.acuminata.

Las determinaciones del contenido de ADN del macronúcleo y micronúcleo, las hemos realizado por medidas citofotométricas sobre preparaciones teñidas según el método de Feulgen.

Antes de exponer nuestros resultados, creemos conveniente hacer alguna consideración sobre las condiciones

en que se efectúa la tinción de Feulgen y sobre la variabilidad del ADN macronuclear dentro de una población.

En cuanto a la tinción, hemos de señalar que en este método es de suma importancia establecer las condiciones en que se ha de efectuar la hidrólisis clorhídrica que se requiere antes de la coloración con el reactivo de Schiff, porque de ellas depende el número de grupos aldehidos libres que posteriormente reaccionarán con el colorante, y por tanto la intensidad de la coloración.

Se han descrito numerosas variantes de la hidrólisis en cuanto a tiempo, temperatura y concentración del ácido; entre ellas hemos seleccionado la hidrólisis con $\text{ClH } 5\text{N}$ a 20°C durante una hora, porque en nuestro laboratorio ya se había comprobado (70) que son las condiciones en que la coloración es más intensa y además permite una mayor reproducibilidad de los resultados.

Para evitar posibles errores debidos a variaciones en las condiciones de tinción, hemos realizado la fijación, hidrólisis y exposición al colorante simultáneamente en todas las preparaciones que se emplean en un mismo experimento. En el caso de que, como a veces sucedía, por imperativos del experimento no era posible hacer la tinción simultánea de la serie de preparaciones, era necesario introducir una corrección en las medidas; esta corrección consistió en dividir el contenido de ADN hallado para cada

macronúcleo por la media aritmética del contenido de ADN de los micronúcleos en G_1 presentes en la misma preparación. De este modo, la cantidad de ADN del macronúcleo está expresada como n veces el contenido del micronúcleo, al que consideramos como diploide.

Todas las medidas se hicieron a una longitud de onda de 550 nm. que es a la que corresponde el máximo de absorción del colorante.

Cada micronúcleo y cada fragmento macronuclear se midió dos veces, y el valor utilizado en nuestros estudios fue la media aritmética de ambas medidas.

3.1.- Variabilidad del contenido de ADN en cultivos de *Laurentia acuminata*.- A fin de estudiar la variación del contenido de ADN macronuclear en una población en G_1 , hemos realizado una serie de medidas en un cultivo abundante de *L. acuminata*, el cual se mantuvo sin alimento durante un día, con el fin de que un porcentaje elevado de individuos se encontraran en fase G_1 . A continuación, se hicieron preparaciones de esta población y se midieron los contenidos de ADN macronuclear de los individuos que no presentaban bandas de replicación.

Dado que en *L. acuminata* no existe período G_2 macronuclear, la ausencia de bandas de replicación es un indicador seguro de que los macronúcleos se encuentran en período G_1 . La figura 1 muestra la distribución del contenido en ADN macronuclear de 20 individuos de

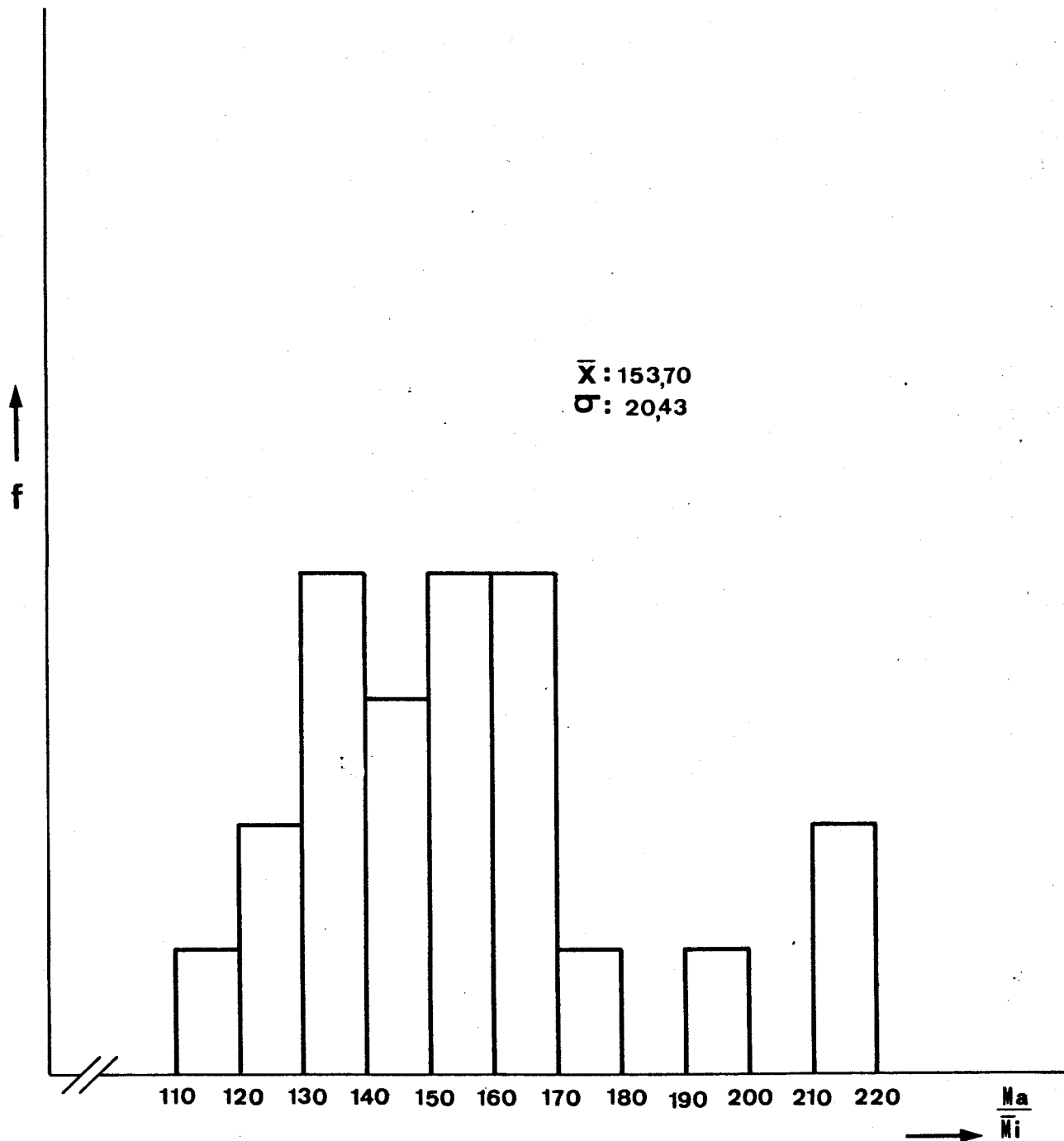


Figura 1. - Distribución de contenidos de ADN macronuclear de 20 individuos en G_1 .

esta población. El ADN macronuclear de cada célula se determinó sumando los contenidos de los cuatro fragmentos macronucleares que presentaba. Como puede apreciarse en esta figura, existe un amplio margen de variación en el nivel de ADN macronuclear, de tal manera que hay células que poseen prácticamente el doble de ADN que otras.

Puesto que los macronúcleos presentan una división amitótica en la que no se reparte exactamente igual el ADN entre las dos células hijas, esta variabilidad encontrada en la población en G_1 podía ser atribuida a diferencias acumuladas a lo largo de una serie de divisiones sucesivas. A fin de comprobar este punto, realizamos determinaciones encaminadas a cuantificar la distribución del ADN macronuclear entre los dos productos de la división celular en una población en crecimiento.

3.2.- Reparto de ADN macronuclear durante la división de *L. acuminata*.- En *L. acuminata*, una vez que los macronúcleos son recorridos por las bandas de replicación, se produce una fusión de los cuatro fragmentos macronucleares formándose una sola masa compacta que suele ser de forma ovoidal. Posteriormente, esta masa macronuclear experimenta tres divisiones consecutivas originándose ocho fragmentos que se reparten entre las dos células hijas.

Para el estudio del reparto de ADN macronuclear en la división de *L. acuminata*, seleccionamos 72 indivi-

duos que habían alcanzado la última fase de la citocinesis. En tal estado, las células presentan el estrangulamiento ecuatorial característico, lo que les da una forma semejante a un "ocho", haciéndolas fácilmente identificables tanto a la lupa binocular (en los cultivos) como al microscopio (en las preparaciones). Las 72 células se tiñeron según el método de Feulgen y se determinó el contenido en ADN macronuclear del "prótero" y "opisto". Con estas 144 medidas se hicieron tres tipos de análisis:

1) Coeficiente de reparto entre células hermanas:

Cociente de los contenidos de ADN macronuclear de los dos productos de la misma división. La figura 2a muestra la distribución de estos coeficientes de reparto, que varían desde 1 a 1,35 y cuyo valor medio es de 1,09 con una $\sigma = 0,08$.

Estos resultados indican que, aunque en algunas divisiones el reparto es equitativo, en otras la distribución de ADN entre las células hijas es muy desigual.

2) Análisis de correlación:

Con los datos del contenido de ADN macronuclear de cada pareja determinamos el coeficiente de correlación. En la figura 3 mostramos este tipo de análisis y, como puede observarse, $r = \pm 0,79$.

El hecho de que la pendiente de la recta de regresión sea distinta de 1 indica que la división es de-

sigual, y al ser el valor del coeficiente de correlación menor que 1, se puede deducir que el grado de desigualdad en el reparto no es el mismo en todos los individuos de la población.

3) Distribución de las diferencias en contenido de ADN macronuclear entre las dos células hermanas:

Los resultados de este estudio se reflejan en la figura 4a. En esta gráfica, las diferencias en contenido de ADN entre pares de macronúcleos hermanos, está expresada como porcentaje de la media aritmética del contenido del par. Los porcentajes oscilan entre 0 y 28, la media encontrada en esta distribución fue de 9,12% y la σ de 7,46.

El siguiente paso de este estudio fue efectuar un análisis similar con parejas de células no hermanas. Para ello, con los mismos datos, construimos dos tipos de poblaciones: una formada por pares de células hijas tomadas al azar entre estos 144 productos de división (72 parejas) y otra formada por pares de células madres también tomadas al azar. Cada célula madre está calculada como la media aritmética del contenido de ADN macronuclear de un par, por tanto sólo hay 36 parejas de este tipo.

El coeficiente de reparto para la población de pares aleatorios de individuos recién divididos varía desde 1 a 1,60 y su valor medio fue de 1,15 con una $\sigma = 0,13$. Figura 2b.

En el caso de parejas aleatorias de parentales (células madres), el coeficiente varió de 1 a 1,35 siendo su media 1,13 y su $\nabla = 0,11$. Figura 2c.

La figura 5 muestra el análisis de correlación de pares al azar de individuos recién divididos; como puede observarse, en este caso r tiene un valor de $\pm 0,49$.

En la figura 6 presentamos el mismo estudio para la población de parejas aleatorias de parentales, el coeficiente de correlación hallado fue de $r = \pm 0,48$.

Como puede apreciarse, el coeficiente de correlación de estas dos poblaciones es sensiblemente más bajo que el obtenido en la población de pares hermanos.

La distribución de diferencias entre pares al azar de individuos recién divididos oscila entre 0 - 48%, su valor medio es de 13,70% y su $\nabla = 10,52$. Figura 4b. Estas diferencias entre pares de parentales tomados al azar presentan la distribución de la figura 4c. En este caso, los valores varían entre 0 y 36%, siendo la media 11,78% y la ∇ de 9,34.

Ambas distribuciones presentan una media de diferencias porcentuales más altas que las observadas entre pares hermanos, siendo la de parentales menor que la de la generación filial.

A fin de averiguar si las diferencias encontradas

1

Figura 2.- Distribución de coeficientes de reparto de ADN macronuclear de 72 pares hermanos (2a), 72 pares al azar de individuos recién divididos (2b) y 36 pares al azar de parentales (2c).

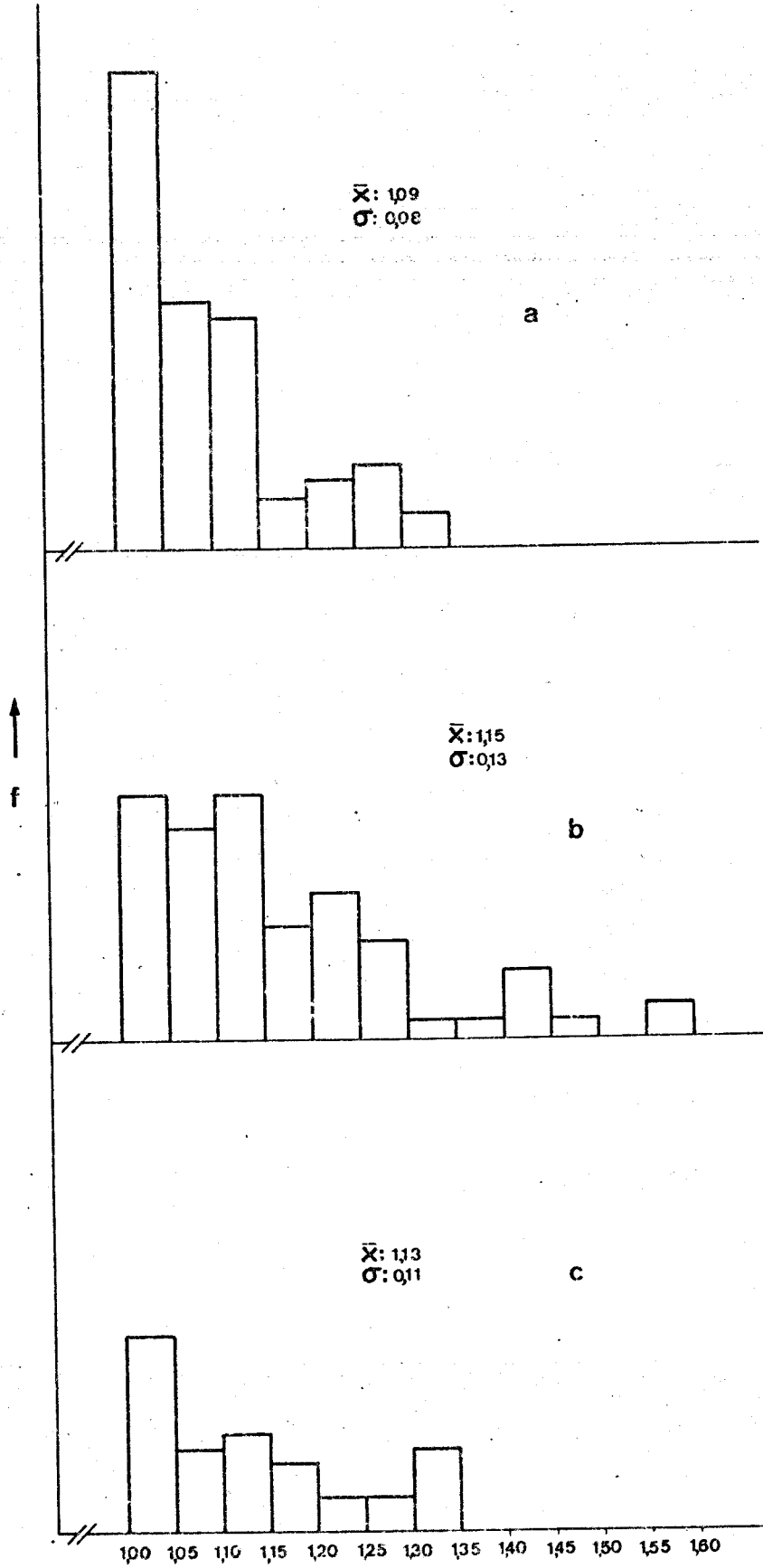


Figura 3.- Recta de regresión y coeficiente de correlación de 72 pares de macronúcleos hermanos.

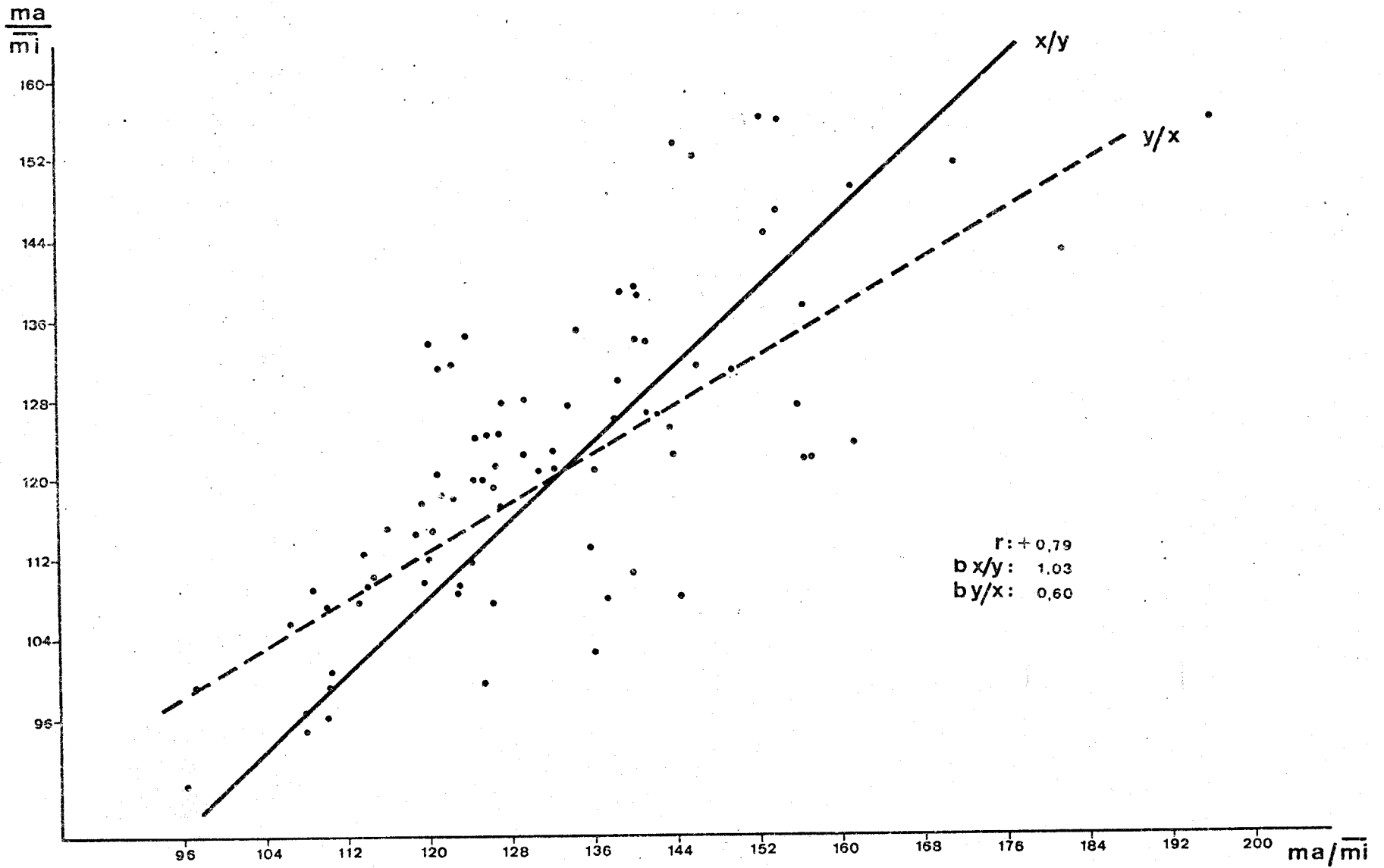
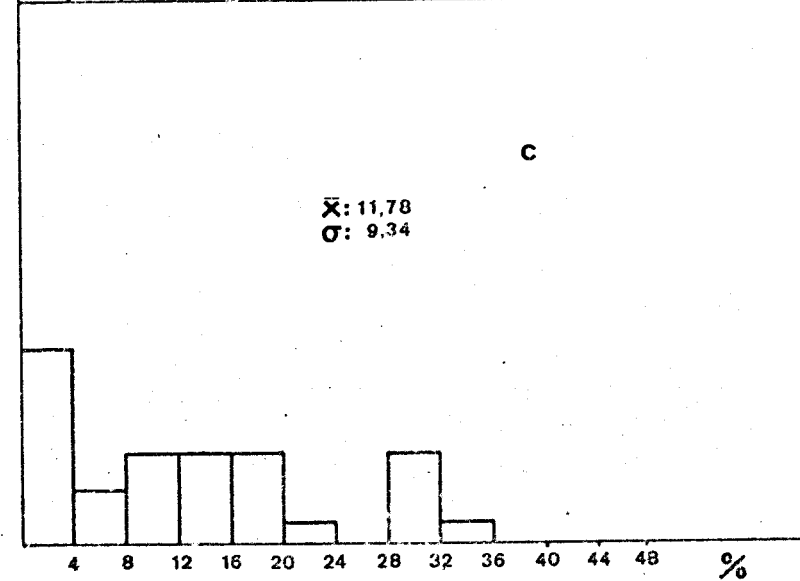
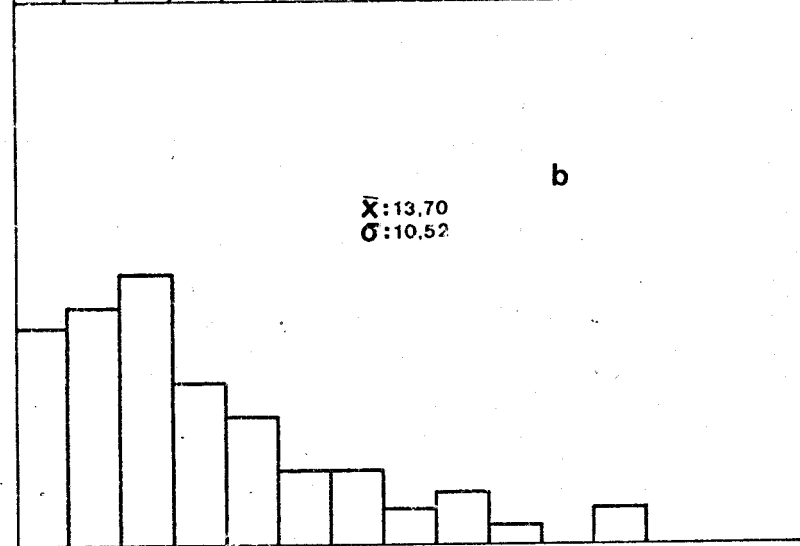
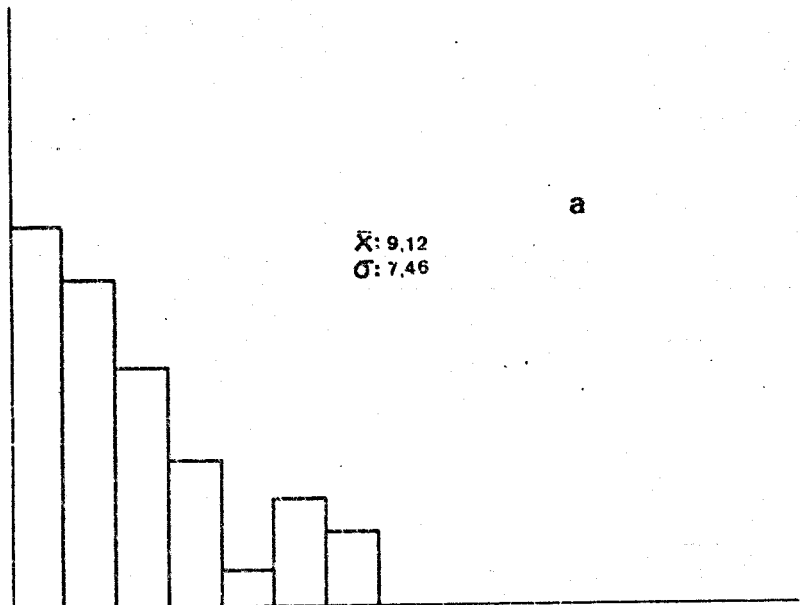


Figura 4.- Distribución de diferencias en contenido de ADN macronuclear entre 72 pares hermanos (4a), 72 pares al azar de individuos recién divididos (4b) y 36 pares al azar de parentales (4c).



f ↑

4 8 12 16 20 24 28 32 36 40 44 48 %

Figura 5.- Recta de regresión y coeficiente de correlación de 72 pares al azar de individuos recién divididos.

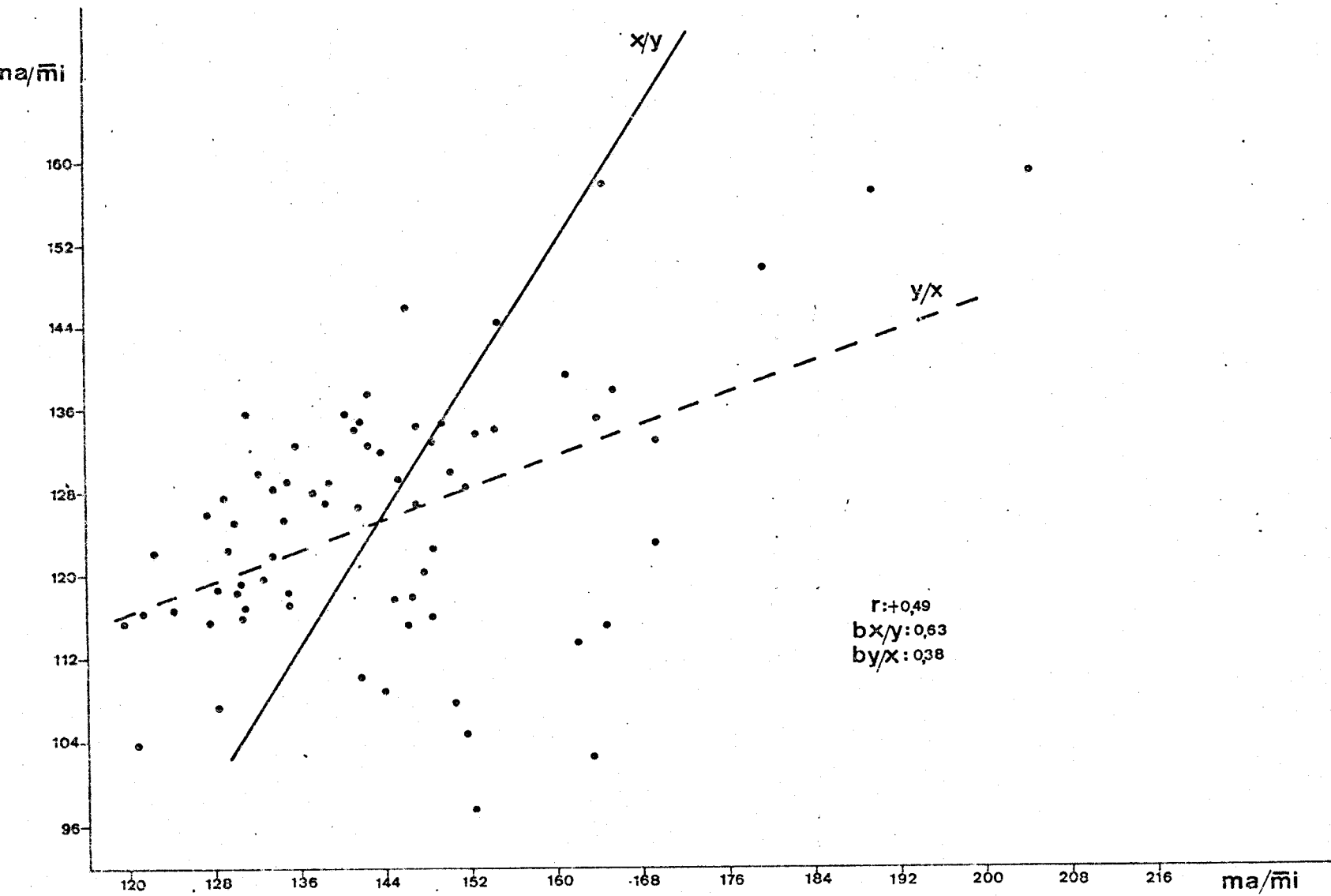
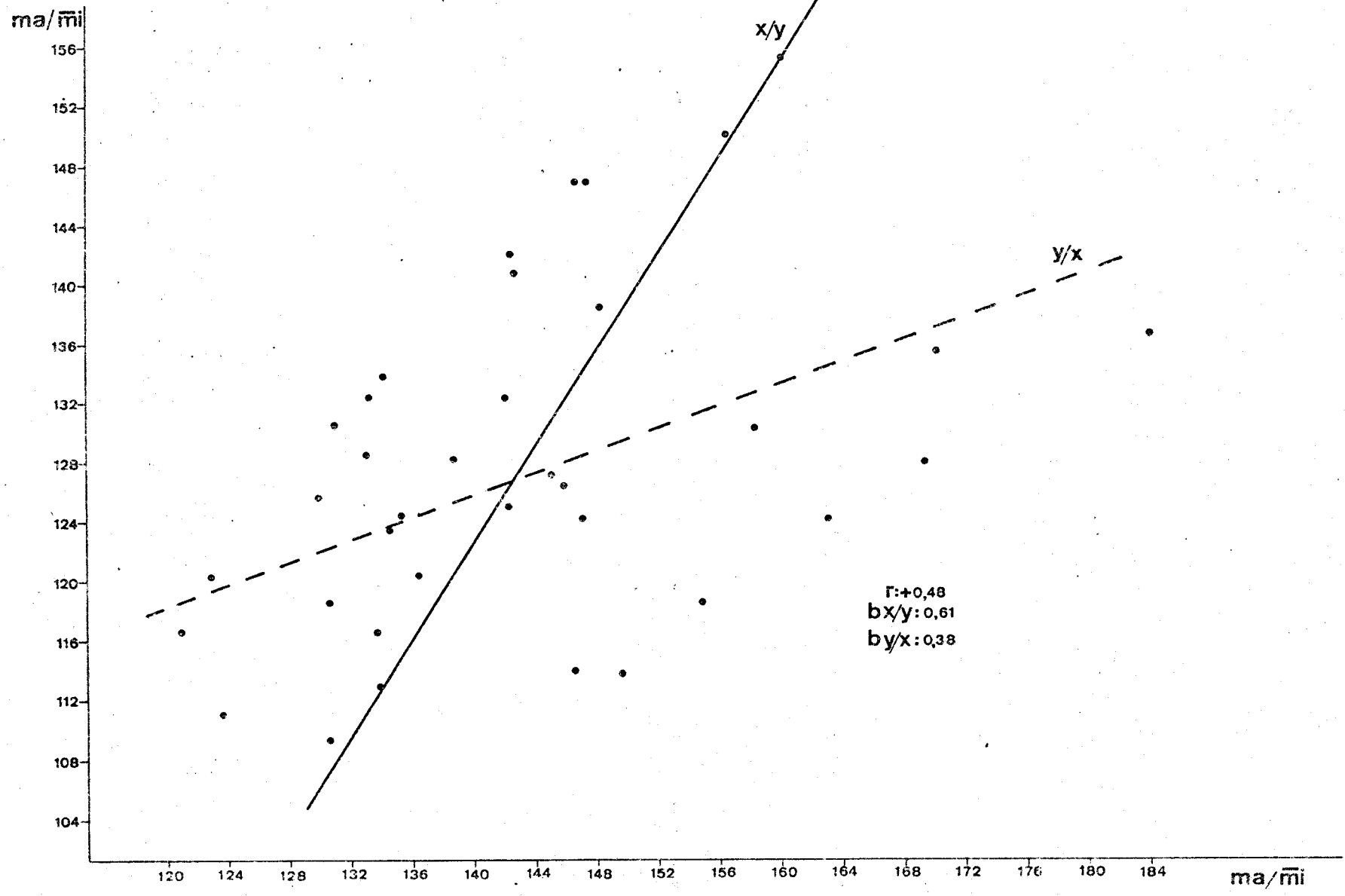


figura 6.- Recta de regresión y coeficiente de correlación de 36 pares al azar de parentales.



eran debidas a errores de medida del citofotómetro, se midió la absorción de 40 macronúcleos efectuando cuatro medidas sobre cada uno de ellos; calculamos la media para cada dos valores y obtuvimos por tanto dos medias de cada macronúcleo. A continuación, trabajamos con estas dos medias como si se tratara de individuos emparejados. La distribución de diferencias para este tipo de parejas tiene una variación de 0 a 0,80%, su valor medio es de 0,26% y su $\sigma = 0,18$. Figura 7.

Como puede apreciarse, el porcentaje medio es bastante más bajo que el hallado anteriormente para los tres tipos de poblaciones estudiadas, lo que indica que las diferencias halladas entre pares de células hermanas, células hijas tomadas al azar y células parentales, también tomadas al azar, responden a la realidad.

A la vista de estos resultados, surge otra cuestión que consideramos de interés: averiguar si existe polaridad en cuanto al reparto de ADN, de tal manera que siempre fuese el prótero o bien el opisto el que recibiera más cantidad de ADN.

Dado que en preparaciones teñidas según el método de Feulgen era difícil distinguir entre el producto anterior y posterior de la división, lo primero que hicimos fue observar una preparación de células en citocinesis (en forma de ocho) de L. acuminata con microscopio de contraste de fases para saber, atendiendo a la

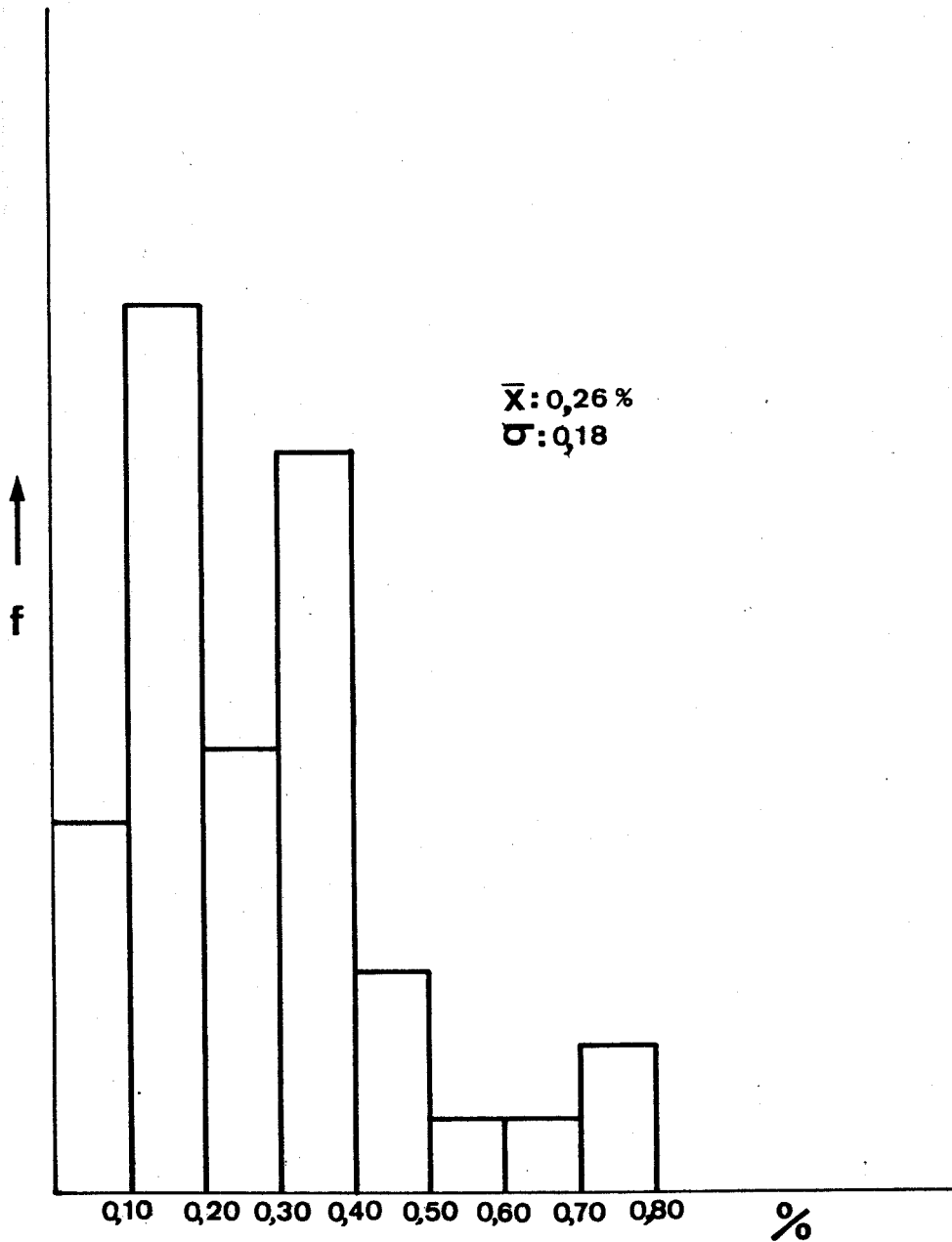


Figura 7.- Distribución de diferencias entre pares de medidas de 40 macronúcleos.

localización de la zona adoral de membranelas, cuál era el "prótero" y cuál el "opisto". A continuación, dibujamos estas células con objeto de identificar el prótero y el opisto al medirlas en el citofotómetro. Los valores de ADN macronuclear encontrados para ambos tomitos de 20 células en división se muestran en la tabla I. Como puede observarse, en 11 de las células el opisto contenía más ADN que el prótero, y en las 9 restantes, ocurría lo contrario, lo que parece indicar que no existe polaridad en el reparto desigual.

Los resultados hasta ahora expuestos indican que la variación en el contenido de ADN macronuclear entre individuos de una población tiende a acentuarse en cada división celular, lo cual conduce a pensar que, a lo largo del tiempo, habría un aumento progresivo de la varianza. Para averiguar si este aumento en la varianza es indefinido o, por el contrario, existen valores límites determinados por algún tipo de autoregulación, realizamos una serie de experimentos encaminados a estudiar la variación del contenido de ADN macronuclear a través de las generaciones en cultivos clónicos.

3.3.- Evolución del contenido de ADN macronuclear en cultivos clónicos.- Debido a que todos los individuos de una población no poseen la misma cantidad de ADN, decidimos tomar cinco individuos seleccionados

TABLA I.- Contenido de ADN (Ma/ \bar{m} i) en Prótero y Opisto de 20 células en división.

<u>OPISTO</u>	<u>PROTERO</u>
93,99	84,18
105,20	93,01
90,07	87,74
113,73	83,85
107,91	100,86
111,79	98,57
146,45	114,28
125,64	117,57
180,63	120,97
140,59	130,60
122,51	88,31
73,17	112,52
79,09	98,55
82,00	85,33
90,59	91,49
100,81	101,82
117,20	138,61
116,53	124,39
108,55	138,84
161,33	177,41

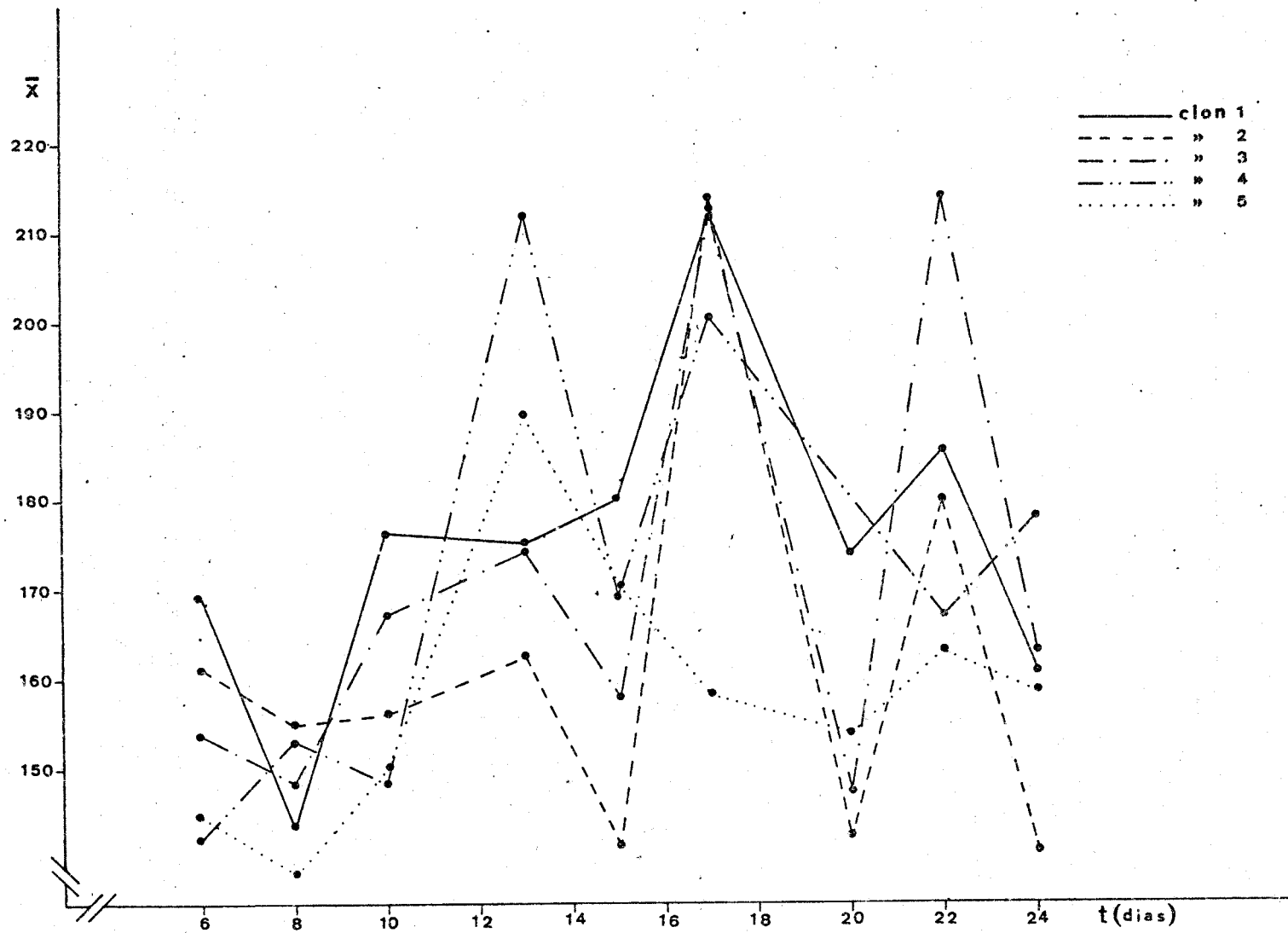
al azar de una población de L. acuminata, en fase de crecimiento exponencial, y los hicimos crecer separadamente al objeto de estudiar la evolución del contenido de ADN en cinco clones que tuvieran probablemente como origen un nivel de ADN distinto.

En estos cultivos clónicos se consiguieron poblaciones suficientemente abundantes hacia los cinco días, por ello comenzamos a realizar las medidas a partir del sexto día, y con intervalo de dos días. En la figura 8 y en la tabla II representamos, respectivamente, los valores de la media y varianza del contenido de ADN macronuclear de estas cinco poblaciones (en G_1) desde el sexto hasta el vigésimocuarto día después de la iniciación del cultivo.

Todos los clones tuvieron un comportamiento semejante, la media y la varianza sufren fluctuaciones, manteniéndose dentro de unos límites superior (media 215 Ma/ \bar{m}_i , varianza 5.400) e inferior ($\bar{x}=130$, $S^2=127$).

Las fluctuaciones observadas en la media y varianza de estas cinco poblaciones clonales, sugieren la existencia de un mecanismo que regula el contenido de ADN macronuclear de una población, puesto que con el tipo de división desigual que presenta el macronúcleo, si no existiera ningún tipo de control, habría un incremento progresivo del valor de la varianza al paso de las generaciones. En estas condiciones, apare-

Figura 8.- Evolución del contenido medio de ADN macro-
nuclear de poblaciones clónicas a lo largo
del tiempo.



	CLON 1	CLON 2	CLON 3	CLON 4	CLON 5
6 DIAS	n = 20 \bar{x} = 169,39 S^2 = 670,29	n = 20 \bar{x} = 161,33 S^2 = 495,06	n = 20 \bar{x} = 153,70 S^2 = 439,32	n = 20 \bar{x} = 142,38 S^2 = 358,34	n = 20 \bar{x} = 144,89 S^2 = 590,00
8 DIAS	n = 20 \bar{x} = 143,15 S^2 = 277,89	n = 20 \bar{x} = 154,89 S^2 = 226,50	n = 20 \bar{x} = 148,73 S^2 = 184,68	n = 20 \bar{x} = 153,08 S^2 = 350,81	n = 20 \bar{x} = 137,96 S^2 = 203,06
10 DIAS	n = 20 \bar{x} = 176,01 S^2 = 358,72	n = 20 \bar{x} = 156,35 S^2 = 127,01	n = 20 \bar{x} = 167,19 S^2 = 201,07	n = 20 \bar{x} = 148,13 S^2 = 171,35	n = 20 \bar{x} = 150,28 S^2 = 291,04
13 DIAS	n = 20 \bar{x} = 175,07 S^2 = 340,77	n = 20 \bar{x} = 162,79 S^2 = 547,56	n = 20 \bar{x} = 174,09 S^2 = 271,26	n = 20 \bar{x} = 211,68 S^2 = 439,32	n = 20 \bar{x} = 189,31 S^2 = 1.055,60
15 DIAS	n = 20 \bar{x} = 179,47 S^2 = 1.998,09	n = 20 \bar{x} = 141,34 S^2 = 140,90	n = 20 \bar{x} = 158,34 S^2 = 239,01	n = 20 \bar{x} = 169,11 S^2 = 398,82	n = 20 \bar{x} = 170,66 S^2 = 182,79
17 DIAS	n = 20 \bar{x} = 212,19 S^2 = 1.756,45	n = 20 \bar{x} = 214,02 S^2 = 5.396,37	n = 20 \bar{x} = 212,00 S^2 = 3.515,30	n = 17 \bar{x} = 204,03 S^2 = 2.774,13	n = 20 \bar{x} = 158,89 S^2 = 281,23
20 DIAS	n = 20 \bar{x} = 173,71 S^2 = 828,29	n = 20 \bar{x} = 142,17 S^2 = 359,10	n = 20 \bar{x} = 147,10 S^2 = 746,38	---	n = 17 \bar{x} = 154,82 S^2 = 598,78
22 DIAS	n = 19 \bar{x} = 185,39 S^2 = 1.647,55	n = 20 \bar{x} = 179,92 S^2 = 936,36	n = 20 \bar{x} = 214,08 S^2 = 1.915,81	n = 20 \bar{x} = 167,94 S^2 = 632,52	n = 20 \bar{x} = 163,33 S^2 = 461,82
24 DIAS	n = 20 \bar{x} = 160,30 S^2 = 351,19	n = 20 \bar{x} = 140,63 S^2 = 599,27	n = 20 \bar{x} = 163,01 S^2 = 309,41	n = 20 \bar{x} = 178,50 S^2 = 894,01	n = 20 \bar{x} = 158,43 S^2 = 483,12

TABLA II.- Evolución del contenido de ADN macronuclear en cultivos clónicos.

n = Nº de individuos medidos

\bar{x} = Media del contenido de ADN macronuclear Ma/ \bar{m} i

S^2 = Varianza

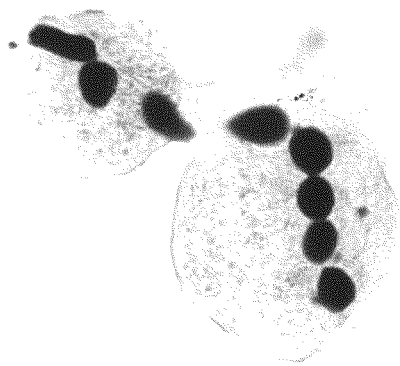
cerían individuos con contenidos muy altos y muy bajos en ADN.

Este control operaría en dos sentidos opuestos: disminuyendo la cantidad de ADN en los individuos que poseen un alto contenido y aumentándola en aquellos que tienen un contenido bajo.

Para abordar el estudio de este mecanismo de control de la cantidad de ADN macronuclear en L. acuminata, partimos de individuos que poseían un bajo contenido de ADN y de individuos que estaban en la situación contraria, es decir, que su contenido de ADN era más alto que el considerado normal para un individuo en G_1 . Para ello, provocamos experimentalmente una división más desigual que la que se da normalmente en los cultivos de L. acuminata.

3.4.- Reparto de ADN macronuclear en una división desigual provocada por daño cortical.- En estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio (70), se había logrado inducir en L. acuminata divisiones extremadamente desiguales, como consecuencia de la eliminación de parte de la Z.A.M. de una célula durante el último tercio del período S macronuclear. Estas divisiones desiguales dan origen a un opisto de tamaño normal y a un prótero que carece de parte de su zona adoral de membranelas y cuyo tamaño es menor que el normal, representando un 39% de la longitud total celular. Fig. 9.

Figura 9.- División desigual en Laurentia acuminata.
Tinción de Feulgen.



Debido a que las fragmentaciones macronucleares durante esta división desigual, no coinciden con la línea de citocinesis, puede haber una distribución desigual de los fragmentos macronucleares entre las dos células hijas.

Con el fin de averiguar si había en esta división un reparto desigual de los fragmentos macronucleares, tomamos un cultivo bien alimentado de L. acuminata y le aplicamos un tratamiento con urea (3%, durante 30 segundos) cuando los individuos estaban próximos a la división. Ello provocó la aparición de divisiones desiguales en muchos individuos de la población; mediante una micropipeta, separamos estos individuos y, una vez acabada totalmente la división, colocamos a los próteros, que carecen de parte de su zona adoral de membranelas, en una taza de Bóveri y a los opistos en otra e hicimos preparaciones de Feulgen de ambos tipos de individuos.

El conteo de fragmentos macronucleares de 83 próteros está representado en la figura 10. El número de fragmentos encontrado osciló entre 1 y 4 y la mayor parte de estos individuos presentaban de 2 a 3 fragmentos.

Los 111 opistos observados presentaron la distribución de fragmentos que se muestra en la figura 11. El número de fragmentos que recibe el opisto varía de 2

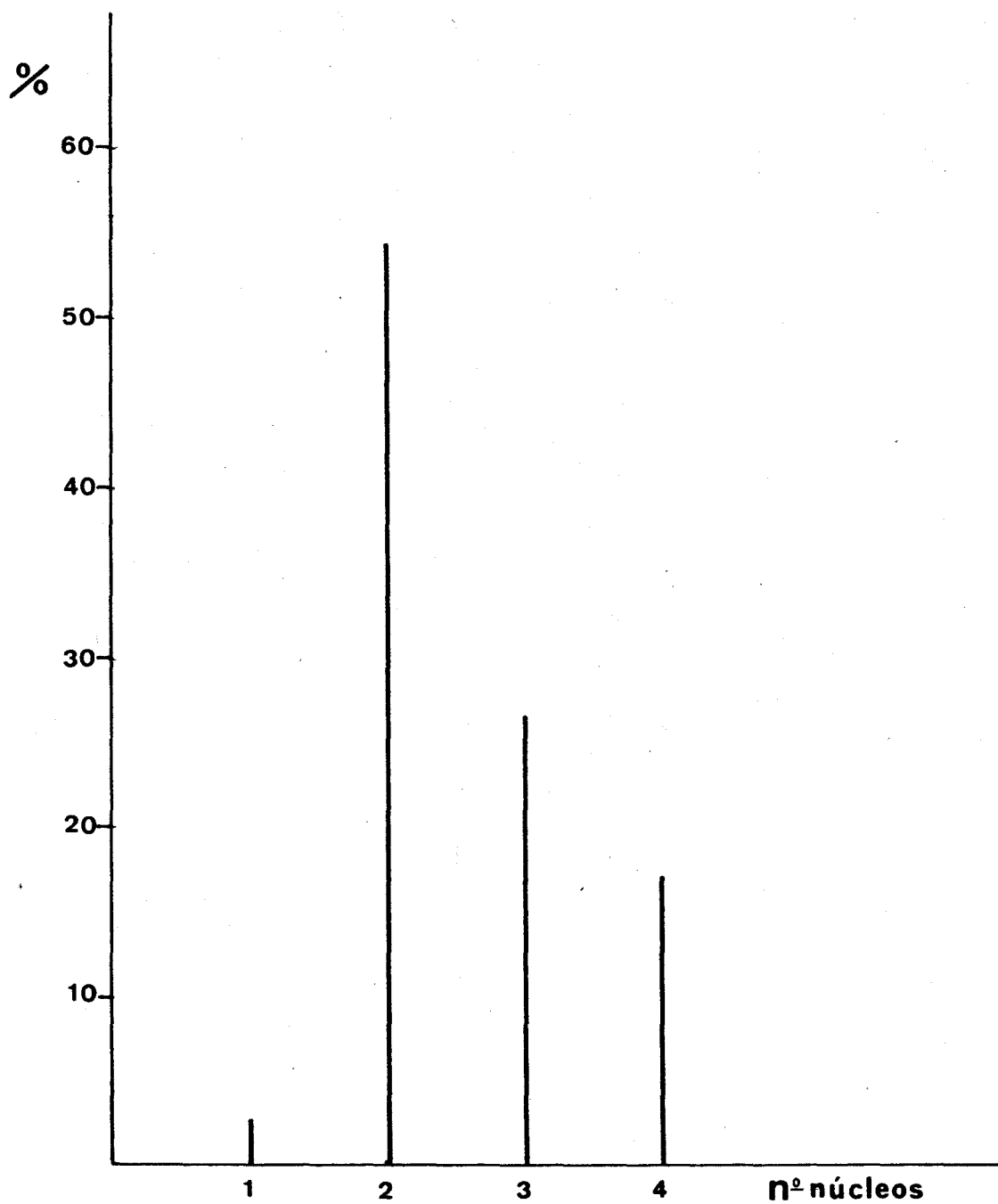


Figura 10.- Distribución del número de fragmentos macronucleares en 83 próteros procedentes de la división desigual.

a 6, la mayoría de los individuos tienen de 4 a 5 fragmentos.

A pesar de las observaciones anteriores, para asegurarnos de que el reparto de ADN era desigual y lo que es más, más desigual que el que se efectuaba en la división normal, aplicamos los mismos tipos de análisis empleados para la división normal, sobre una población de 45 individuos en las últimas fases de la división desigual.

Las medidas citofotométricas de contenido de ADN de pares de células hermanas dieron la distribución de coeficientes de reparto que se representa en la fig.12. Los coeficientes de reparto de las 45 parejas de células hermanas oscilan entre 1 y 4,6 y la media y desviación típica presentadas fueron de 1,66 y 0,66 respectivamente. Como puede apreciarse, la media de coeficientes de reparto obtenida es considerablemente más alta que la que se calculó para una población de células en división normal.

El análisis de correlación hecho con los 45 pares de valores de ADN dió un coeficiente de correlación de $r=+0,35$. Figura 13. Este coeficiente de correlación es bastante más bajo que el hallado para la división normal.

Por último la distribución de diferencias en

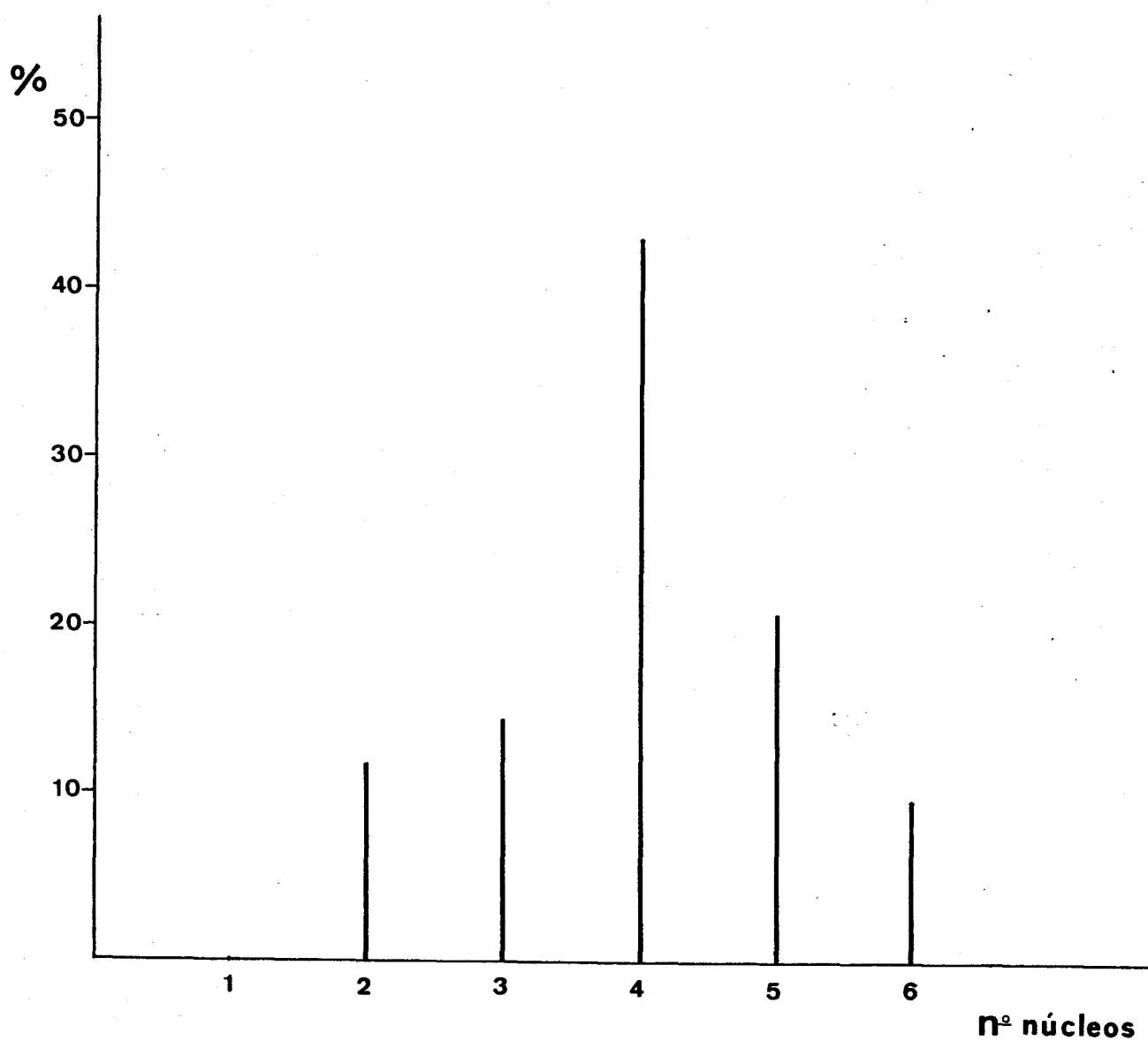


Figura 11..- Distribución del número de fragmentos macronucleares en 111 opistos procedentes de la división desigual.

Figura 12.- Distribución de coeficientes de reparto de ADN macronuclear de 45 células en división desigual.

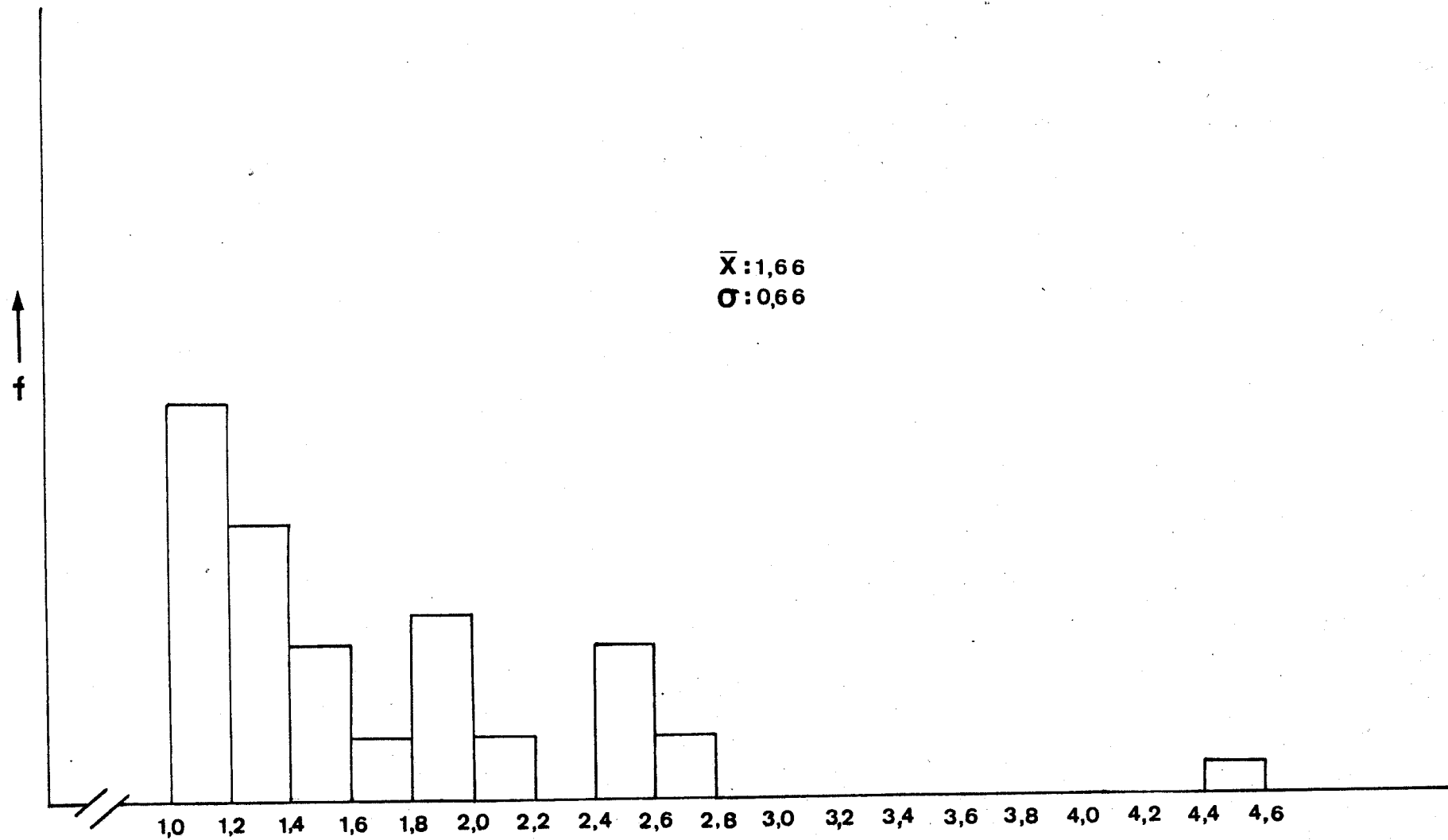
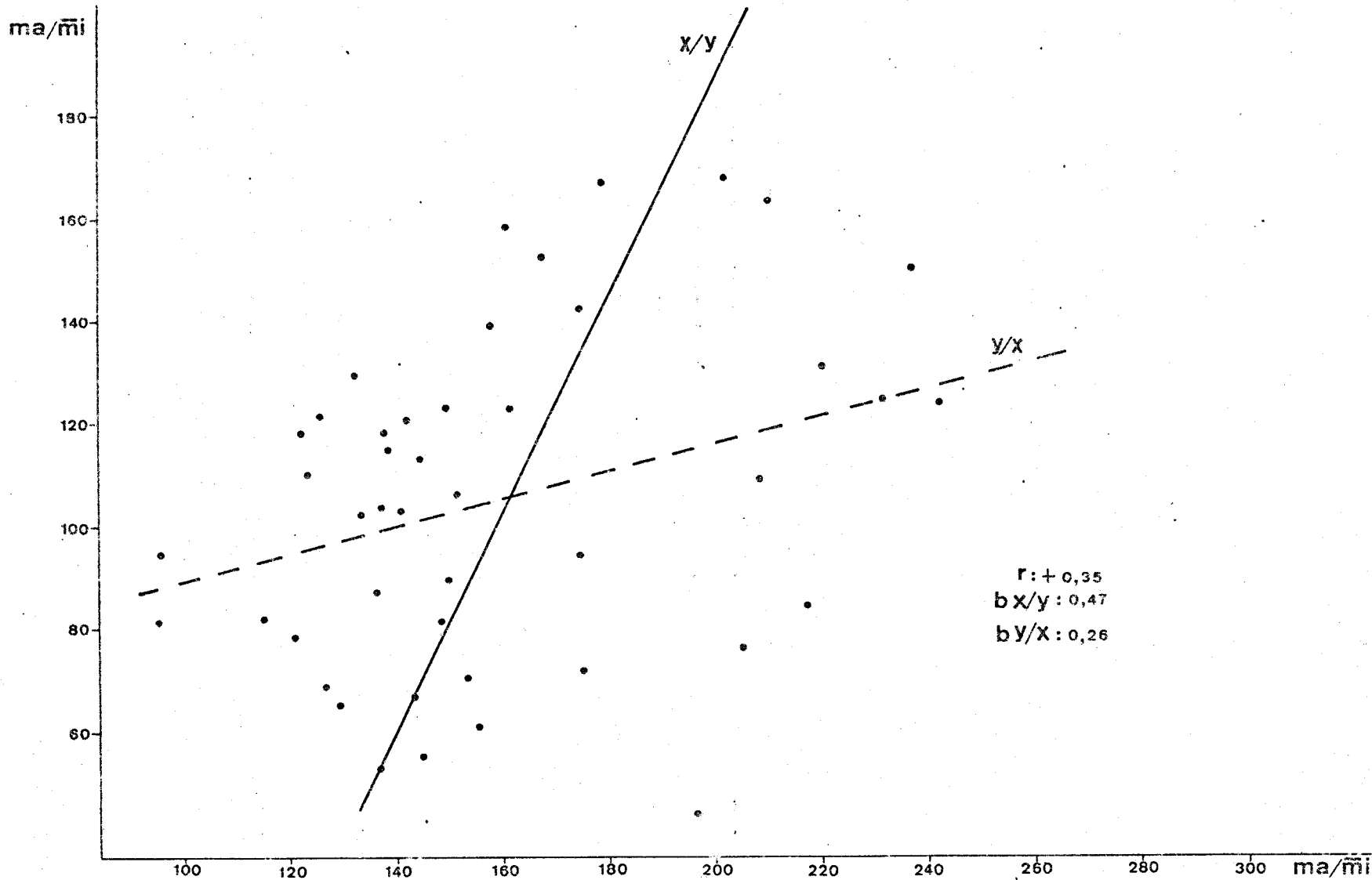


Figura 13.- Recta de regresión y coeficiente de correlación de 45 pares de células hermanas, procedentes de la división desigual.



contenido de ADN macronuclear entre pares de células hermanas varía de 0 a 140%. La media de esta distribución fue de 42,30%, bastante más alta que la encontrada en la distribución de diferencias entre células hermanas de la división normal, y la desviación típica hallada fue de 31,10. Figura 14.

3.5.- Evolución del contenido de ADN macronuclear en cultivos clónicos de los productos de la división desigual.- El siguiente paso en nuestro estudio fue observar que ocurría en clones formados a partir de individuos que, como habíamos comprobado, poseían mucha diferencia en contenido de ADN macronuclear. Para ello, tomamos células en vías de división desigual y a partir de cada una de ellas obtuvimos dos cultivos clónicos: uno que tenía como origen el prótero, y otro, el opisto. La cantidad de ADN en G_1 de dos de estas parejas de clones se midieron a los 13 días de iniciados los cultivos y los resultados se encuentran reflejados en las figuras 15 y 16. En las figuras 17 y 18 se muestra el mismo estudio con pares de clones a los 7 días, y por último, en las figuras 19, 20, 21 y 22 presentamos la distribución de cuatro pares de clones analizados al cabo de 5 días.

Como se puede apreciar en todas las gráficas, no existen diferencias entre las poblaciones clónicas procedentes de uno u otro producto de división, ni tampoco

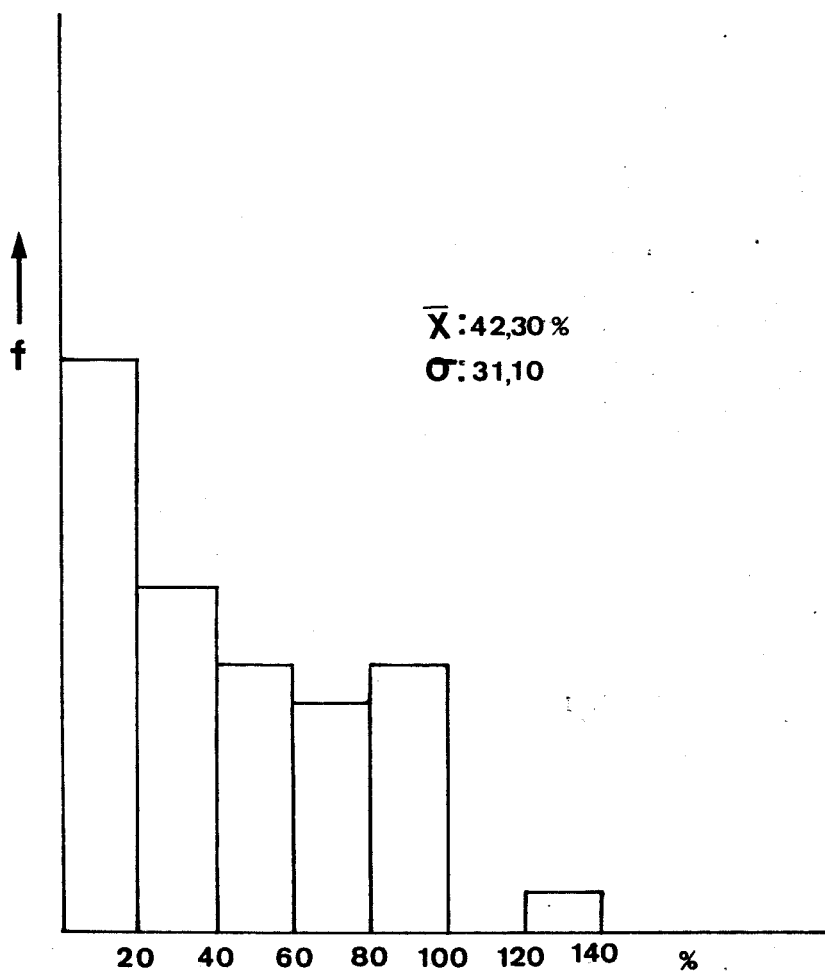


Figura 14.- Distribución de diferencias de contenido de ADN macronuclear, en 45 pares de células hermanas productos de la división desigual.

las hay en relación con una población normal de L.a-
cuminata en G_1 .

Esto demuestra que antes de los cinco días ha operado un mecanismo que ha equilibrado las poblaciones anulando las primitivas diferencias que existían entre las células que originaron las parejas de clones. En este punto, decidimos estudiar las poblaciones formadas de próteros y opistos de una división desigual entre 0 y 5 días. Como era imposible realizar este estudio con poblaciones clónicas, recurrimos a poblaciones no clónicas. Las medidas realizadas inmediatamente después de la separación de las células hijas se recogen en la figura 23. En la parte superior de la gráfica se encuentra la distribución de la población de próteros, su media es $103,52 \text{ Ma}/\bar{m}_i$ y su ∇ es $24,39$. En la parte inferior se halla la distribución de la población de opistos, su $x=147,41$ y su $\nabla=24,82$.

Transcurrido un día, hicimos preparaciones de ambas poblaciones, los resultados se encuentran en la figura 24. La población derivada de los próteros presentó una distribución cuya media fué igual a $183,90$ y su desviación típica $34,21$; como puede apreciarse ambos valores han experimentado un aumento significativo con respecto a los valores iniciales. En cambio en la población derivada de los opistos la media fue de $169,72$ y la des-

Figura 15.- Distribución de contenidos de ADN macronuclear, en G_1 , de un par de clones a los 13 días de la iniciación de los mismos. En la parte superior se encuentra la distribución del clón que procede del prótero y en la inferior la del que procede del opisto. Ambos, prótero y opisto, son productos de una célula que ha sufrido división desigual.

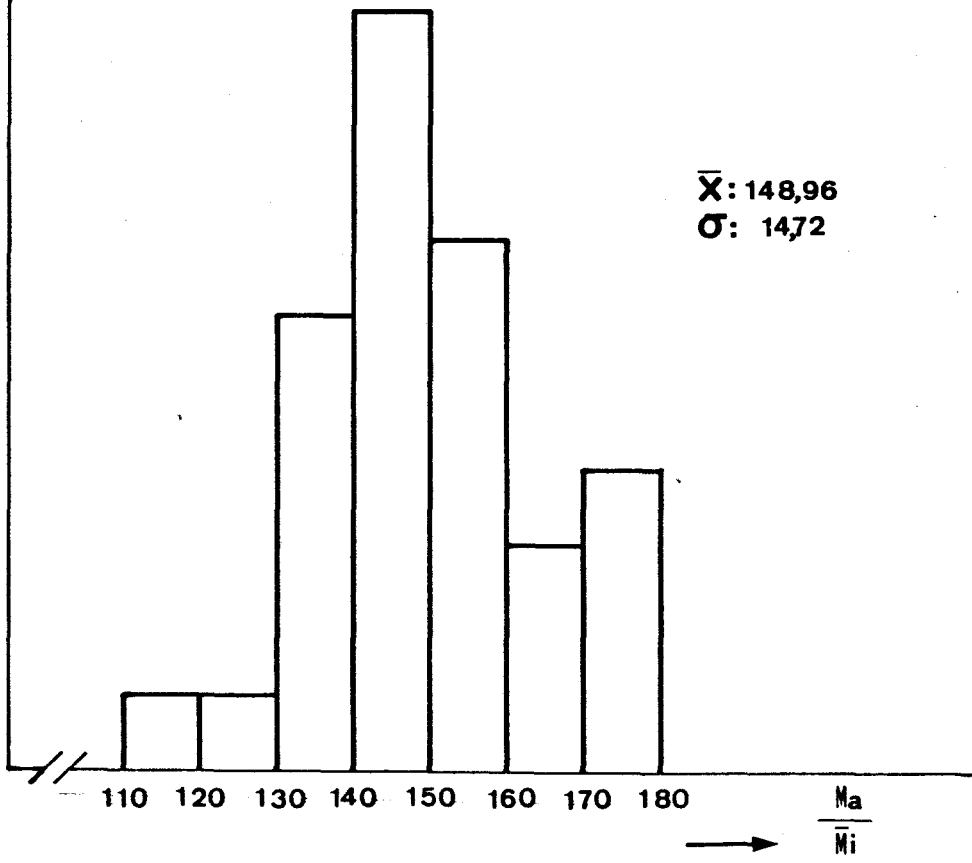
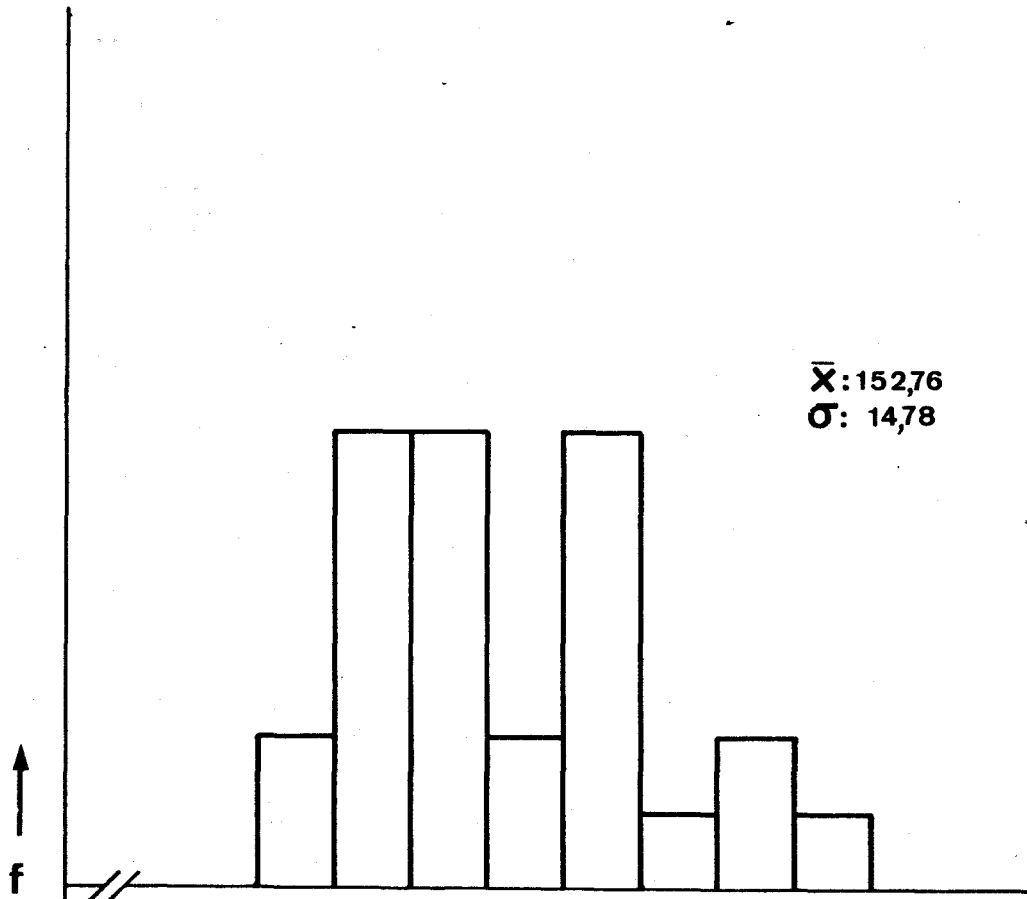


Figura 16.- Idem de la figura anterior, el origen de estos clones, es otra célula en división desigual.

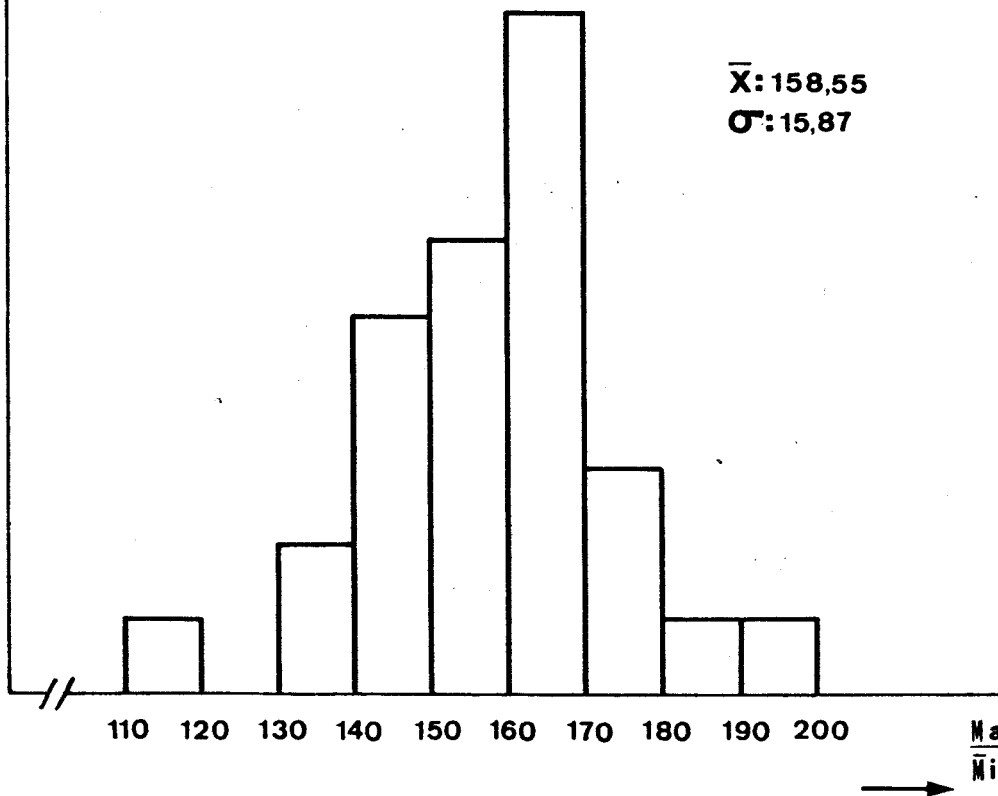
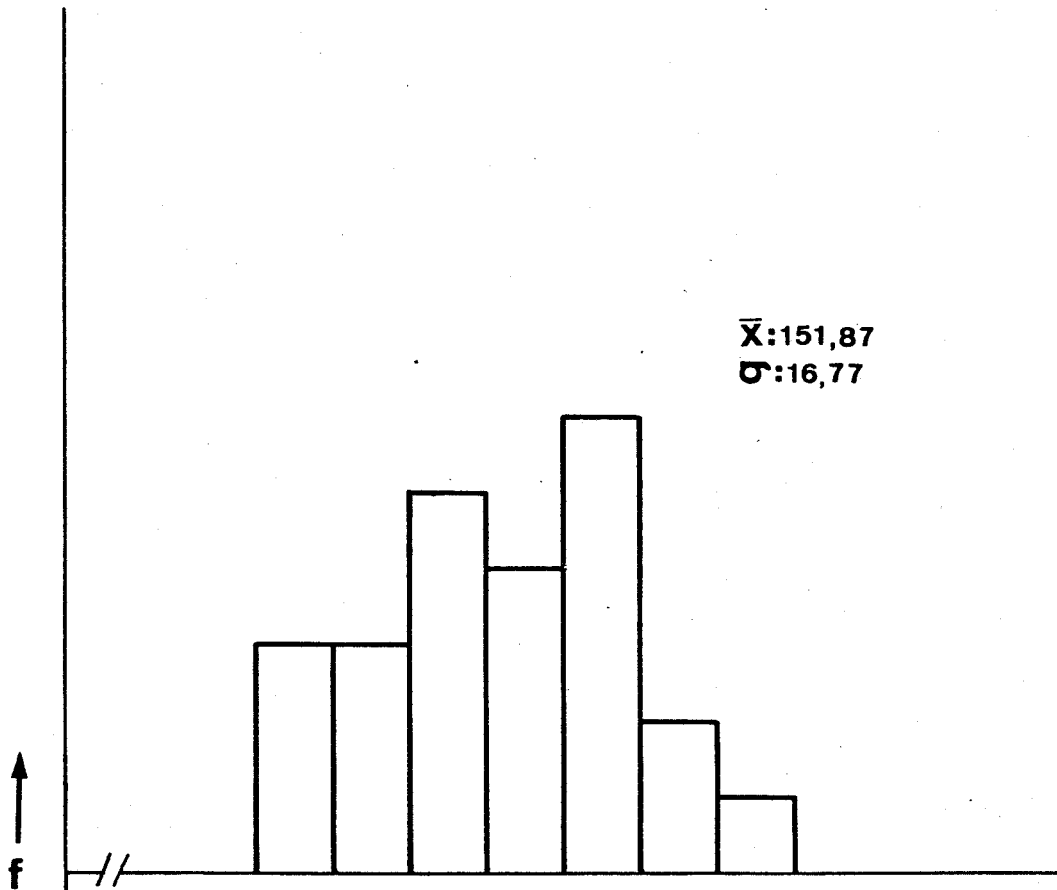


Figura 17.- Distribución de contenidos de ADN macronuclear, en G_1 , de un par de clones a los 7 días de la iniciación de los mismos. En la parte superior se encuentra la distribución del clón que procede del prótero y en la inferior la del que procede del opisto, de una célula que ha sufrido división desigual.

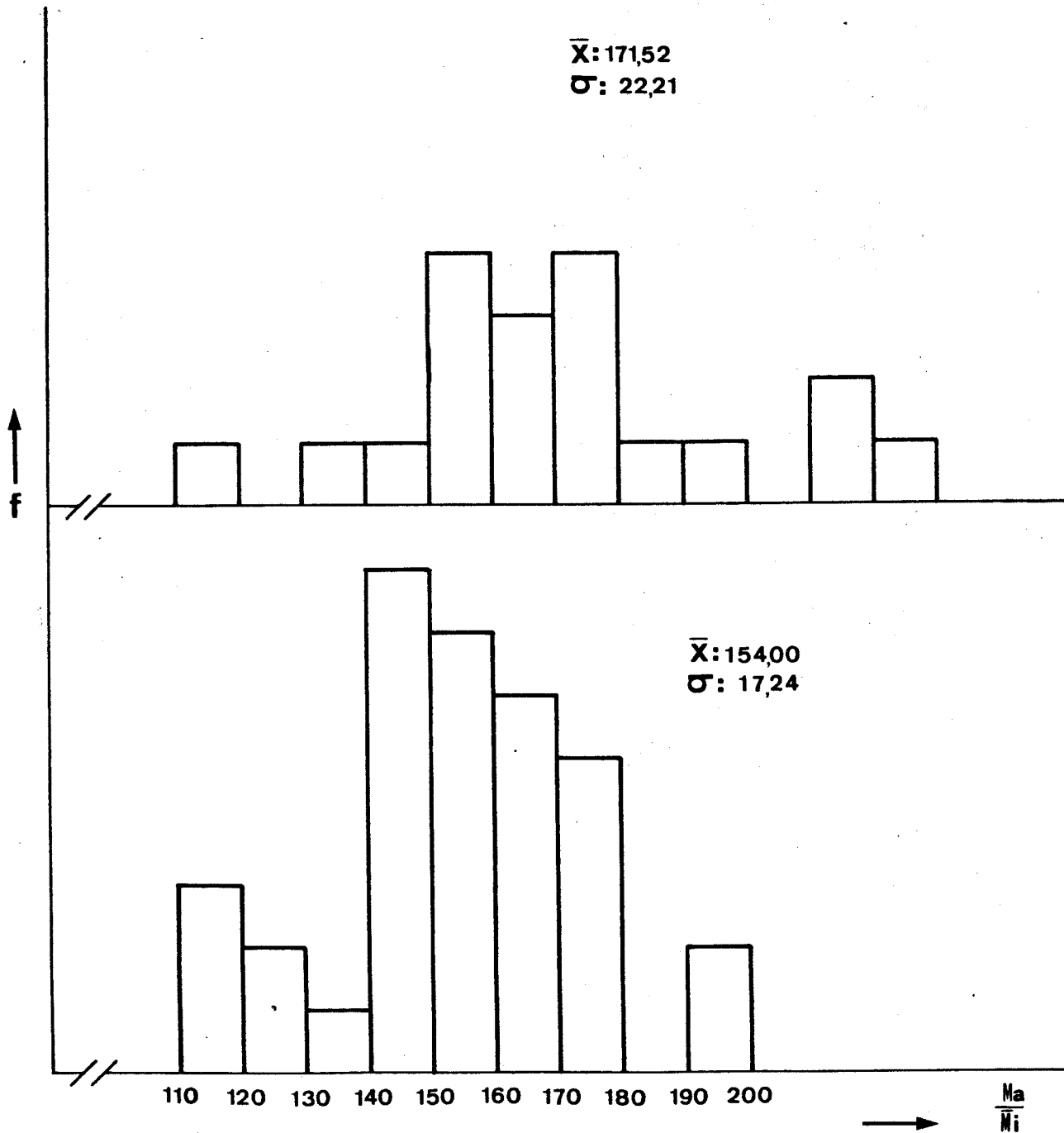


Figura 18.-. Idem de la figura anterior, el origen de estos dos clones, también es una célula que ha tenido la división desigual.

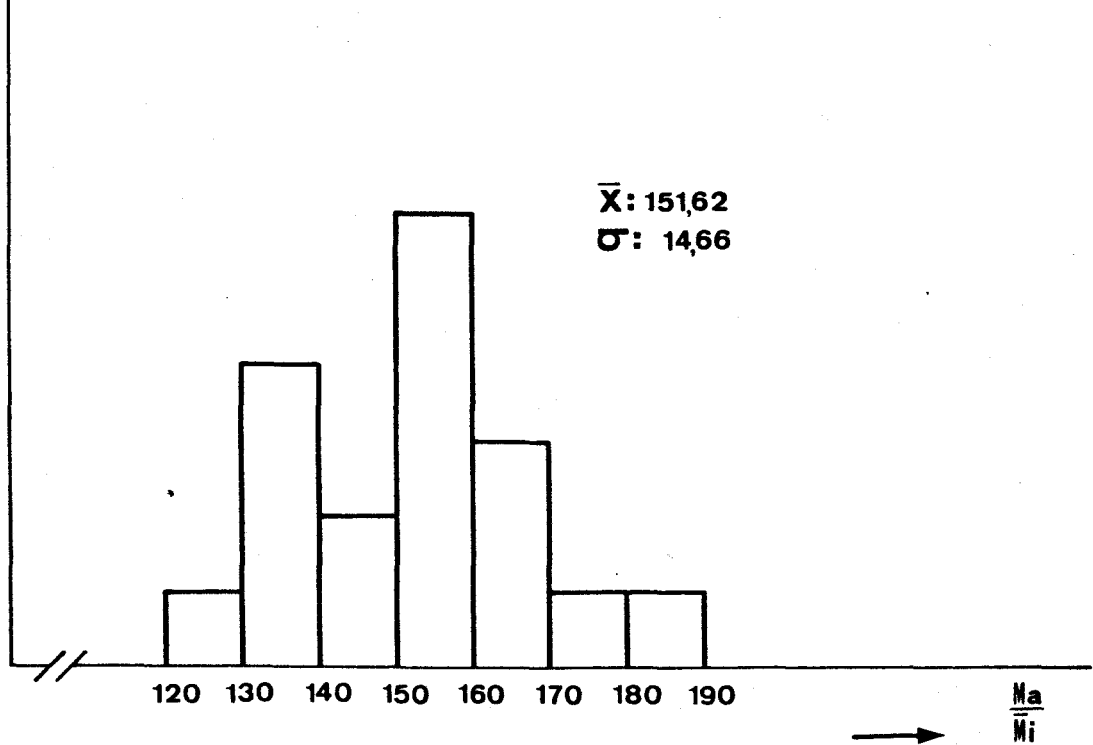
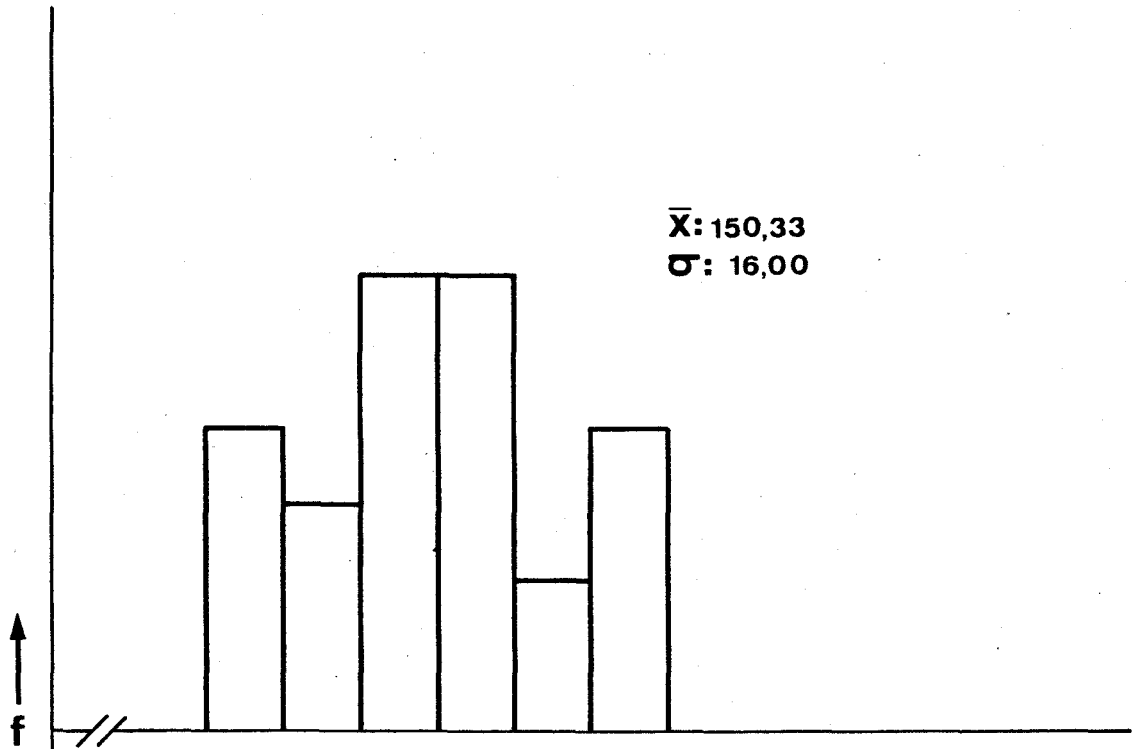
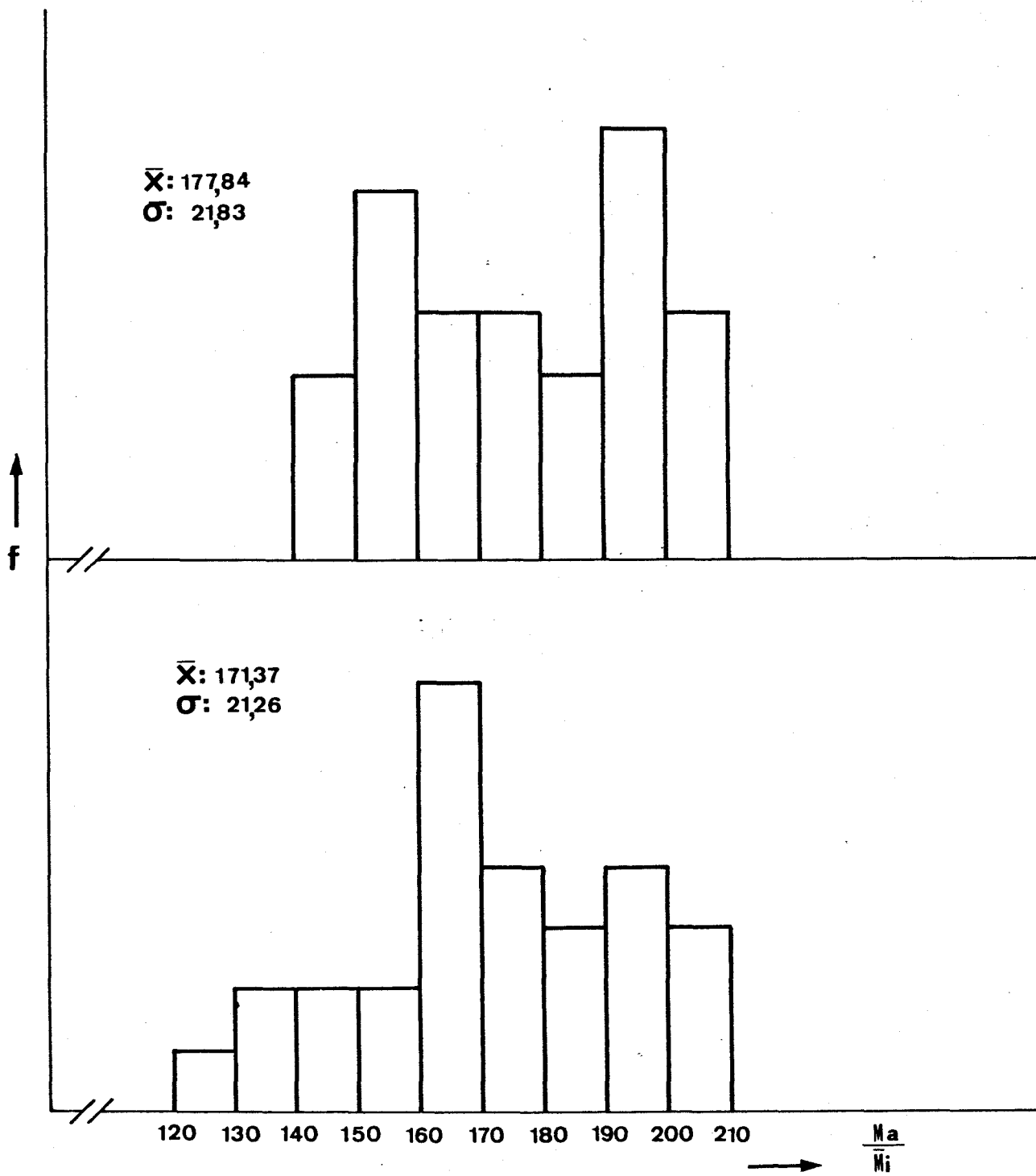


Figura 19.- Distribución de contenidos de ADN macronuclear, en G_1 , de un par de clones a los 5 días de la iniciación de los mismos. En la parte superior se encuentra la distribución del clón que procede del prótero y en la inferior la del que procede del opisto. Ambos, prótero y opisto, son productos de una célula que ha sufrido división desigual.



Figuras 20, 21 y 22.- Idem de la figura anterior, cada par de clones de una figura procede de una célula que ha sufrido división desigual.

fig. 20

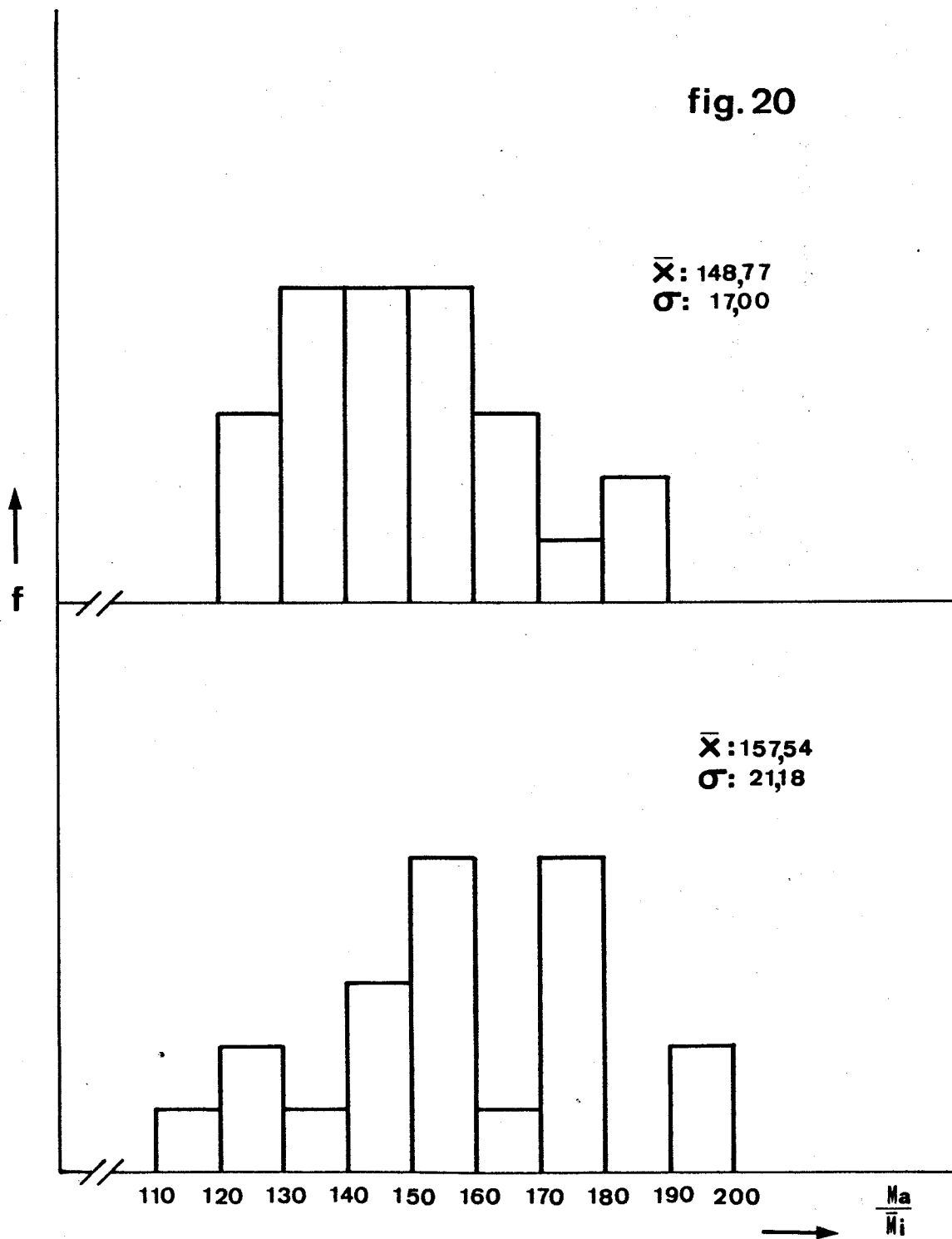


fig. 21

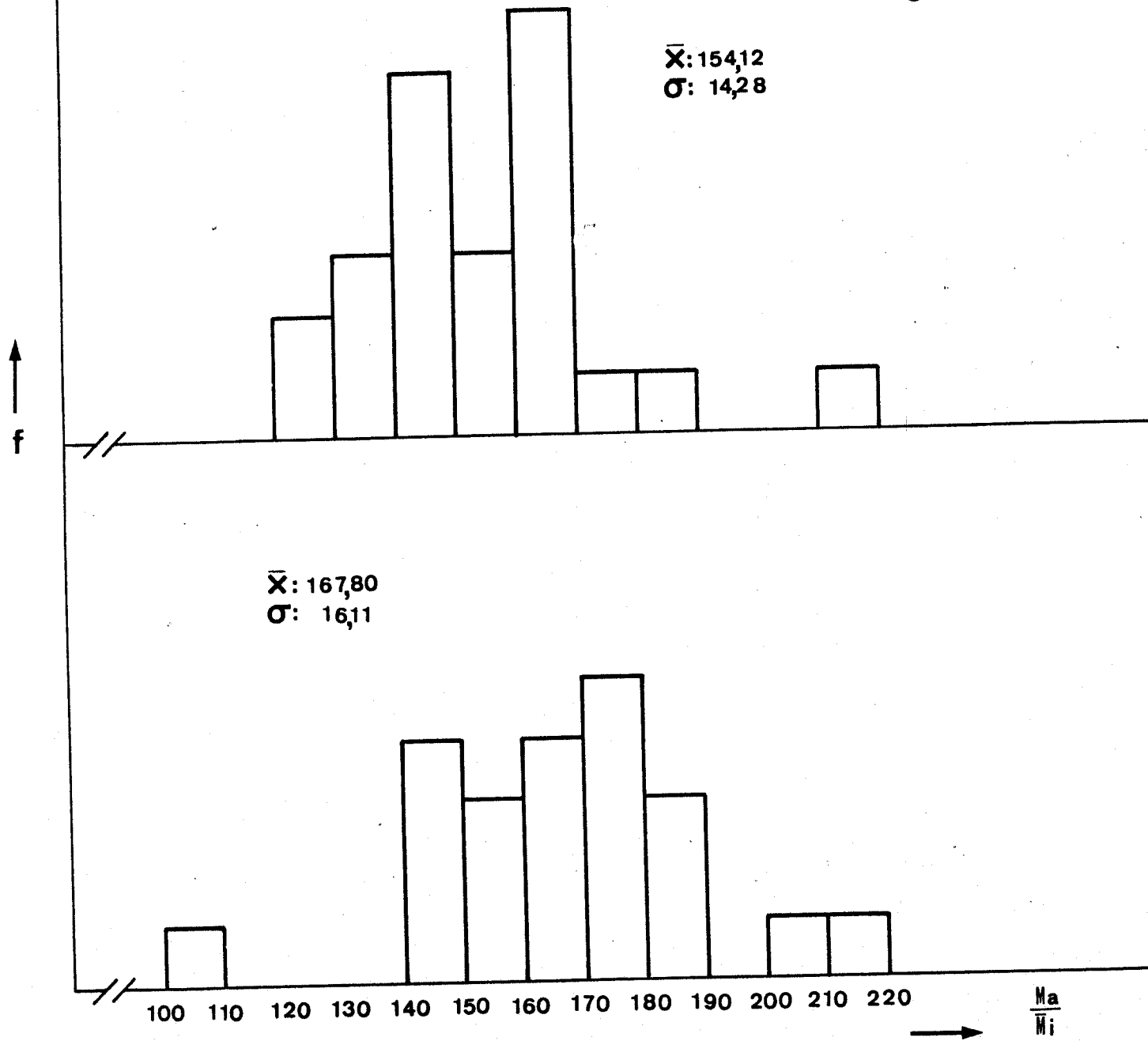


fig.22

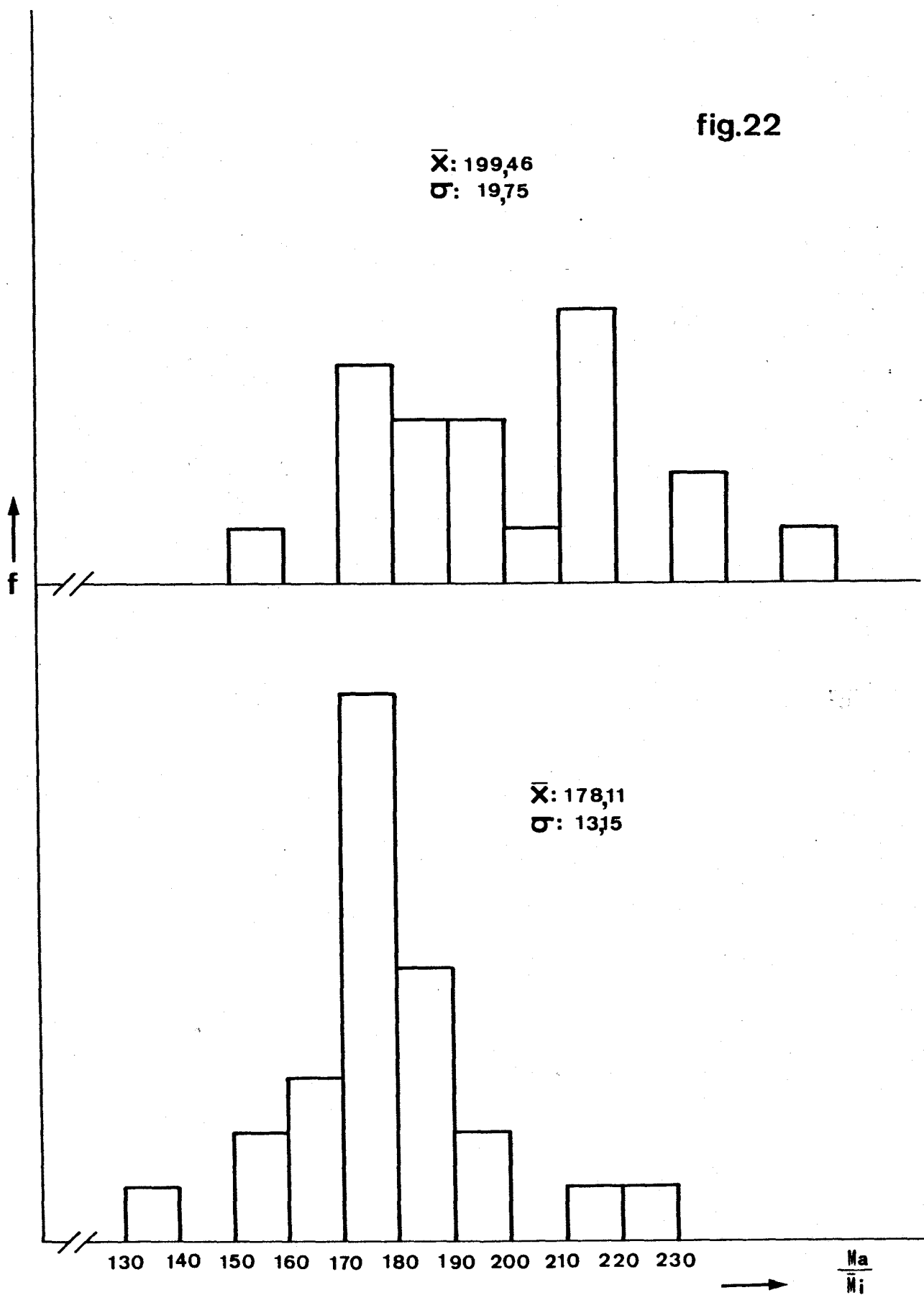
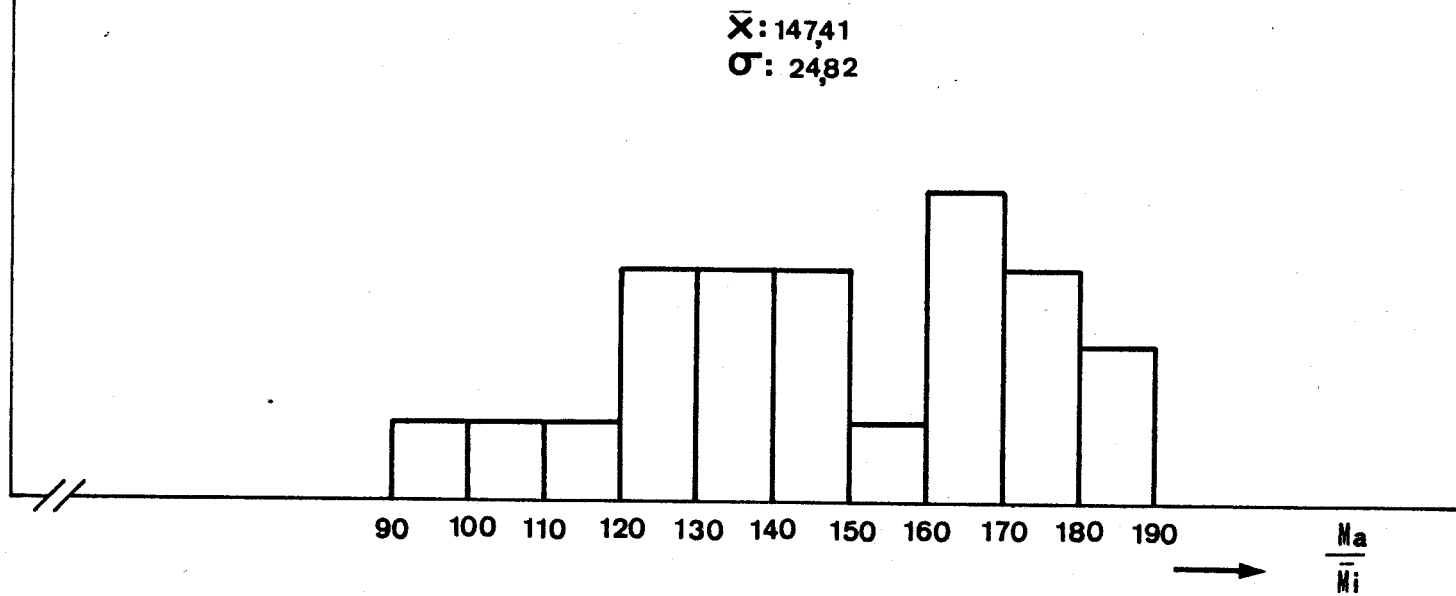
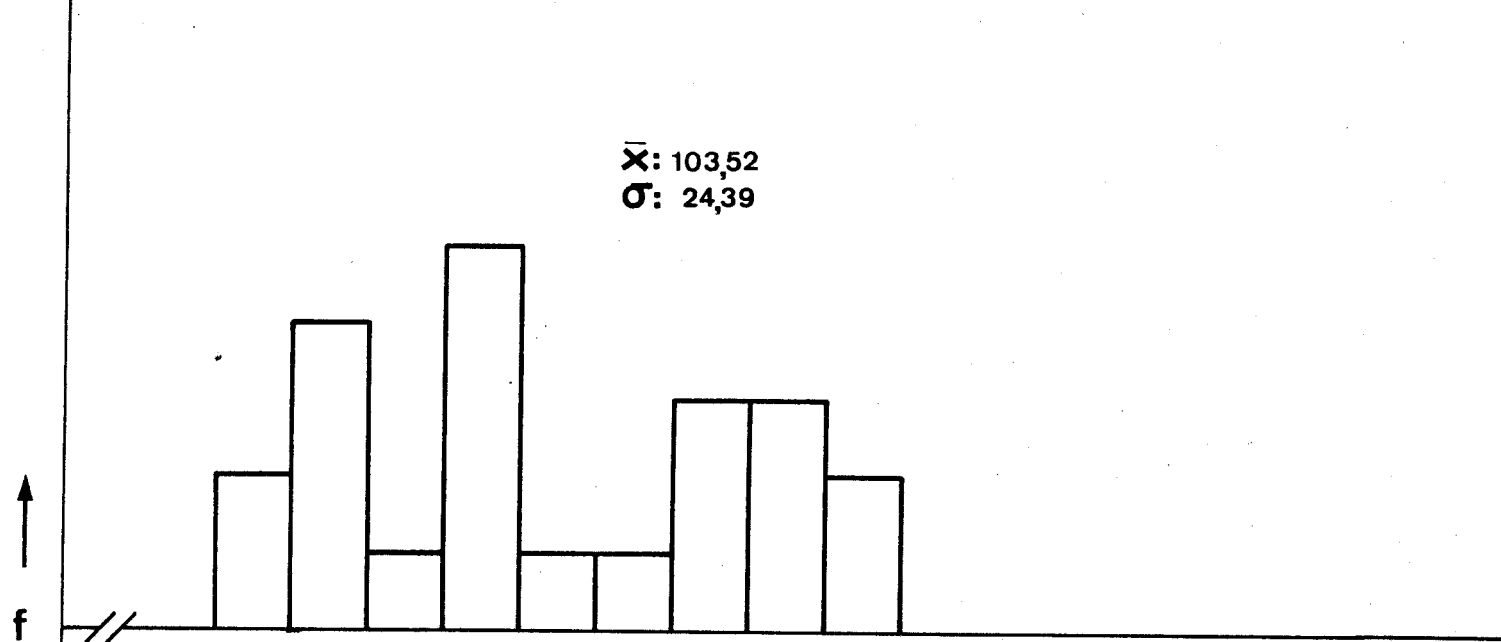


Figura 23.- Distribución del contenido de ADN macronuclear de próteros (parte superior de la gráfica) y opistos (parte inferior), en el momento de la separación de una población con división desigual.



viación típica de 31,74.

En las figuras 25, 26 y 27 presentamos las medidas de ADN macronuclear en ambas poblaciones a los dos, tres y cuatro días respectivamente.

Del estudio de todas estas distribuciones se puede comprobar que las dos poblaciones presentan fluctuaciones en su media y desviación, del mismo tipo que las observadas en poblaciones clónicas formadas a partir de individuos normales de una población de L.acuminata.

3.6.- Regulación del contenido de ADN.- En vista de los resultados obtenidos al estudiar las poblaciones de productos de una división desigual, decidimos estudiar la variación en el contenido de ADN a lo largo del ciclo celular que sigue inmediatamente a la división desigual, por considerar que durante el transcurso del mismo operaba algún mecanismo que compensaba las diferencias resultantes de la división desigual.

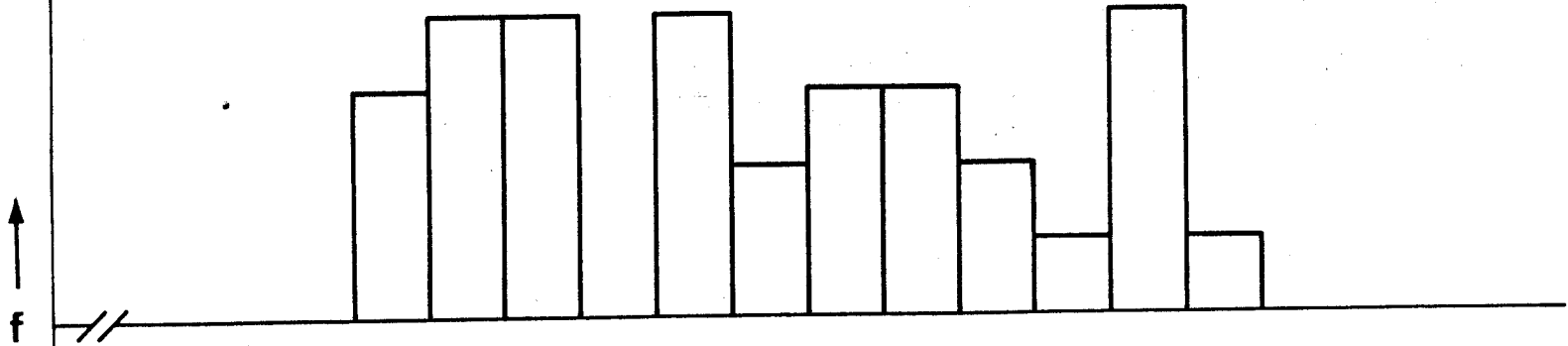
En principio, una vez que se ha producido la división, el prótero que posee una zona adoral de membranas incompleta, comienza su regeneración. La duración de este proceso, 2,5 a 3 horas, así como los fenómenos corticales y nucleares que tienen lugar, son los que se observan en una regeneración normal de L.acuminata (38).

La regeneración comienza con la aparición de un

Figuras 24,25,26 y 27.- Distribución del contenido de ADN macronuclear de las poblaciones de próteros y opistos, de la figura anterior, después de 1,2,3 y 4 días de crecimiento respectivamente.

fig.24

\bar{X} : 183,90
 σ : 34,21



\bar{X} : 169,72
 σ : 31,74

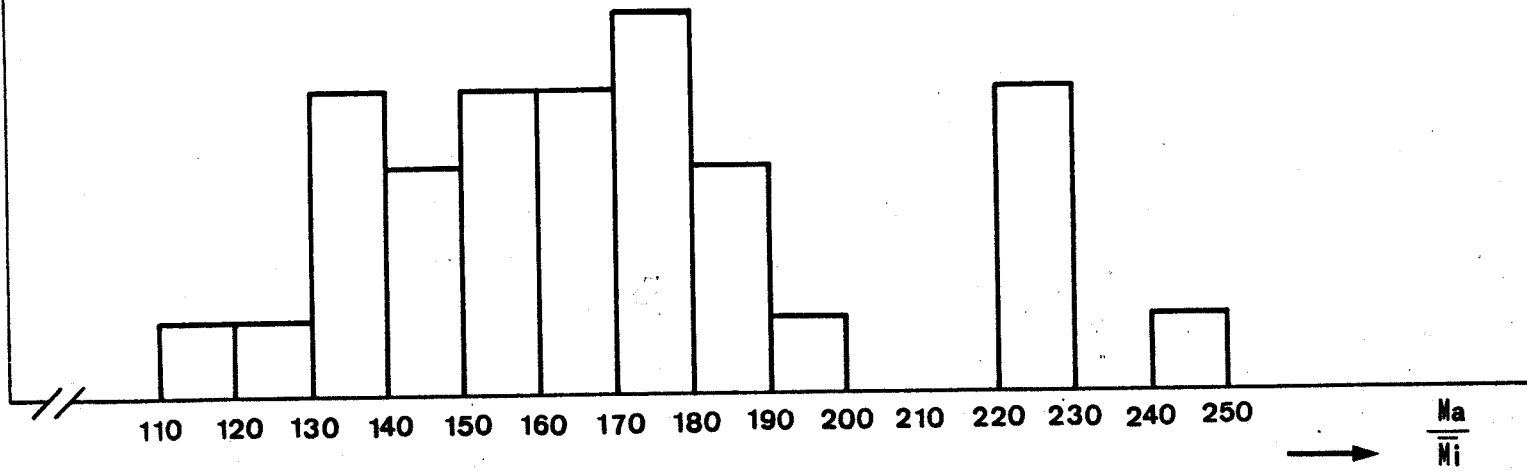
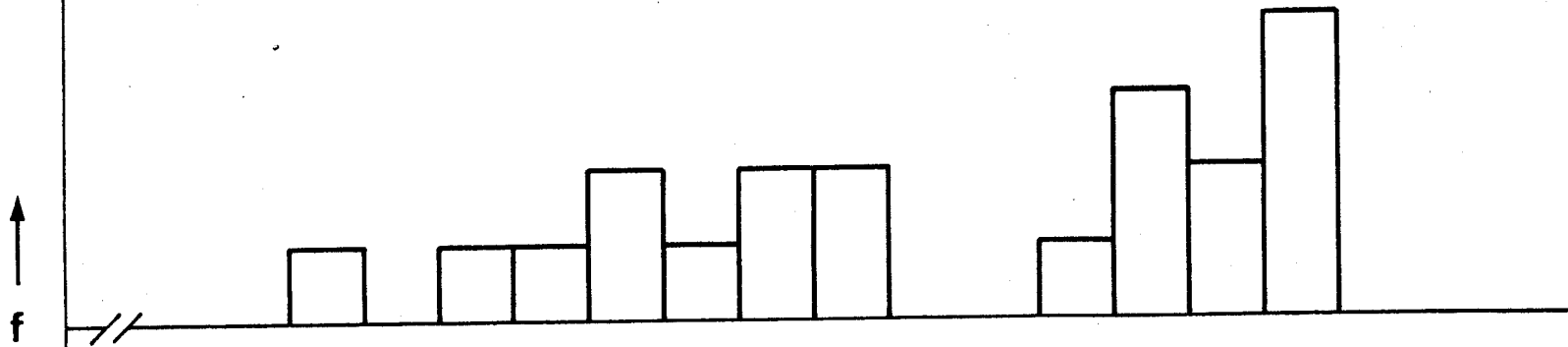


fig.25

\bar{X} : 195,80
 σ : 41,25



\bar{X} : 170,31
 σ : 29,47

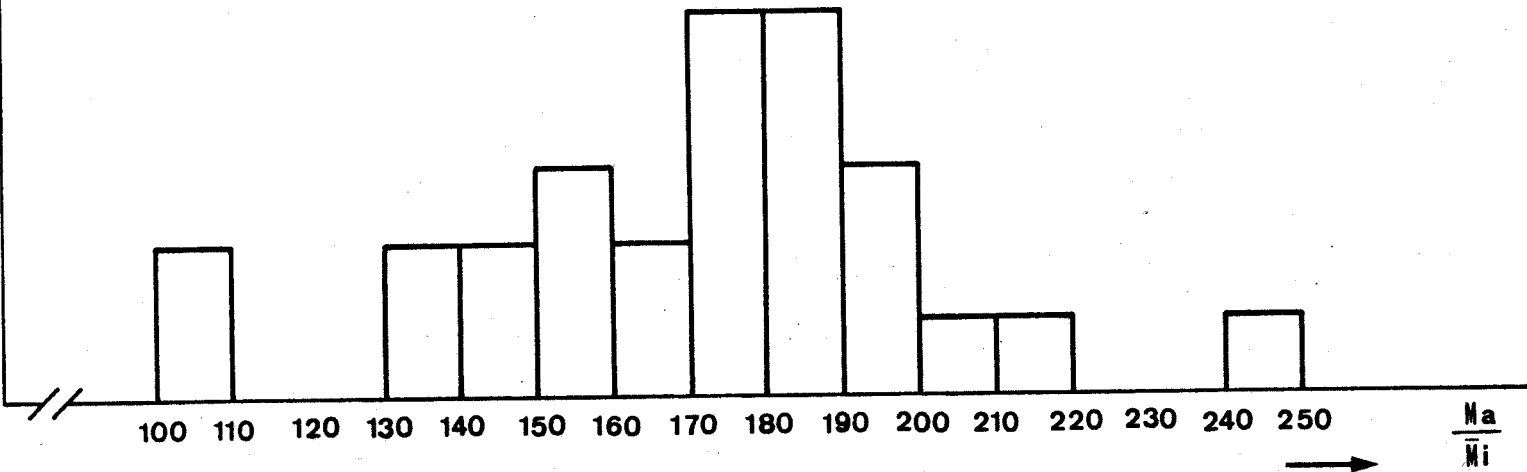


fig.26

\bar{X} : 140,25
 σ : 25,28

f ↑

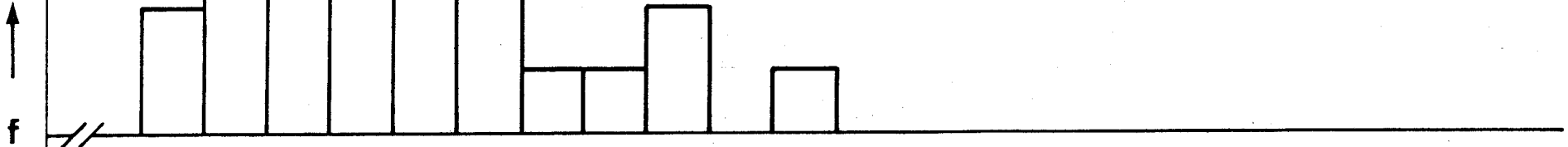
\bar{X} : 157,69
 σ : 20,50

110 120 130 140 150 160 170 180 190 200 210

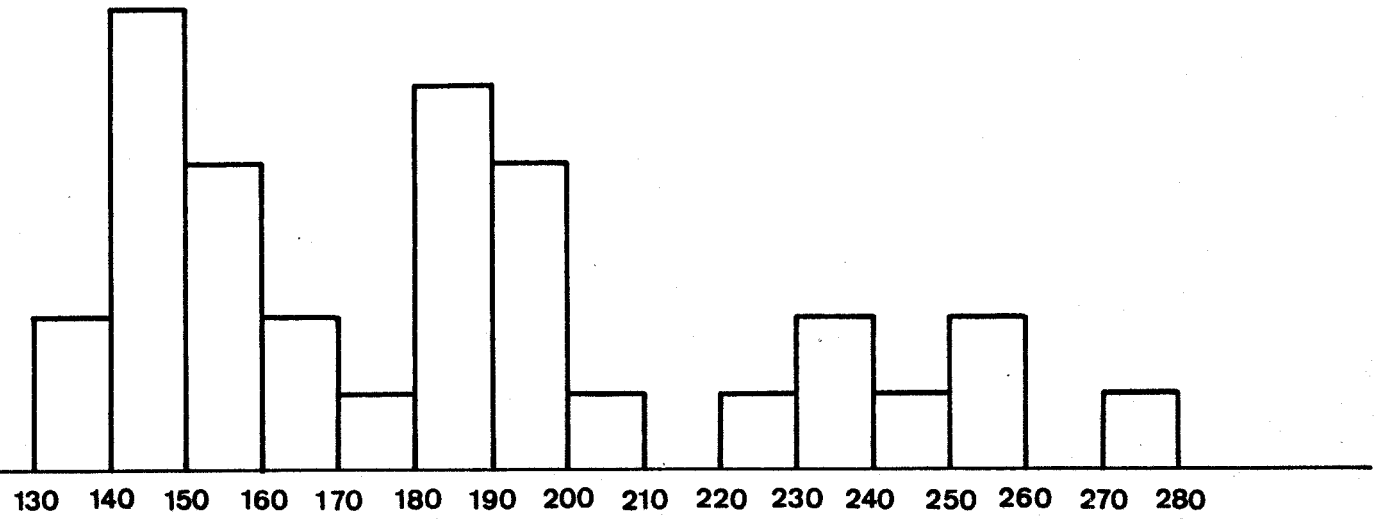
→ $\frac{M_a}{M_i}$

fig.27

\bar{X} : 12166
 σ : 2331



\bar{X} : 184.64
 σ : 38.55



$\frac{Na}{Ni}$



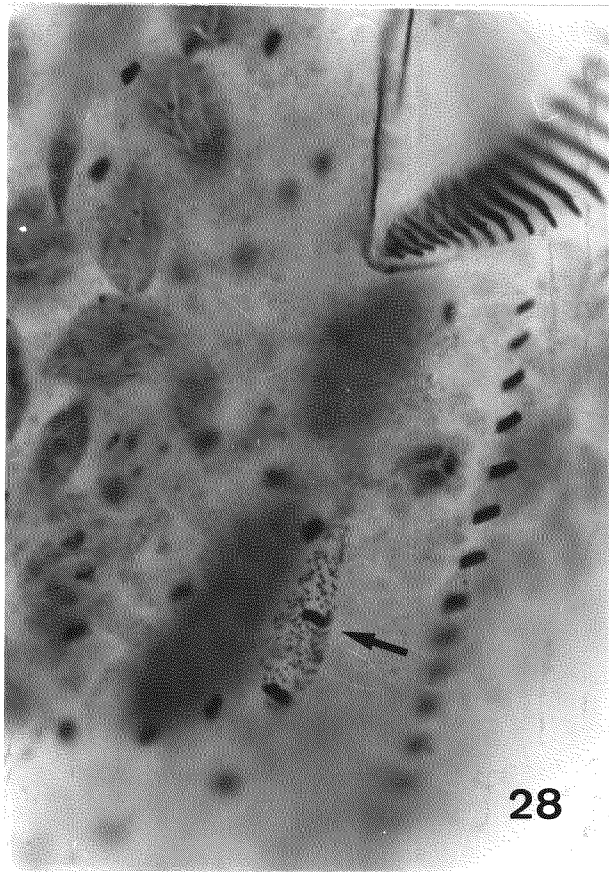
grupo de cinetosomas, en relación con los transversales I/II, I/III y I/IV que darán lugar al primordio oral (figuras 28 y 29). Después de alcanzar el vértice peristomático, este primordio se fragmentará originando en la zona derecha del individuo los primordios de los cirros frontoventrales; a dicha formación contribuyen también los cirros frontoventrales antiguos que se desintegran totalmente. El resto del primordio oral no fragmentado se ordena en membranelas y se une a las membranelas posteriores del antiguo peristoma, formándose así la nueva Z.A.M. (figuras 30 y 31). También la ciliación dorsal (fig. 32), se origina de nuevo durante este proceso de regeneración.

En la mayoría de los casos, la duración del ciclo celular del prótero fue bastante mayor que la del opisto. En la fig. 33 presentamos los resultados de las medidas de la duración del ciclo de 48 próteros; como puede observarse, los ciclos oscilan entre 8 y 20 horas, la media encontrada fue de 15 horas y la desviación típica de 3 horas 15 minutos.

La fig. 34 muestra el mismo estudio, hecho con 48 opistos: los ciclos van desde las 7 a las 12 horas, la media hallada fue de 8h. 35' y la desviación de 1h. 10'.

Las diferencias (expresadas en horas) entre los ciclos celulares de los dos productos de las 48 células en división se representan en la fig. 35; la media de la

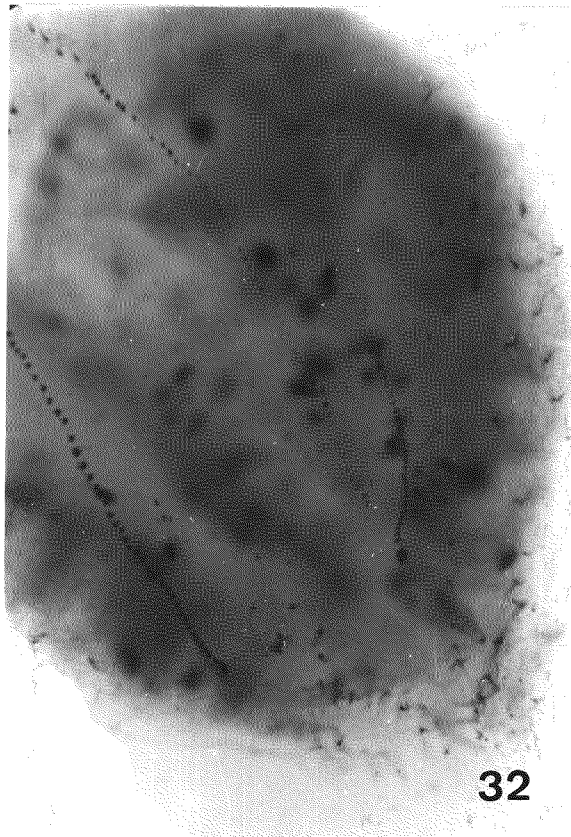
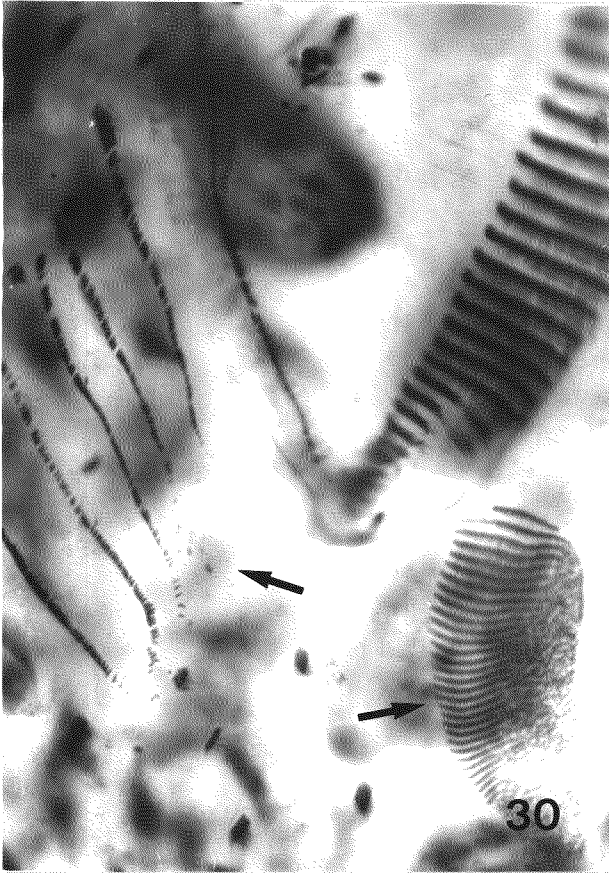
Figuras 28 y 29.- Micrografías de un prótero en regeneración mostrando la aparición de un primordio oral en relación con los cirros transversales. Protargol.



DPO. ZOÓLOGIA
FAC. BIOLOGIA

Figuras 30 y 31.- Micrografías que muestran la formación de los cirros fronto-ventrales y la nueva zona adoral de membranelas. Protargol.

Figura 32.- Micrografía que muestra la formación de la nueva ciliación dorsal. Protargol.



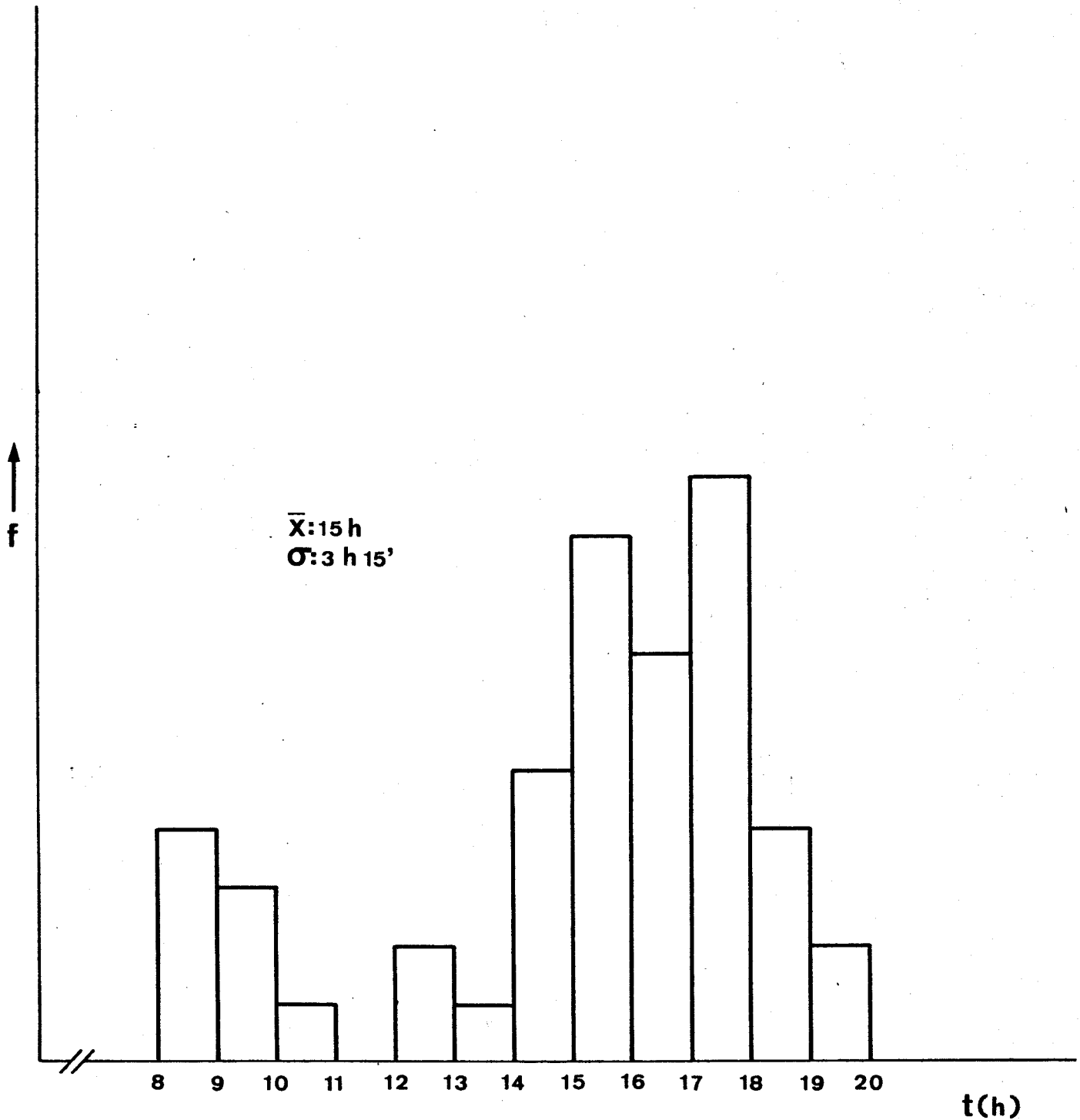


Figura 33.- Distribución de la duración del ciclo celular, en horas, de 48 prótereros que proceden de la división desigual.

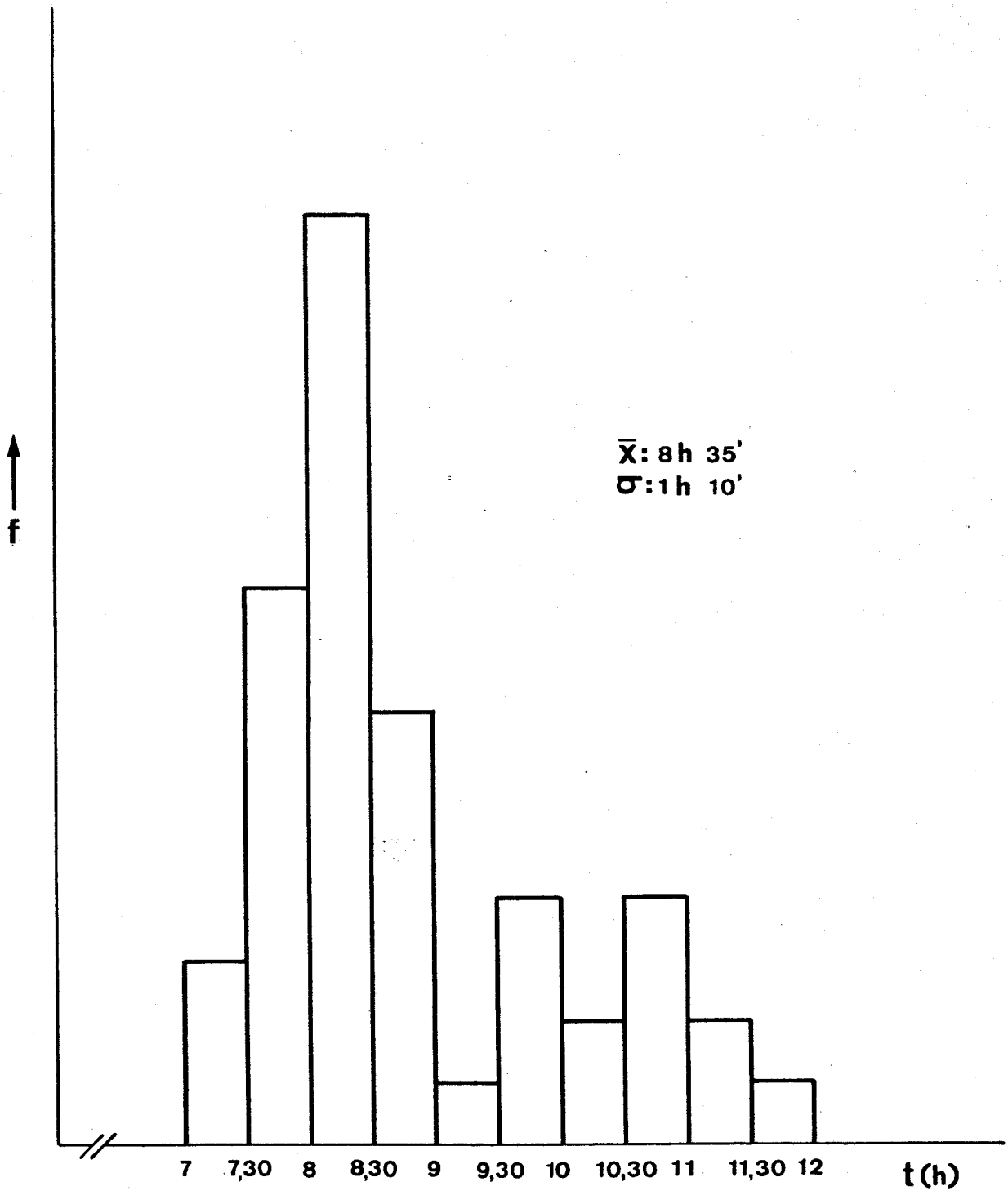


Figura 34.- Distribución de la duración del ciclo celular, en horas, de 48 opistos que proceden de la división desigual.

distribución fue de 6h. 32' y la $\bar{V} = 3h. 4'$.

Dado que el retraso observado (6h. 32') en la división no es explicable solamente por el tiempo (2,5-3h.) empleado en la regeneración, cabe pensar en la existencia de alguna otra causa determinante de dicho retraso. A fin de encontrar esta posible causa, estudiamos el período S macronuclear tanto en lo que se refiere a su duración como a la variación en el contenido en ADN.

Para ello, una vez que provocamos la división desigual, por medio del tratamiento con urea, procedimos a separar los próteros de los opistos y periódicamente hicimos preparaciones de ambos tipos de individuos, que teñimos con orceína acética para determinar el porcentaje de los mismos que presentaban bandas de replicación. En la población de opistos a las 5h. después de la separación había un 91,18% de individuos que presentaban bandas de replicación y a las 10h. este porcentaje había descendido hasta 0; asimismo, todos los individuos de esta población habían finalizado su división a las 11h.

En cuanto a los próteros, partimos de una población de 166 individuos y tomamos muestras de los mismos a las 5, 8, 11, 15 y 17 horas después de la separación. A las cinco horas, de un total de 35 individuos observados, 6 (17,14%) presentaban bandas de replicación; a las

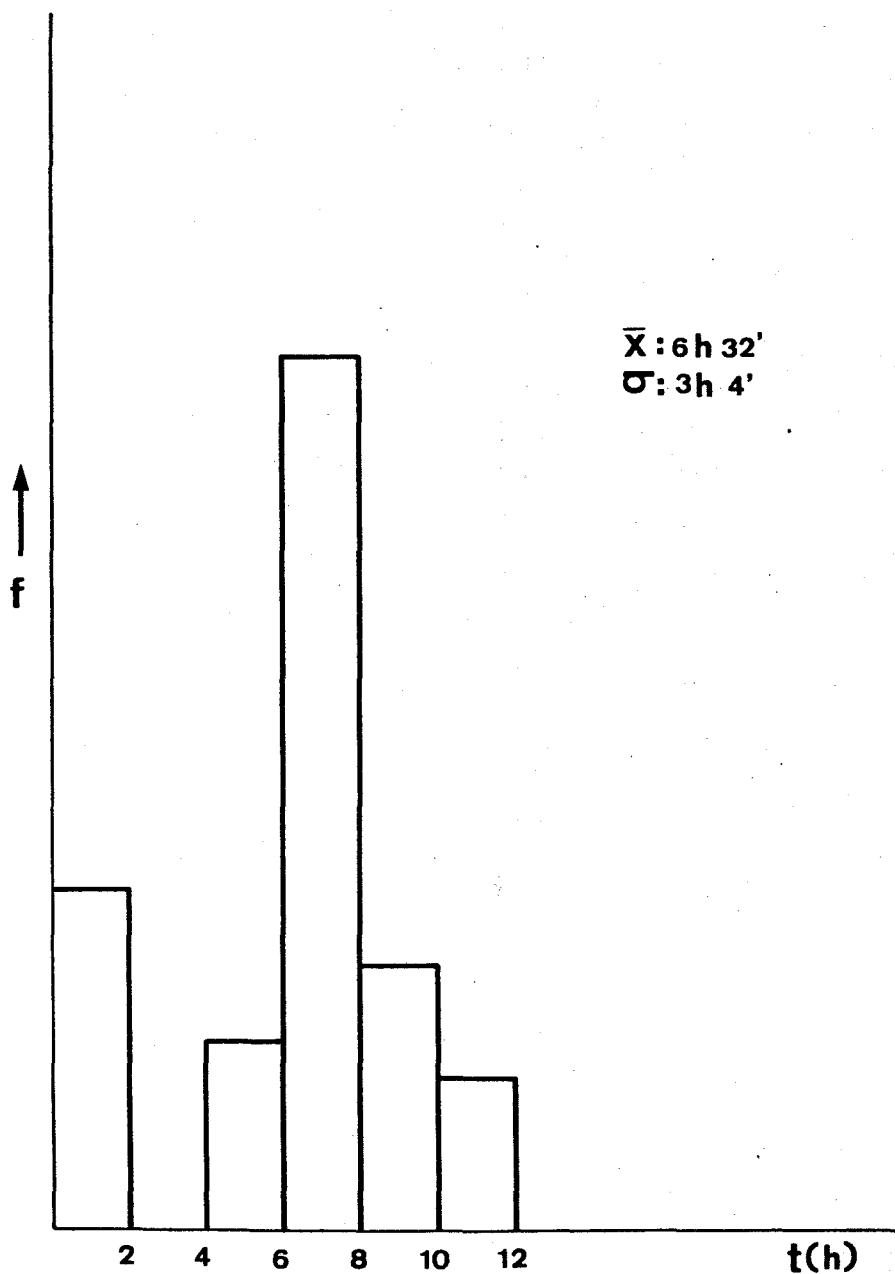


Figura 35.- Distribución de las diferencias, en horas, de los ciclos celulares de los dos productos de 48 células en división desigual.

ocho horas, de un total de 26 individuos, 9 (34,62%) presentaron bandas; a las once horas, de un total de 31 individuos, el 90,32% (28 individuos) mostraron bandas. A las 15h. 35 individuos, de un total de 36 observados, presentaban bandas de replicación. A las 17h. no aparecieron bandas y todos los individuos estaban en vías de división. Fig. 36. Tabla III.

Mediante exámen de esta población de próteros con microscopio estereoscópico se observó que a las 11h. había 9 individuos en división, y a las 14h. 5. Estas células en división fueron separadas del cultivo para evitar errores en la determinación del porcentaje de individuos en período S.

El período S de esta población, no es comparable al encontrado en células procedentes de una división normal. Aceptando que el comienzo del período S tiene lugar cuando el 50% de los individuos de la población presentan bandas de replicación y el final cuando un 50% de los mismos ya ha duplicado su ADN, en la población normal este período ocupa desde las 4h. 30' hasta las 9h. del ciclo mientras que en la población de próteros se extiende desde las 8h. 30' - 9h. hasta las 16h.

Por otra parte, conviene señalar la existencia de dos tipos de individuos dentro de la población de próteros: unos que se dividen aproximadamente al tiempo que lo hacen los opistos y otros que presentan un retraso

Figura 36.- Porcentaje de próteros (—) y opistos (---) con bandas de reorganización, frente al tiempo transcurrido desde el final de la división celular de sigual.

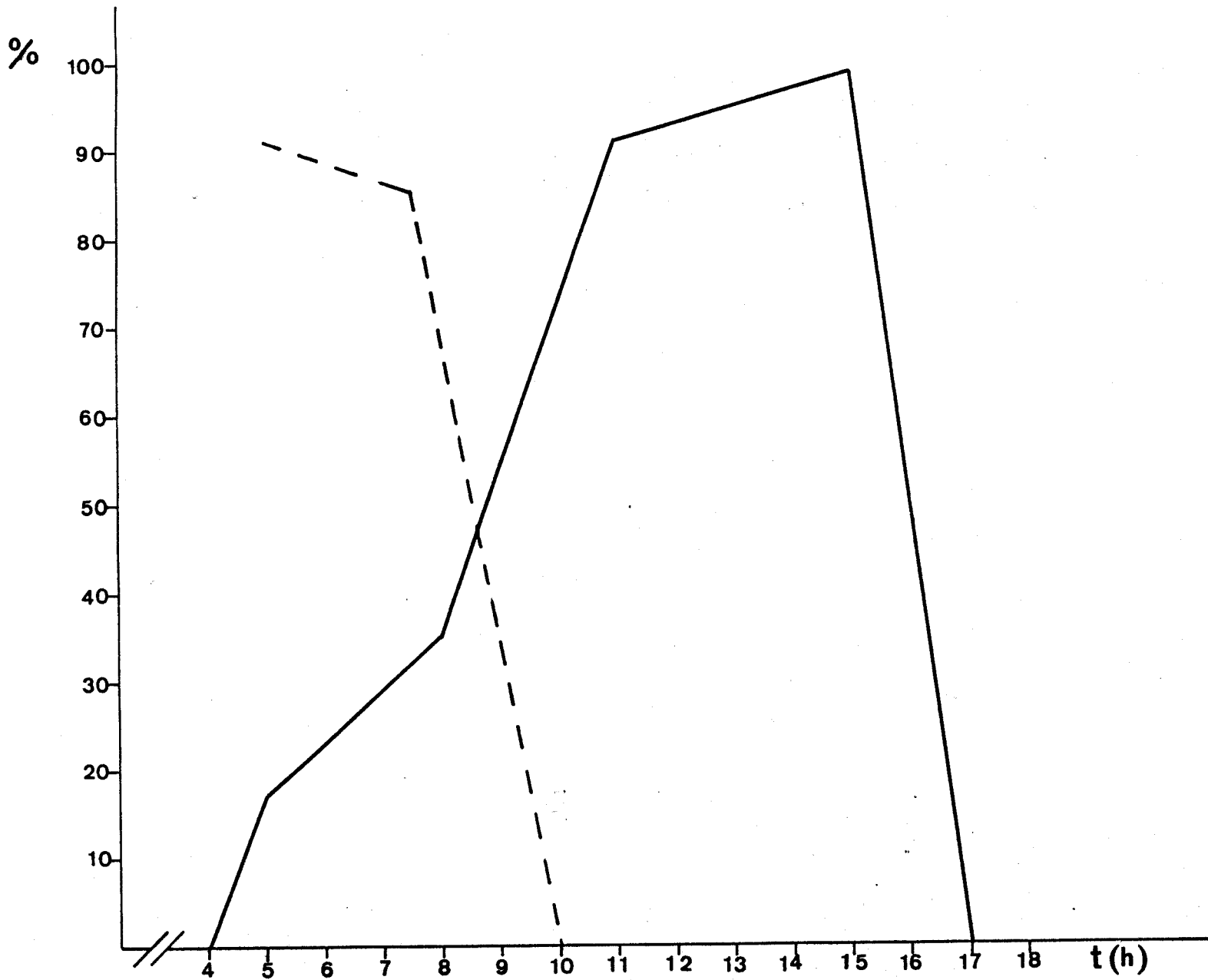


TABLA III.- Variación, a lo largo del tiempo, del porcentaje de individuos con bandas de reorganización.

<u>Horas después de la separación de los tomitos</u>	<u>Porcentaje de individuos con bandas de reor- ganización</u>	<u>Número total de individuos observados</u>
<u>OPISTO:</u>		
5	91,18	34
8	85,37	41
10	0	50
<u>PROTERO:</u>		
5	17,14	35
8	34,62	26
11	90,32	31
15	97,22	36
17	0	24

grande en su entrada en división. Esto determina que el período S definido anteriormente para los próteros sea el resultado de un solapamiento entre los períodos de síntesis de los dos tipos de individuos.

Los próteros que se dividen entre las 11h. y 14h. del ciclo, podrían ser individuos que poseen un contenido normal de ADN; por tanto, la duración de su período S y ciclo celular también son normales. Por el contrario, las células con retraso (18 h. de ciclo) podrían ser las que tienen un bajo contenido de ADN y presentan un período S más largo o dos períodos S consecutivos.

Para comprobar esta hipótesis efectuamos medidas de ADN en los distintos momentos en que se presentaban divisiones celulares tanto en la población de próteros como en la de opistos.

En primer lugar, provocamos por medio de urea una división desigual de tal manera que en el momento de la separación de los tomitos, las cantidades de ADN de 22 próteros presentaban una distribución que variaba de 30 - 150 Ma/ \bar{m} i con una \bar{x} = 76,48 Ma/ \bar{m} i y una σ = 31,45 (fig. 37), mientras que los 22 opistos poseían una distribución que variaba de 110 - 250 Ma/ \bar{m} i con una media de 165,47 y una desviación de 36,41. Fig. 38.

Cuando se dividieron los opistos, hicimos una preparación con 45 células hijas y las medidas del ADN

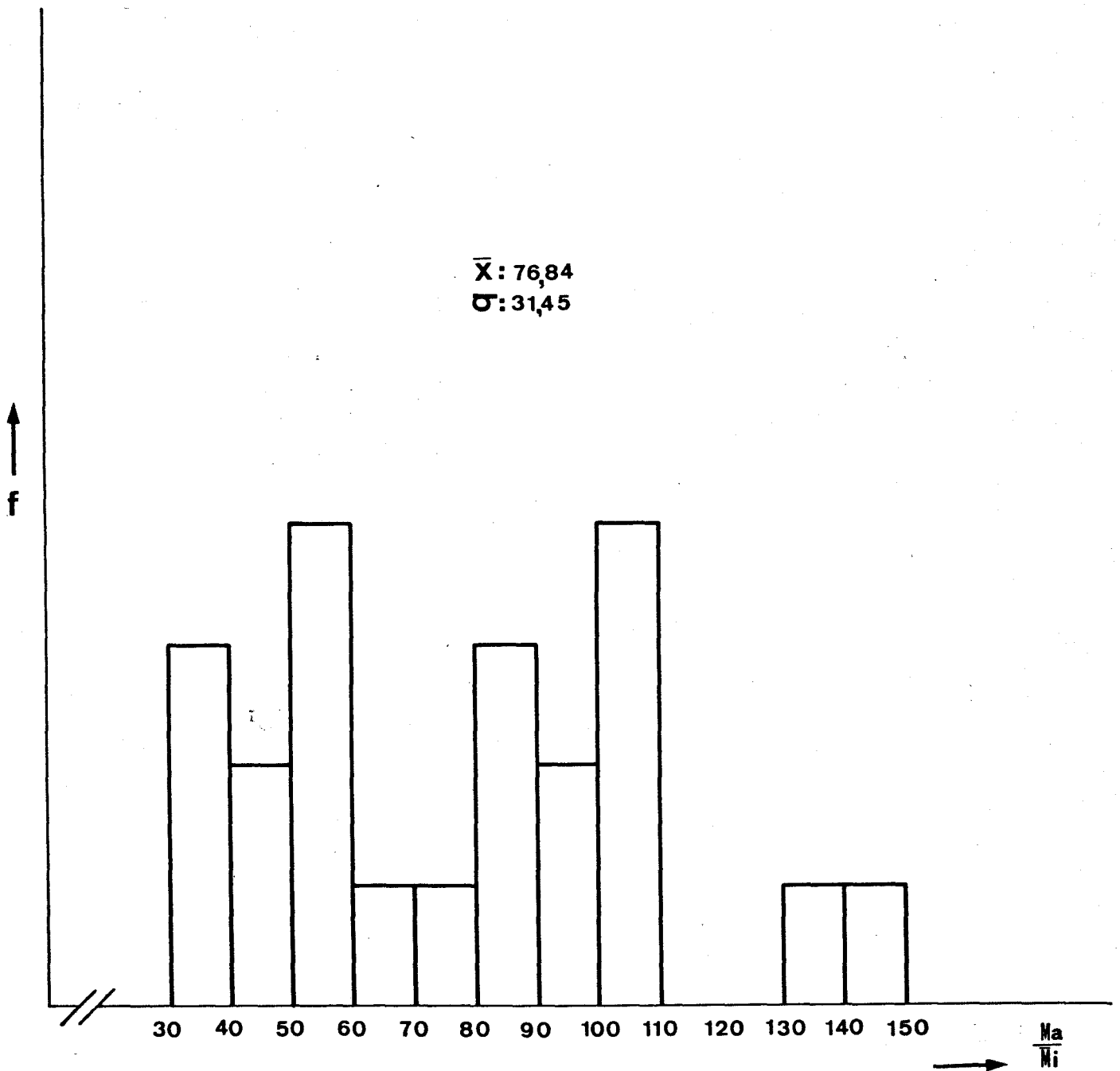
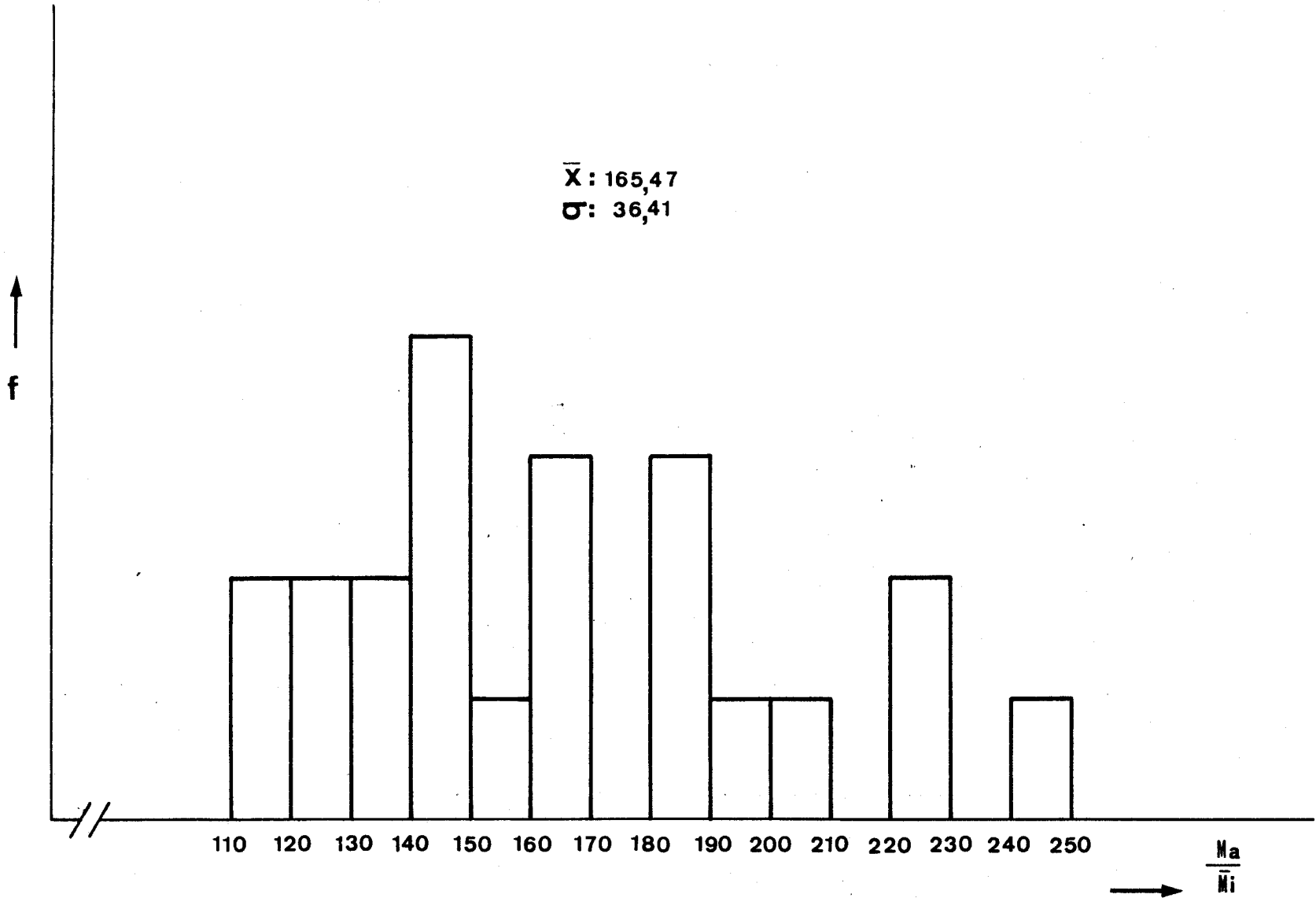


Figura 37.- Distribución de contenidos de ADN macro-nuclear en 22 próteros procedentes de la división desigual.

Figura 38.- Distribución de contenidos de ADN macronuclear en 22 opistos procedentes de la división desigual.



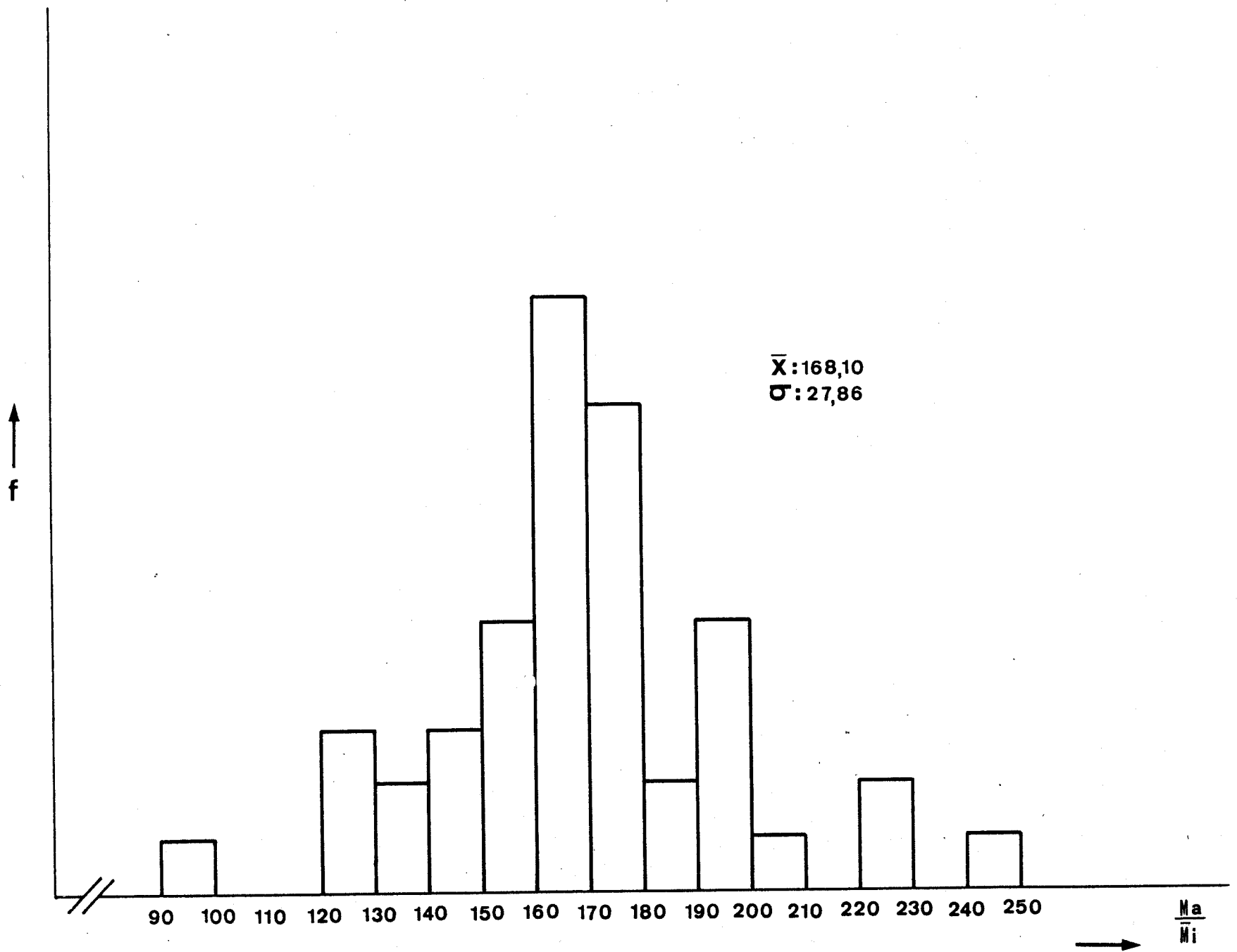
macronuclear de estas dieron una distribución que variaba de 90-250 Ma/ $\bar{m}i$ con una $\bar{x} = 168,10$ Ma/ $\bar{m}i$ y una $\sigma = 27,86$. Fig. 39.

Como ya hemos señalado, en la población de próteros hay un pequeño porcentaje de individuos que se dividen al mismo tiempo que los opistos. En estos individuos recién divididos se encontró la distribución que se indica en la fig. 40, en la que puede observarse que los valores de Ma/ $\bar{m}i$ varían entre 130 y 180, siendo la media y la desviación típica 148,40 y 12,89 respectivamente.

En preparaciones de muestra del resto de la población de próteros se observaron dos tipos de individuos, unos que no presentaban bandas de replicación y otros que las presentaban. En los primeros las medidas del contenido de ADN macronuclear presentaban una distribución que oscilaba entre 80 y 130 Ma/ $\bar{m}i$ con una $\bar{x} = 104,58$ y una $\sigma = 14,15$ (fig. 41), mientras que los segundos, que poseían bandas de replicación, presentan la distribución indicada en la fig. 42. Las Ma/ $\bar{m}i$ varían desde 110 a 290, la $\bar{x} = 179,43$ y la $\sigma = 39,83$.

Unas siete horas más tarde se inicia la división en el resto de la población de próteros, las medidas del contenido de ADN macronuclear en los productos de esta división, dieron una distribución comprendida entre 90-220 Ma/ $\bar{m}i$, siendo la media de 139,20 Ma/ $\bar{m}i$ y la desvia-

Figura 39.- Distribución de contenidos de ADN macronuclear de 45 productos de la división de opistos en el ciclo siguiente a la división desigual.



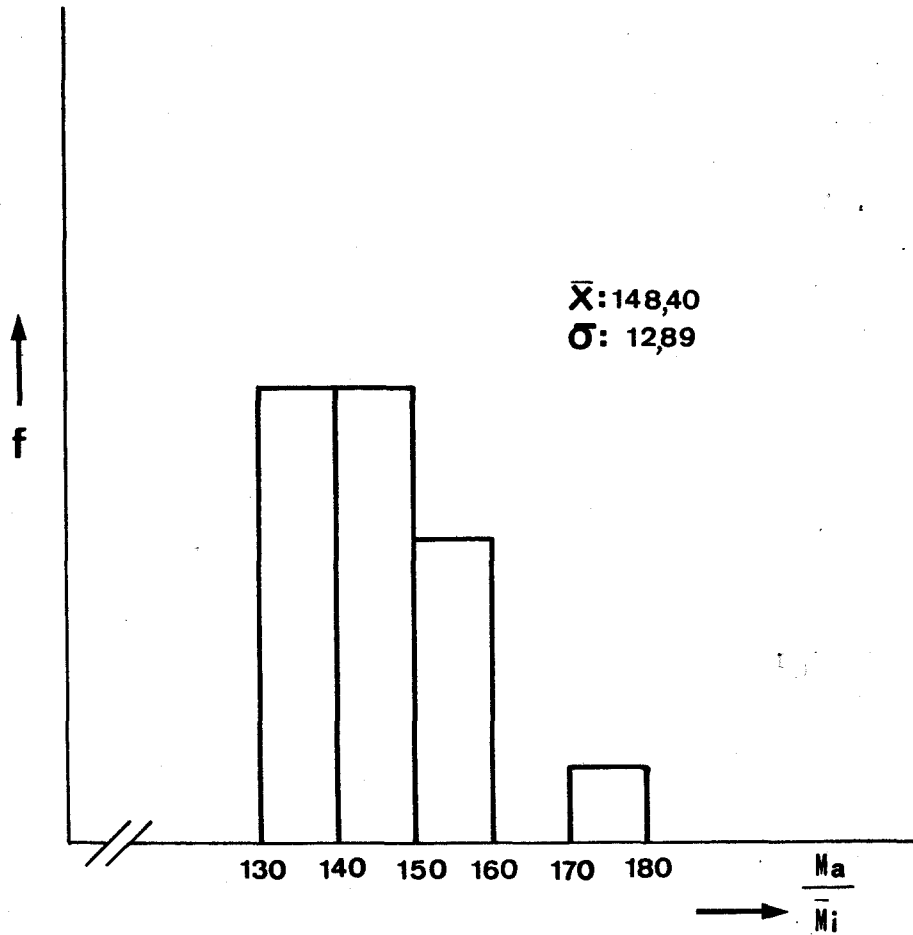


Figura 40.- Distribución de contenidos de ADN macronuclear de 9 próteros, que se dividen a la vez de los opistos, en el ciclo siguiente a la división desigual.

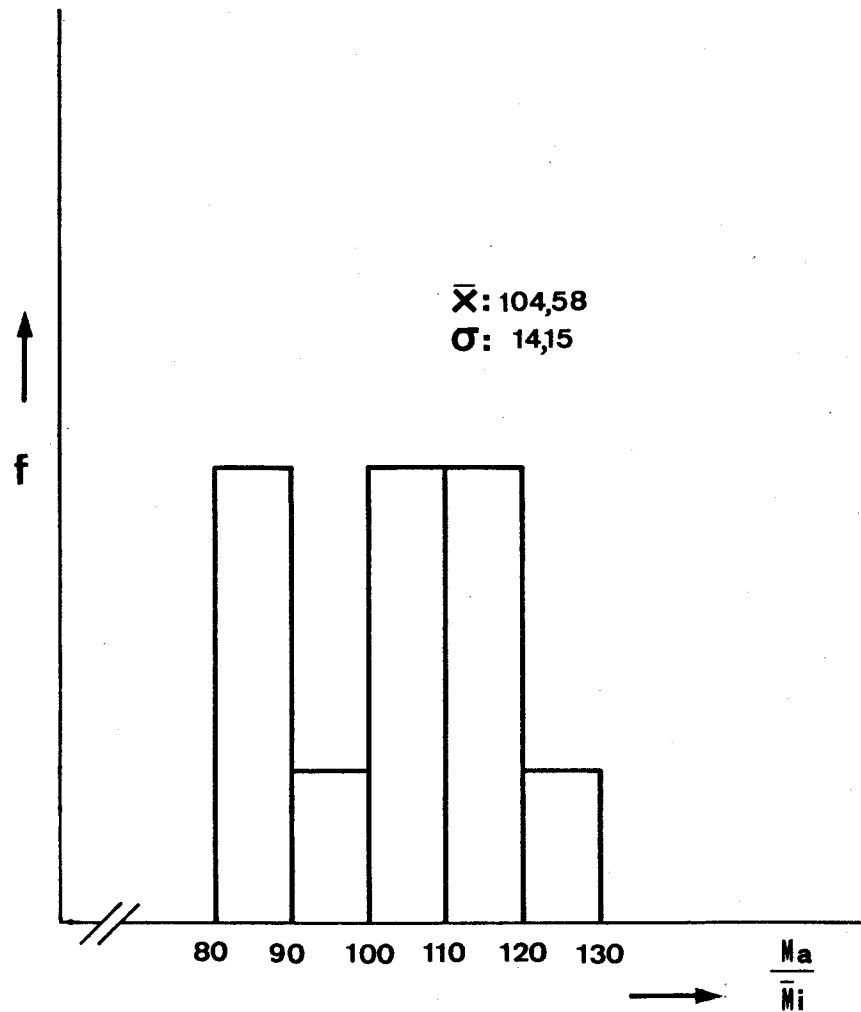
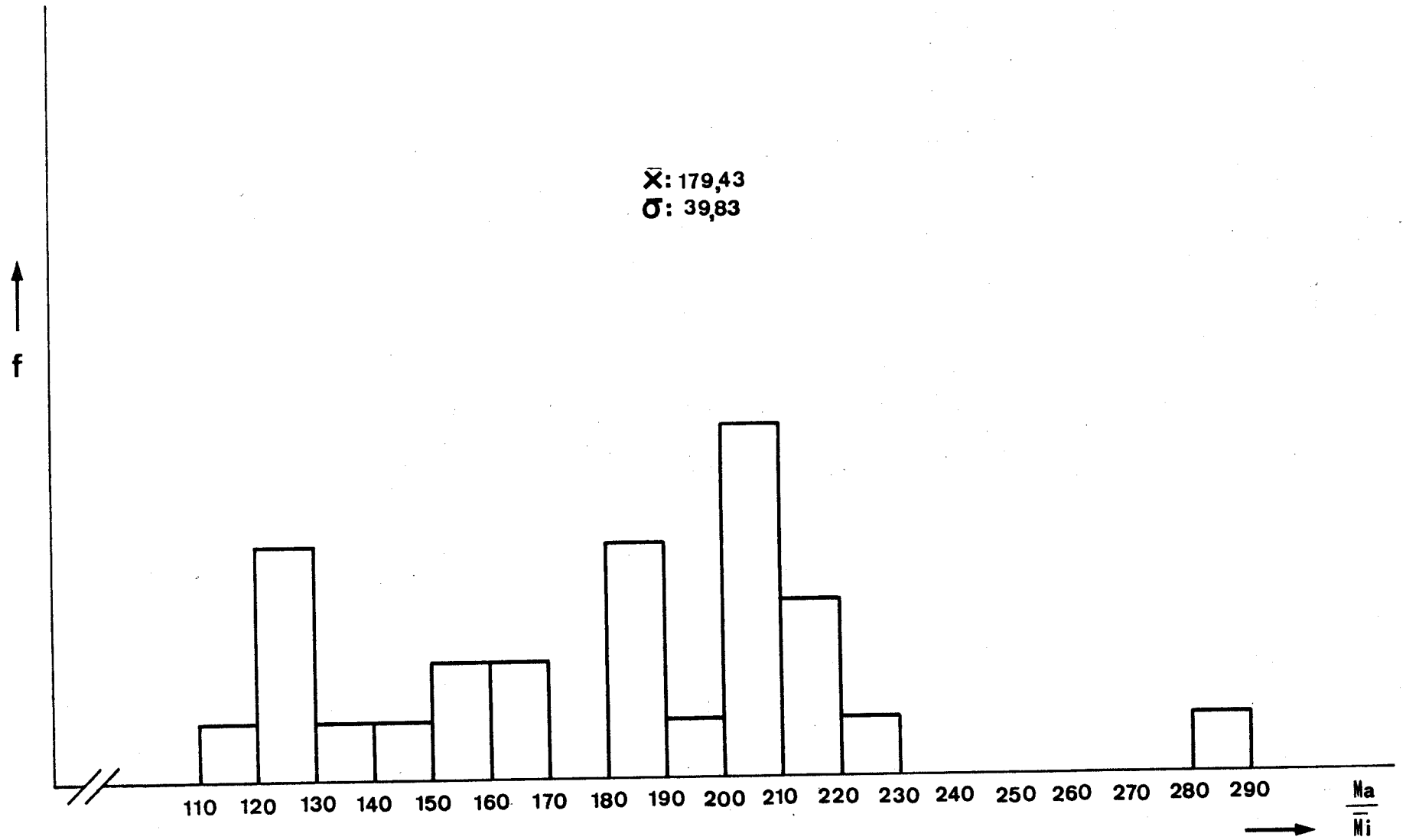


Figura 41.- Distribución de contenidos de ADN macronuclear de 12 próteros, que no poseen bandas de reorganización y no se dividen a la vez de los opistos, en el ciclo siguiente a la división desigual.

Figura 42.- Distribución de contenidos de ADN macronuclear de 27 próteros, que poseen bandas de replicación, y no se dividen a la vez de los opistos en el ciclo siguiente a la división desigual.



ción típica de 33,67 (fig. 43).

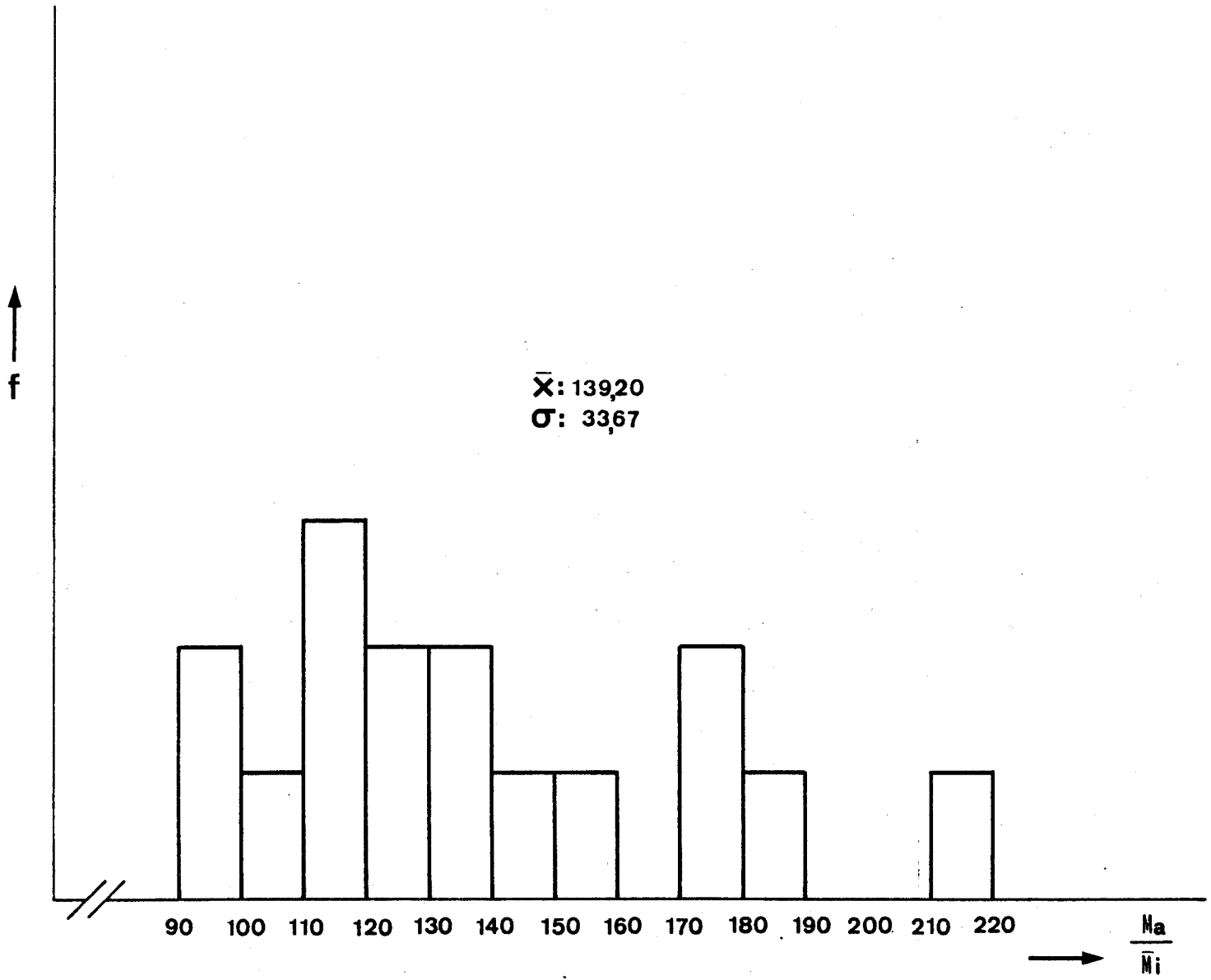
Estos datos parecen indicar, como posteriormente veremos en la Discusión, que hay próteros (de menor contenido en ADN) que durante la interfase aumentan su ADN en más de dos veces.

En cuanto a la disminución del contenido de ADN, dado que algunos autores (7, 14, 21) han indicado que los cuerpos de extrusión pueden ser un sistema de pérdida de ADN, analizamos todas las preparaciones realizadas a lo largo de este trabajo, cuantificando la aparición de tales cuerpos de extrusión, y pudimos comprobar que estos se presentaban en dos momentos distintos del ciclo del individuo: en el período S macronuclear (fig. 44) o bien en el período G₁ (fig. 45) y que su frecuencia es relativamente baja (del orden del 10 al 12 %), tanto en los clones considerados como normales como en los derivados de ambos productos de la división desigual.

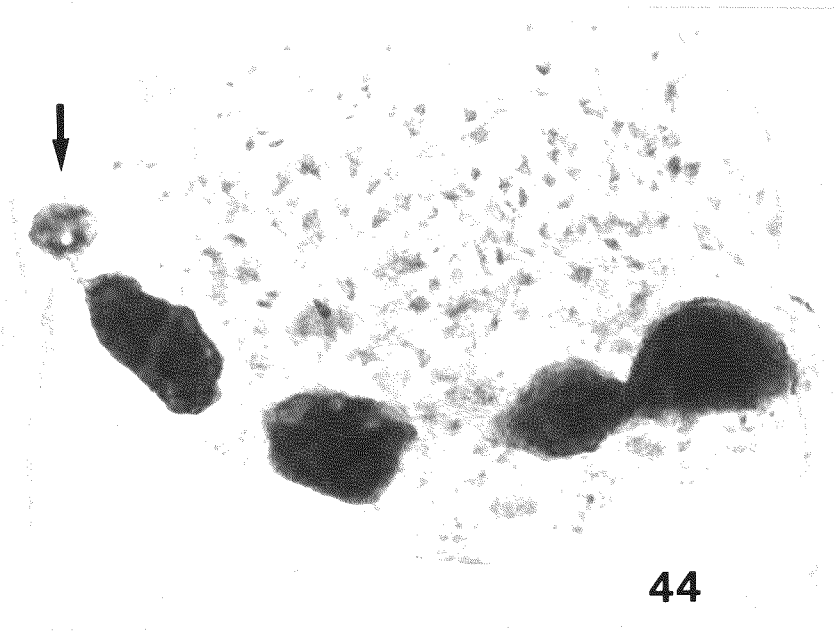
En este último caso, los cuerpos de extrusión aparecieron indistintamente en los clones procedentes de próteros o de opistos; sólo en un caso -en que la diferencia entre próteros y opistos fue más acentuada (figs. 37 y 38)- se observó en el cultivo de opistos una frecuencia más elevada, de un 24 %.

Por último, hay que señalar que la aparición

Figura 43.- Distribución del contenido de ADN macronuclear de 16 próteros que se dividen con retraso en el ciclo siguiente a la división desigual.



Figuras 44 y 45.- Micrografías de L. acuminata presentando cuerpos de extrusión en los períodos S y G₁ respectivamente. Tinción de Feulgen.



DPO. ZOOLOGIA
FAC. BIOLOGIA

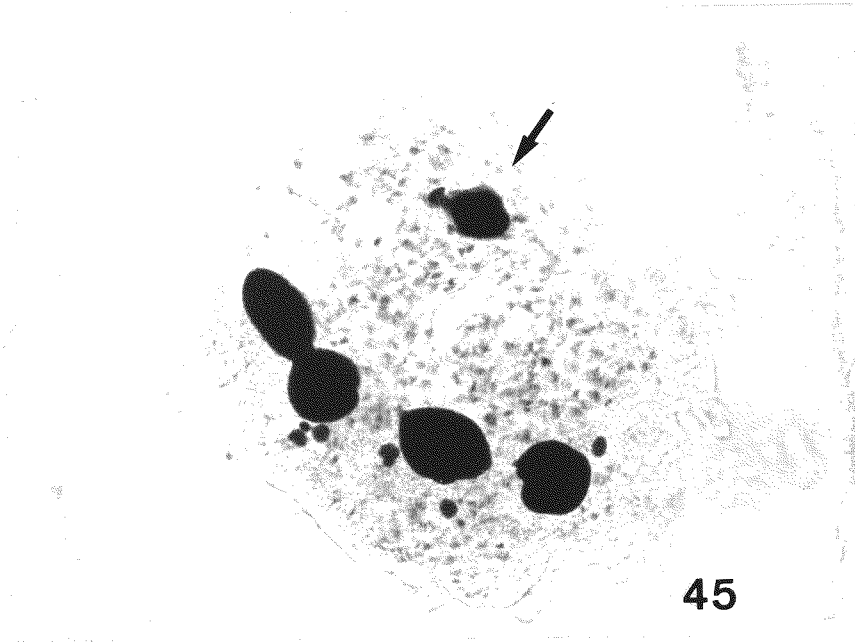


TABLA IV..- Medidas de ADN en individuos que presentan cuerpos de extrusión. Frecuencia de aparición de éstos.

Contenido de ADN en individuos con C.E. (Ma/mi)		Contenido medio de la población, en G_1	Nº total de individuos observados	Frecuencia de aparición
En G_1	En S			
182,40	119,76	121,66	20	10 %
146,20 135,06 251,99 147,83	248,10 246,31	184,64	50	12 %
93,24 123,35 156,38	216,66 208,10 199,94 142,47 214,63	140,25	70	11,43 %
203,37 153,66		148,13	20	10 %
135,99	226,37 229,64	150,27	20	12 %
253,76 294,08 180,87 188,12 315,77	241,97 197,33 243,65 187,28 177,81 248,86	246,52	46	23,91 %

de cuerpos de extrusión no guarda una relación clara ni con el valor medio del contenido de ADN macronuclear de la población ni con el contenido de ADN macronuclear de los individuos que los presentan (Tabla IV).

4. DISCUSSION.

El hecho de que el macronúcleo de los ciliados se divida por amitosis tiene, como consecuencia inmediata, el que en una población de estos protozoos aparezca una variación más o menos amplia en cuanto al contenido de ADN macronuclear. El estudio de esta variabilidad, así como el de los posibles mecanismos que regulan el contenido de ADN macronuclear, ha sido abordado en algunos ciliados holotricos y heterotricos como Tetrahymena pyriformis (7), Tetrahymena pátula (22), Tillina magna (21), Bursaria truncatella (81), Colpoda steinii (20) y Paramecium aurelia (3); sin embargo, los hipotricos han recibido poca atención en este sentido. El único trabajo que conocemos es el de WITT (76), en el que se estudia la división macronuclear de Euplotes eurystomus y se establecen los rangos de variabilidad en el reparto de ADN entre los dos productos de una amitosis macronuclear, así como la variabilidad en la cantidad de ADN macronuclear dentro de una población.

Nosotros, en el trabajo que presentamos a la consideración del tribunal, hemos abordado en primer lugar el estudio de la variabilidad del contenido de ADN macronuclear, tanto en poblaciones no clónicas como clónicas; en segundo lugar hemos estudiado la variabilidad en la distribución desigual del ADN en la amitosis y, por último, tratamos de establecer qué mecanismos de regulación operan en el control de la cantidad de ADN macronuclear. Para ello, hemos trabajado con una especie de hipotrico, Laurentia acuminata, que ofrece propiedades muy favorables para este tipo de estudio.

En efecto, esta especie se cultiva fácilmente en el laboratorio presentando una tasa de división alta (ciclo celular de 9 horas), y la sincronización de los cultivos se puede conseguir sin grandes dificultades. Su tamaño celular (300μ) permite estudiar y cuantificar daños efectuados por agentes químicos. Además, su aparato nuclear está constituido por macronúcleos y micronúcleos de gran tamaño, que permiten efectuar medidas citofotométricas con bastante precisión.

En la mayoría de los casos, los micronúcleos están relativamente alejados del macronúcleo hasta el punto de que las medidas citofotométricas de ambos tipos de núcleos no se interfieren entre sí, lo cual permite expresar el contenido de ADN macronuclear en forma de un cociente (Ma/\bar{mi}) entre la absorción medida

para cada macronúcleo y el valor medio de los contenidos encontrados en los micronúcleos de la correspondiente preparación. Asimismo, en L. acuminata, como en los demás hipotricos, el periodo S macronuclear se puede delimitar fácilmente mediante la observación de las bandas de reorganización.

Dado que nuestros estudios sobre el contenido de ADN se fundamentan en medidas citofotométricas sobre preparaciones teñidas según el método de Feulgen, el primer paso en nuestro trabajo fué elegir aquellas condiciones de tinción, especialmente las relativas a la hidrólisis clorhídrica, que nos permitiesen obtener una coloración más intensa así como una mayor homogeneidad en los valores de absorción, a fin de establecer comparaciones entre distintos experimentos.

Las condiciones elegidas fueron: hidrólisis durante 60m. a 20°C con ClH 5N y medida de la absorción a 550nm.

Según los resultados que se exponen en las figuras 2a, 3 y 4a, el reparto del ADN entre los núcleos hijos durante la amitosis macronuclear es significativamente desigual, a esta conclusión se ha llegado aplicando tres tipos de análisis:

- 1) Como puede apreciarse en la figura 2a, la distribución de coeficientes de reparto (relación entre los contenidos de ADN de los productos de una división)

tiene un valor medio de 1,09 y no de 1 como cabría esperar en una división de reparto de ADN exactamente igual.

2) Como se muestra en la figura 3, la pendiente de la recta de regresión hallada para una correlación entre los contenidos de ADN macronuclear de las células hijas es distinto de uno, lo que corrobora que la división es desigual. El coeficiente de correlación para dicha recta fué de $r=+0,79$, significativamente diferente de cero ($p=0,05$, $n=72$), lo que indica que el grado de desigualdad no es aleatorio sino que los macronúcleos hermanos tienden a ser similares en cuanto al contenido de ADN que reciben.

3) En el tercer tipo de análisis de los datos se pretende cuantificar la desigualdad del reparto; por ello se relacionan las cantidades de ADN que reciben los núcleos hijos, con las cantidades que recibirían en el caso teórico de que la división fuese equitativa, lo cual puede expresarse por la relación: $100 \times D / \frac{a+b}{2}$, siendo D la diferencia entre las cantidades recibidas por los núcleos hermanos y $\frac{a+b}{2}$ la cantidad de ADN macronuclear de la célula madre. Como puede apreciarse en la figura 4a, el valor medio de este cociente para 72 casos medidos fué de 9,12%.

Estas diferencias no pueden ser debidas a errores instrumentales, ya que como lo demuestran los resultados

recogidos en la figura 7, el error medio de mediciones sucesivas del mismo macronúcleo es solo de 0,26 %. Así mismo, al comparar (Tabla V) estos datos con los referentes a la distribución entre células hermanas, mediante el test de la t de STUDENT y el de la F de SNEDECOR, se puede deducir que las diferencias halladas en cuanto a la cantidad de ADN son reales y no debidas a errores de método.

Resultados similares a los nuestros han sido hallados en E. eurytomus (76), donde el coeficiente de correlación es de +0,62 (división aún más desigual que en L. acuminata) y la diferencia media de 11,6 %. En otros ciliados no hipotricos como P. aurelia (33), la diferencia media entre células hermanas es de 8%, igual a la descrita en Tetrahymena (7), y el coeficiente de correlación de $r = + 0,52$. Un caso extremo es el de Bursaria truncatella en el que, según RUTHMANN (55), la diferencia media es de 37,3 %.

A diferencia de los resultados descritos por ZECH en Bursaria truncatella (81), los resultados encontrados por nosotros indican que no existe polaridad en el reparto desigual, es decir, que el tomito que recibe mayor cantidad de ADN macronuclear unas veces es el prótero y otras el opisto, como lo demuestra el valor de $\chi^2 = 0,20$ ($p = 0,05$, $\sqrt{1}$), encontrado para los datos expuestos en la Tabla I.

Tampoco han encontrado polaridad en el reparto

TABLA V.- Comparación de la distribución de diferencias de contenido de ADN entre células hermanas con la de diferencias entre pares de medidas sobre un mismo macronúcleo.

	Diferencia entre pares hermanos	Diferencias de pares de medidas del mismo núcleo
Media	9,12 %	0,26 %
Varianza	55,65	0,03

$t = 8,24$ Diferencia significativa para $\alpha = 0,05$

$F = 1.717,46$ Diferencia significativa para $\alpha = 0,05$

DOERDER y FRANKEL (13) en el caso de T. pyriformis.

Como consecuencia inmediata de la división desigual cabe esperar que en la población de L. acuminata se produzca un aumento progresivo de la varianza en el contenido de ADN macronuclear a través de las generaciones. En efecto, aplicando los análisis de coeficiente de reparto (fig. 2b), coeficiente de correlación (fig. 5) y distribución de diferencias (fig. 4b) a una población de individuos recién divididos emparejados al azar, y comparándolos con los resultados obtenidos al aplicar este mismo tipo de análisis a la población de pares hermanos, se encuentra que la población de pares aleatorios presenta una variabilidad significativamente mayor (Tabla VI) que la población de pares hermanos.

Estos resultados son similares a los encontrados en Tetrahymena por CLEFFMANN (7), ANDERSEN (2) y JEFFERY (30) quienes observan mayores diferencias (18%) entre macronúcleos no hermanos que entre macronúcleos hermanos (8%). Asimismo, KIMBALL y BARKA (33), trabajando con P. aurelia, han encontrado diferencias del 11% entre núcleos no hermanos y del 8% entre núcleos hermanos.

Comparando (Tabla VII) las diferencias medias en el contenido de ADN macronuclear entre pares aleatorios de individuos de una generación (fig. 2c, fig. 6, fig. 4c) y de la siguiente (fig. 2b, fig. 5, fig. 4b)

TABLA VI .- Comparación de coeficientes de reparto, coeficientes de correlación y distribución de diferencias de contenido de ADN de pares de células hermanas y pares al azar de una población recién dividida.

	Pares hermanos	Pares al azar	Test de comparación
Coef. de reparto	$\bar{x} = 1,09$ $S^2 = 0,006$	$\bar{x} = 1,15$ $S^2 = 0,017$	$t = 3,33$ $F = 2,64$
Coef. de correlación	$r = + 0,79$	$r = + 0,49$	$\frac{r_1 - r_2}{\sqrt{S^2_{r_1 - r_2}}} = 18,75$
Distribución de diferencias	$\bar{x} = 9,12 \%$ $S^2 = 55,65$	$\bar{x} = 13,70 \%$ $S^2 = 132,71$	$t = 3,01$ $F = 1,99$

En los tres casos, se han hallado diferencias significativas para $\alpha = 0,05$

TABLA VII..- Comparación de coeficientes de reparto, coeficientes de correlación y distribución de diferencias de contenido de ADN entre pares de células de la población parental y filial.

	Pares recién divididos al azar	Pares parentales al azar	Test de comparación
Coef. de reparto	$\bar{x} = 1,15$ $S^2 = 0,017$	$\bar{x} = 1,13$ $S^2 = 0,012$	$t = 0,84$ $F = 1,40$
Coef. de correlación	$r = + 0,49$	$r = + 0,48$	$\frac{r_1 - r_2}{\sqrt{S_{r_1 - r_2}^2}} < 2$
Distribución de diferencias	$\bar{x} = 13,70$ $S^2 = 132,71$	$\bar{x} = 11,78$ $S^2 = 87,23$	$t = 0,96$ $F = 1,27$

En los tres casos, no se han hallado diferencias significativas para $\alpha = 0,05$

no se aprecian diferencias significativas ni en los valores medios ni en las varianzas, lo cual corrobora los resultados obtenidos por WITT (76) en E. eury stomus, sin embargo estamos de acuerdo con este autor en que estas ligeras diferencias se van acumulando generación tras generación y llegan a alcanzar valores significativos.

En vista de los resultados obtenidos, el siguiente paso de nuestro trabajo fue observar los cambios que podían sufrir la media y la varianza de una población al paso de las generaciones. Para este tipo de estudio empleamos poblaciones clónicas de L. acuminata pues pensamos que si la división era desigual y estas diferencias se iban acumulando generación tras generación, se podría esperar un aumento progresivo e indefinido de la variabilidad de contenido de ADN.

Los resultados que se recogen en la figura 8 y que corresponden a la evolución del contenido de ADN macronuclear a lo largo de 24 días en cinco cultivos clónicos de L. acuminata demuestran que, en contra de lo que cabía esperar, los valores medios experimentan fluctuaciones más o menos periódicas acompañadas de oscilaciones en la varianza en el mismo sentido (Tabla II). Esto es explicable si se admite la existencia de un mecanismo de autorregulación de la cantidad de ADN macronuclear que operaría en sentidos opuestos, tan

to para aumentar como para disminuir la cantidad de ADN cuando se alcanzan valores mínimos o máximos respectivamente. Precisamente la última serie de experimentos que describimos en la parte de Resultados va encaminada a dilucidar estos posibles mecanismos de autorregulación. Estos experimentos consisten en provocar divisiones extremadamente desiguales, lo cual se consigue ocasionando lesiones corticales durante el último tercio del período S macronuclear. Como se demuestra en la Tabla VIII, los coeficientes de reparto, de correlación y diferencias porcentuales correspondientes a estas divisiones desiguales son significativamente diferentes de los que aparecen en una división normal.

El hecho de que en las poblaciones derivadas de los próteros (células con muy bajo contenido de ADN macronuclear) y de los opistos (células con alto contenido de ADN macronuclear) se alcance una distribución normal (figs. 23, 24, 25, 26 y 27) de las cantidades de ADN macronuclear indica que en ambas poblaciones han operado los mecanismos de regulación antes mencionados.

Como se refleja en las figs. 33 y 34, existe una considerable diferencia entre los próteros y los opistos en cuanto a la duración del ciclo celular subsiguiente a la división desigual, pues mientras en la

TABLA VIII.- Comparación de coeficientes de reparto, coeficiente de correlación y diferencias porcentuales de ADN entre la población recién dividida normal y la recién dividida con división desigual provocada.

	División normal	División desigual	Test de comparación
Coef. de reparto	$\bar{x} = 1,09$ $s^2 = 0,006$	$\bar{x} = 1,66$ $s^2 = 0,435$	$t = 5,7$ $F = 68,06$
Coef. de correlación	$r = + 0,79$	$r = + 0,35$	$\frac{r_1 - r_2}{\sqrt{s^2_{r_1 - r_2}}} = 2,59$
Diferencias porcentuales	$\bar{x} = 9,12 \%$ $s^2 = 55,65$	$\bar{x} = 42,30 \%$ $s^2 = 967,11$	$t = 7,03$ $F = 17,38$

En los tres casos, se han hallado diferencias significativas para $\alpha = 0,05$

primera dura un promedio de 15 horas, en el segundo caso la duración media es de 8h. 35m.

Sin embargo, en una minoría de estos próteros, la división se realiza a la vez que en los opistos dando unos productos de división cuyo contenido en ADN ($\bar{x} = 148,40 \text{ Ma}/\bar{m}i$), está dentro del rango de las células normales, no apareciendo células con un contenido en ADN tan bajo como el que se presentaba en la población parental ($\bar{x} = 76,48 \text{ Ma}/\bar{m}i$). Por tanto, cabe pensar que estas células recibieron una cantidad de ADN dentro de los límites normales y que por ello se comportan de igual modo que los opistos.

Los próteros se dividieron con retraso debido a que en ellos se prolonga considerablemente el período S macronuclear (fig. 36). Las medidas de ADN macronuclear efectuadas en estos individuos, en el momento de la división de los opistos, indicaron que entre los que no presentaban bandas de replicación, no se encontraban individuos con 30-60 $\text{Ma}/\bar{m}i$ que se habían observado al principio del experimento. Además, entre los que tienen bandas, no hay ninguno que tenga un contenido de ADN inferior a 130 $\text{Ma}/\bar{m}i$ lo que sugiere que los individuos de bajo contenido de ADN han sufrido al menos un paso de bandas de replicación durante el tiempo que dura el ciclo de los opistos.

Por último, los productos de división de los

individuos que se dividieron con retraso, tienen un contenido de ADN normal ($\bar{x} = 139,20 \text{ Ma/mi}$).

Todo esto parece indicar que hay próteros que durante su interfase aumentan en más de dos veces su contenido de ADN, siendo por tanto esto un mecanismo que permite incrementar el nivel de ADN en los individuos con bajo contenido.

Por último, el hecho de que la frecuencia de aparición de cuerpos de extrusión no guarde una relación clara con el valor medio del contenido de ADN macronuclear de la población ni con la cantidad de ADN del macronúcleo de los individuos que lo presentan, indica que la disminución del contenido de ADN macronuclear no es explicable únicamente por la formación de dichos cuerpos de extrusión. Por tanto, hay que admitir la existencia de otro mecanismo de regulación que, a modo de hipótesis, pudiéramos apuntar la posibilidad de que, cuando la carga de ADN macronuclear alcanza valores cercanos al límite máximo, no se dupliquen todos los fragmentos o bien que no todo el ADN de un fragmento se duplique al paso de la banda de reorganización.

5. CONCLUSIONES.

- 1.- A diferencia del contenido de ADN del micronúcleo, el macronúcleo en G₁ de Laurentia acuminata presenta gran variabilidad, de tal modo que hay células que poseen prácticamente el doble de ADN que otras.
- 2.- El reparto de ADN entre macronúcleos hijos durante la amitosis macronuclear de L. acuminata es significativamente desigual, ya que:
 - a) El coeficiente de reparto de ADN macronuclear entre células hermanas tiene un valor medio de 1,09.
 - b) El coeficiente de correlación para parejas de macronúcleos hermanos tiene un valor de $\pm 0,79$.
 - c) La diferencia en contenido de ADN macronuclear entre células hermanas presenta una media de 9,12 %.
- 3.- La división macronuclear de L. acuminata no presenta polaridad en el reparto de ADN, de tal manera que unas veces es el prótero y otras el opisto el que recibe mayor cantidad de ADN.
- 4.- Las diferencias en contenido de ADN macronuclear entre pares aleatorios de células es mayor que entre pares de células hermanas. Este hecho es atribuible a que las diferencias en el reparto que se

producen en cada división pueden acumularse a través de las generaciones.

- 5.- La varianza y el contenido medio de ADN de los cultivos clónicos de L. acuminata, experimentan fluctuaciones más o menos periódicas, dentro de unos límites superior e inferior, lo que sugiere la existencia de un mecanismo que regula el contenido de ADN macronuclear, manteniéndolo dentro de dichos límites.
- 6.- Cuando se ocasionan lesiones corticales a L. acuminata durante el último tercio del período S macronuclear, se inducen divisiones altamente desiguales en las que:
 - a) El coeficiente de reparto de ADN macronuclear entre células hermanas tiene un valor medio de 1,66.
 - b) El coeficiente de correlación para parejas de macronúcleos hermanos tiene un valor de $\pm 0,35$.
 - c) La diferencia en contenido de ADN macronuclear entre células hermanas presenta un valor medio de 42,30 %.
- 7.- En estas divisiones altamente desiguales, es siempre el prótero el que recibe menor cantidad de ADN macronuclear.

- 8.- En las poblaciones clónicas derivadas de los próteros y los opistos de una división altamente desigual, se alcanza una distribución normal de las cantidades de ADN macronuclear, lo que indica que, en ambas poblaciones, ha operado un mecanismo de regulación que compensa las primitivas diferencias que existían entre las células que originaron los clones.
- 9.- Existe una considerable diferencia en la duración del ciclo celular subsiguiente a la división desigual de los próteros y los opistos pues, mientras que en los primeros dura un promedio de 15 horas, en los segundos la duración media es de 8 horas 35 minutos.
- 10.- Una de las causas de la mayor duración del ciclo celular de los próteros estriba en el prolongado período S macronuclear que presentan. Durante este período, hay próteros que aumentan en más de dos veces su contenido en ADN, siendo éste por tanto un mecanismo que permite incrementar el nivel de ADN en los individuos con bajo contenido.
- 11.- La disminución en el contenido de ADN macronuclear no es explicable únicamente por la formación de cuerpos de extrusión, pudiéndose admitir a modo de hipótesis la posibilidad de que, cuando la cantidad

de ADN macronuclear alcance valores cercanos al límite máximo, no se dupliquen todos los fragmentos macronucleares o bien que las bandas de reorganización no afecten a todo el ADN macronuclear.

6. BIBLIOGRAFIA.

- (1) AMMERMANN, D.: Cytologische und Genetische Untersuchungen an dem Ciliaten Stylonichia mytilus. Ehr. Arch. Protistenk. 108, 109-152 (1965).
- (2) ANDERSEN, H. A.: Requirements for DNA replication preceding cell division in Tetrahymena pyriformis. Exp. Cell. Res. 75, 89-94 (1972).
- (3) BERGER, J. D.: Regulation of macronuclear DNA content in Paramecium aurelia. J. Protozool. 19, (suppl.), 34 (1972).
- (4) BODIAN, D.: A new method for staining nerve fibers and nerve ending in mounted paraffin sections. Anat. Rec. 65, 89 (1936).
- (5) BODIAN, D.: The staining of paraffin sections of nervous tissues with activated Protargol. The role of fixatives. Anat. Rec. 69, 153-162 (1937).
- (6) CHEISSIN, E. M., L. P. OVCHINNIKOVA, G. V. SELINOVA y E. G. BUZE: Changes of the DNA content in the macronucleus of Paramecium caudatum in the interdivisional period. Acta Protozool. 1, 63-69 (1963).
- (7) CLEFFMANN, G.: Regulierung der DNS Menge in Makronucleus von Tetrahymena. Exp. Cell. Res. 50, 193 (1968).

- (8) CLEFFMANN, G.: Amount of DNA produced during extra S phases in Tetrahymena. J. Cell. Biol. 66 (1), 204-209 (1975).
- (9) CUMMINS, J. E. y H. P. RUSH: Limited DNA synthesis in the absence of protein synthesis in Phisarum polycephalum. J. Cell. Biol. 31, 577-583 (1966).
- (10) DASS, C. M. S.: Chromatin elimination in Glaucoma pyriformis. Ehrbg. Nature, 165, 693 (1950).
- (11) DEVI, R. V.: The nuclear apparatus of Frontonia leucas Ehrbg. Proc. Nat. Inst. Sci. India, B 26, 269-277 (1960).
- (12) DEVIDÉ, Z.: Chromosomes Ciliates (Euciliata and Opalinidae). Bull. Internat. Acad. Yougosl. Sci. Beaux Arts Zagreb, n. ser. 3, 75-114 (1951).
- (13) DOERDER, F. P., J. FRANKEL, L. M. JENKINS y L. E. de BAULT: Form and pattern in Ciliated Protozoa: Analysis of a genic mutant with altered cell shape in Tetrahymena pyriformis, singen 1. J. Exp. Zool. 192, nº 2 (1975).
- (14) DYSART, M. P.: Macronuclear chromatin extrusion in the ciliate genus Tetrahymena. J. Protozool. 6 Suppl. 17-18 (1959).

- (15) FEIDE, A.: Subunit composition of the macronucleus in the ciliate Ichthyophthirius multifiliis. Acta Univ. Bergensis, ser. Math. Nat., 7, 1-16 (1968).
- (16) FAURÉ-FREMIET, E.: L'hypothèse de la senescence et les cycles de réorganisation nucléaire chez les Ciliés. Rev. Suisse Zool. 60, 426-38 (1953).
- (17) FEDRIANI, C.: Contribución al estudio citológico de los Ciliados Hipotricos. Tesis doctoral. Universidad de Sevilla. 1974.
- (18) FRANKEL J., L. M. JENKINS y L. E. de BAULT: Causal relations among cell cycle processes in Tetrahymena pyriformis. Journal of Cell Biology, 71, 242-66 (1976).
- (19) FRAZIER E. A. J.: DNA synthesis following gross alterations of the nucleocytoplasmic ratio in the Ciliate Stentor coeruleus. Devel. Biol. 34, 77-92 (1973).
- (20) FRENKEL M. A., B. N. KUDRJAUTSEV y M. V. KUDRJAUTSEVA: The DNA content in macro and micronuclei of Colpoda steini before and after the division of ciliates within reproduction cyst. Tsitologiya, 15, 353-57 (1973).

- (21) FRENKEL, M. A.: Regulation of macronuclear DNA content in the Holotrichous Ciliate Tillina magna (Trichostomatida Colpodidae). *Protistológica* T. XI, fasc. 1 p 41-48 (1975).
- (22) GABE, P. R. y L. E. de BAULT: Macronuclear synthesis related to the reproductive cyst of Tetrahymena patula. *J. Cell. Biol.*, 59, 615-623 (1973).
- (23) GALL, J. G.: Macronuclear duplication in the ciliated protozoan Euplotes. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 5, 295-308 (1959).
- (24) GÚTIERREZ, J. C.: Estudio de los procesos morfogénéticos y nucleares durante el enquistamiento y exquistamiento de Laurentia acuminata. Tesis de licenciatura. Univ. Sevilla, 1978.
- (25) GUTTES, E. y S. GUTTES: Incorporation of tritium-labeled thymidine into the macronucleus of Stentor coeruleus. *Exper. Cell. Res.* 19, 626-628 (1960).
- (26) HOWARD, A. y S. R. PELC: Synthesis of deoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Hereditas*, 6, 261-273 (1953).
- (27) JAUKER, F.: A feedback control of cell cycle parameters in Tetrahymena. *J. Cell. Biol.* 67, 901-904 (1975).

- (28) JEFFERY, W. R., D. S. KENNETH y J. FRANKEL: The relationship between deoxyribonucleic acid replication and cell division in heat-synchronized Tetrahymena. J. Cell. Biol. 46, 533-543 (1970).
- (29) JEFFERY, W. R.: Evidence for a temporal incompatibility between DNA replication and division during cell cycle of Tetrahymena. J. Cell. Biol. 53, 624-634 (1972).
- (30) JEFFERY, W. R., J. FRANKEL, L. E. de BAULT y L. M. JENKINS: Analysis of the schedule of DNA replication in heat-synchronized Tetrahymena. J. Cell. Biol. 59, 1-11 (1973)
- (31) JERKA - DZIADOSZ y J. FRANKEL: The control of DNA synthesis in macronuclei and micronuclei of a Hypotrich Ciliate: A comparison of normal and regeneratin cells. J. of Exp. Zool. 173 nº 1.1970.
- (32) KIDDER, G. W.: Studies on Conchophtirius mytili. I. Morphology and division. Arch. Protistenk. 79, 1-24 (1933).
- (33) KIMBALL, R. F. y T. BARKA: Quantitative cytochemical studies on Paramecium aurelia. Exp. Cell. Res. 17, 173-182 (1959).
- (34) KIMBALL, R. F. y D. M. PRESCOTT: DNA synthesis and distribution during growth and mitosis of Euplotes. J. Protozool. 9, 88 (1962).

- (35) KLOETZEL, J. A.: Compartmentalization of the developing macronucleus following conjugation in Stylonichia and Euplotes. J. Cell. Biol. 47, 395-407 (1970).
- (36) KLUSS B. C.: Electron microscopy of the macronucleus of Euplotes eurytomus. J. Cell. Biol. 13, 462-465 (1962).
- (37) KUDRJAVTSEV B. N.: Changes of the DNA content in macro and micronucleus of Paramecium putrinum in the inter-division phase. Acta Protozool. 4, 51-57 (1966).
- (38) MARTIN SANCHEZ, J.: Morfogénesis cortical en Laurentia acuminata. Tesis doctoral. Univ. Sevilla. 1977.
- (39) MC DONALD, B. B.: Quantitative aspects of deoxiribose nucleic acid (DNA) metabolism in an amiconucleate strain of Tetrahymena. Biol. Bull. 114, 71-94 (1958).
- (40) MC DONALD, B. B.: Synthesis of deoxiribonucleic acid by micro and macronuclei of Tetrahymena pyriformis. J. Cell. Biol. 13, 193-203 (1962).
- (41) MITCHINSON, J. M.: The Biology of the cell cycle. Cambridge University. Press. 1971.
- (42) MORAT, G.: Etudes cytofotométrique et autoradiographique de l'appareil nucléaire de Colpidium campylum au cours du cycle cellulaire. Protistológica VI, fasc. 1, 83-93 (1970).

- (43) MUGARD, H.: Contribution à l'étude des Infusoires hymenostomes histiophages. Ann. Sci. Nat. (Zool.), Sér. 11, 10, 171-268 (1948).
- (44) NIETO, J. J. y A. TORRES: Cycle cellulaire chez Gastros-tyla steini. 17^{ème} Colloque du G. P. L. F. Poitiers. 1978.
- (45) NILSSON, J. R.: Suggestive structural evidence for macronuclear subnuclei in Tetrahymena pyriformis G-L. J. Protozool. 17, 539-548 (1970).
- (46) ÖRDÖGH, F.: Kernteilung in Kahlia simplex (Ciliata Protozoa). Acta Biol. Acad. Sci. Hung. 10, 127-139 (1959).
- (47) ORIAS, E. y M. FLACKS: Macronuclear genetics of Tetrahymena I. Random distribution of macronuclear gene copies in T. pyriformis, syngen 1. Genetics 79, 187-206 (1975).
- (48) PADNOS, M.: Cytology of cold induced transformation of octogenic reproductive cyst to resting cyst in Colpode maupasi. J. Protozool. 9, 13-20 (1962).
- (49) PRESCOTT, D. M. y R. F. KIMBALL: Relation between RNA, DNA and protein synthesis in the replicating nucleus of Euplotes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 47, 686-693 (1961).

- (50) PRESCOTT, D. M., R. F. KIMBALL y R. F. CARRIER: Comparison between the timing of micronuclear and macronuclear DNA synthesis in Euplotes eurystomus. J. Cell. Biol. 13, 175-176 (1962).
- (51) RAABE, H.: L'appareil nucléaire d'Urostyla grandis. Ehrbg. Partie II. Appareil macronucleaire. Ann. Univ. Mariae Curie-Sklodowska. Sér. C, 1, 133-170 (1947).
- (52) RAIKOV, I. B.: DNA content of the nuclei and the nature of macronuclear chromatin strands of the ciliate Nassulopsis elegans. Ehrbg. Acta Protozool. 2, 339-355 (1964).
- (53) RAIKOV, I. B.: Macronucleus of Ciliates. En: Research in Protozoology (T. T. Chen. Ed.). Pergamon Press. Oxford 1968.
- (54) RUFFOLO, John J. Jr: Fine structure of cell development in Euplotes Ph. D. Thesis, University of Iowa, Department of Zoology (1972).
- (55) RUTHMANN: Autoradiographische und mikrophotometrische Untersuchungen zur DNS- Synthese im makronucleus von Bursaria truncatella. Arch. Protistenk. 107, 117-130 (1964).
- (56) RUTHMANN, A.: Division and formation of the macronuclei of Keronopsis rubra. J. Protozool. 19, 661-666 (1972).

- (57) SALVANO, P.: Etude cytophotométrique de la teneur en ADN des micronoyaux au cours de la division binaire et des divisions pré-gamiques chez un cilié marin: Euplotes crassus. *Protistología*, 10, 253-259 (1974).
- (58) SALVANO, P.: Sur les acides nucléiques des Ciliés. *Ann. Biol.* 14, 1-28 (1975).
- (59) SCHWARTZ, V.: Nukleolenformwechsel und Zyklen der Ribonucleinsäure in der vegetativen Entwicklung von Paramecium bursaria. *Biol. Zbl.* 75, 1-16 (1956).
- (60) SCHWARTZ, V.: Über den Formwechsel achromatischer substanz in der Teilung der Macronucleus von Paramecium bursaria. *Biol. Zbl.* 75, 1-16 (1957).
- (61) SAPRA, G. R. y D. AMMERMANN: An analysis of the development program in relation to RNA metabolism in the Ciliate Stylonychia mytilus. *Develop. Biol.* 36, 105-111 (1974).
- (62) SEDGLEY, N. N. y G. E. STONE: DNA synthesis in vinblastine synchronized Tetrahymena. *Exp. Cell. Res.* 56-174 (1969).
- (63) SESHACHAR, B. R.: Chromatin elimination and the ciliate macronucleus. *Amer. Nat.* 81, 316-320 (1947).

- (64) SEYFERT, H. M.: A short G₁ period is correlated with low macronuclear DNA contents in Tetrahymena. Exp. Cell. Res. 108, 456-459 (1977).
- (65) SHEPARD, D. C.: Production and elimination of excess DNA in ultraviolet-irradiated Tetrahymena. Exp. Cell. Res. 38, 570-579 (1965).
- (66) SUMMERS, F. M.: The division and reorganization of Aspidisca lynceus, Diophrys appendiculata and Stylo-nichia pustulata. Arch. Protistenk. 85, 173-208 (1935).
- (67) TAMURA, S., R. TSURUHARA y Y. WATANABE: Function of microtubules in macronuclear division of Tetrahymena pyriformis. Exp. Cell. Res. 55, 351-358 (1969).
- (68) TERRA, N. de: Evidence for cell surface control of macronuclear DNA synthesis in Stentor. Nature, vol. 258, 300-303 (1975).
- (69) TJIO, J. M. y A. LEVAN: Some experiences with acetic-orcein. An. Estrac. Exp. Aula Dei, 3, 225-228 (1954).
- (70) TORRÉS, A.: El ciclo celular y procesos cariológicos relacionados con la regeneración en Laurentia acuminata. Tesis doctoral. Univ. Sevilla. 1977.

- (71) TORRES, A., C. MORENZA, C. FEDRIANI y J. PEREZ SILVA: Nuclear cycles and DNA contents in Laurentia acuminata. Protistológica. 1978 (en prensa).
- (72) TUFFRAU, M.: Perfectionement et pratique de la technique d'impregnation au Protargol des Infusoires Ciliés. Protistológica, 3, 91-98 (1967).
- (73) TURNER, J. P.: Division and conjugation in Euplotes patella. Ehrbg. with special reference to the nuclear phenomena. Univ. Calif. Publ. Zool. 33, 193-258 (1930).
- (74) USPENSKAJA, A. V. y L. P. OVCHINNIKOVA: Quantitative changes of DNA and RNA during the life cycle of Ichthyophthirius multifiliis. Acta Protozool. 4, 127-141 (1966) (in Russian).
- (75) WILLIAMS, N. E. y R. J. WILLIAMS: Macronuclear division with and without microtubules in Tetrahymena. J. Cell. Sci. 20, 61-77 (1976).
- (76) WITT, P. L.: Unequal distribution of DNA in the macronuclear division of the ciliate Euplotes eurystomus. Chromosome (Berl.) 60, 59-67 (1977).
- (77) WOODARD, J., B. GELBER y H. SWIFT: Nucleoprotein changes during the mitotic cycle in Paramecium aurelia. Exp. Cell. Res. 23, 258-264 (1961).

- (78) WORTHINGTON, D. H., D. S. NACHTWEY y E. B. WABENAAR:
Hydroxyurea: morphological effects on the macronucleus of Tetrahymena. *Exp. Cell. Res.* 92, 435 (1975).
- (79) WORTHINGTON, D. H., M. SALAMONE y D. S. NACHTWEY:
Nucleocytoplasmic ratio requirements for the initiation of DNA replication and fission in Tetrahymena. *Cell. Tissue Kinet.* 9, 119-130 (1976).
- (80) YOUNG, C. W., F. J. HENDLER y D. A. KARNOFSKY: Synthesis of protein for DNA replication and cleavage events in the sand dollar embryo. *Exp. Cell. Res.* 58, 15-26 (1969)
- (81) ZECH, L.: Dry weight and DNA content in sisters of Bursaria runcatella during the interdivision interval. *Exp. Cell. Res.* 44, 599-605 (1966).
- (82) ZEUTHEN, E.: Independent cycles of cell division and DNA synthesis in Tetrahymena. In cell growth and cell division. R. C. J. Harris, editor. Academic Press Inc. New York 1. 1963.